

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Vitoria Hagemann Cauduro

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS
PARA A DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES EM
MEDICAMENTOS DE USO ORAL**

Santa Maria, RS
2019

Vitoria Hagemann Cauduro

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA A
DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES EM MEDICAMENTOS DE
USO ORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Química**.

Orientador: Prof. Dr. Érico Marlon de Moraes Flores

Santa Maria, RS
2019

Vitoria Hagemann Cauduro

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA A
DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES EM MEDICAMENTOS DE
USO ORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Química**.


Aprovado em 02 de agosto de 2019:



Érico Marlon de Moraes Flores, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Adilson Ben-da Costa, Dr. (UNISC)



Edson Irineu Müller, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2019

Cauduro, Vitoria H.
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA
A DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES EM MEDICAMENTOS
DE USO ORAL / Vitoria H. Cauduro.- 2019.
92 f.; 30 cm

Orientador: Erico Marlon de Moraes Flores
Coorientadora: Rochele Sogari Picoloto
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2019

1. Preparo de amostras 2. Impurezas elementares em
fármacos 3. Diabetes tipo 2 4. MAWD 5. MAWD-UV I. Marlon
de Moraes Flores, Erico II. Sogari Picoloto, Rochele
III. Título.

DECLARAÇÃO

A pesquisa descrita nesta dissertação foi totalmente elaborada por mim e as informações retidas na literatura então devidamente referenciadas. Esta dissertação não foi apresentada anteriormente para a obtenção de qualquer outro grau.



Vitoria Hagemann Cauduro

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)**, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do presente trabalho.

Ao Prof. Dr. **Érico Marlon de Moraes Flores**, pela orientação durante este período, pela disponibilidade e disposição para transmitir conhecimentos, e por ser um exemplo profissional.

À Prof^a. Dra. **Rochele Sogari Picoloto**, pela co-orientação neste trabalho, pela paciência e disponibilidade para discutir todos os procedimentos realizados.

Ao Prof. Dr. **Adilson Ben da Costa** e Prof. Dr. **Edson Irineu Müller**, por participarem da banca examinadora, pela amizade e por todas as contribuições feitas neste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Cezar Augusto Bizzi** e Prof. Dr. **Juliano Barin** por participarem da banca de qualificação e pelas valiosas contribuições oferecidas para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos demais professores e colegas do grupo **LAQIA/CEPETRO**, pela amizade, companheirismo e oportunidades de crescimento pessoal e profissional que a mim foram concebidas, em especial aos colegas **Alessandra, Paula, Sindy, Morgana, Élisson** e **Sámili**, pela ajuda oferecida durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos **Alessandra, Michele, Sindy, Paula, Alice** e **Rafael**, pelo apoio moral, amizade e companheirismo durante este período, tanto fora como dentro do laboratório.

Ao **Ademir** e à **Valéria**, do PPGQ-UFSM, pela disposição e atenção dispendidas durante a execução do trabalho.

Finalmente, aos meus pais, **Eliane** e **Fernando**, pelo incentivo constante à busca pela evolução pessoal e profissional, pelo apoio, carinho e confiança.

Matar o sonho é matarmo-nos. É mutilar a nossa alma. O sonho é o que temos de realmente nosso, de impenetravelmente e inexpugnavelmente nosso.

(Fernando Pessoa)

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA A DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES EM MEDICAMENTOS DE USO ORAL

AUTORA: Vitoria Hagemann Cauduro

ORIENTADOR: Prof. Dr. Érico Marlon de Moraes Flores

Neste trabalho, foram desenvolvidos métodos de decomposição de medicamentos de uso oral utilizados no tratamento da diabetes tipo 2, na sua forma comercial, visando à determinação de impurezas elementares das classes 1 (As, Cd, Hg e Pb) e 2A (Co, Ni e V) por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). Foram avaliados os métodos de combustão iniciada por micro-ondas (MIC), decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas (MAWD) e decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta (MAWD-UV). Seis amostras de medicamentos de classes diferentes, à base de cloridrato de metformina (MET), glibenclamida (GLIB), cloridrato de pioglitazona (PIO), fosfato de sitagliptina (SITA), canagliflozina (CANA) e repaglinida (REPA) foram utilizados no desenvolvimento desse trabalho. Os medicamentos MET e CANA foram escolhidos para as otimizações dos métodos. Para a MIC, foram avaliados o tempo de refluxo (5 ou 10 min), a solução absorvedora (HNO_3 7 e 14,4 mol L⁻¹, misturas de HNO_3 14,4 mol L⁻¹, HCl 12 mol L⁻¹ e H₂O na proporção de 1+1+1, e misturas de HNO_3 14,4 mol L⁻¹ e HCl 12 mol L⁻¹ nas proporções de 1+1, 1+3 e 3+1), e auxiliares de combustão (celulose microcristalina ou NH₄Cl). Para a MAWD, foram avaliados o tempo de irradiação (45 ou 55 min), a solução digestora (HNO_3 1, 2, 3, 7 ou 14,4 mol L⁻¹), o reagente auxiliar (1 ou 2 mL de H₂O₂ 50%), e o uso de resfriamento simultâneo (vazão de ar de 60 m³ h⁻¹ ou 125 m³ h⁻¹). No caso da MAWD-UV, foram utilizados HNO_3 1 mol L⁻¹, tempo de irradiação de 55 min com resfriamento simultâneo (vazão de ar de 125 m³ h⁻¹), sendo avaliada a concentração do reagente auxiliar (1,6 ou 3,2 mL de H₂O₂ 50%). Para todos os procedimentos, foi feita a determinação da concentração de carbono dissolvido e acidez residual nos digeridos. A exatidão foi avaliada com base em ensaios de recuperação com adição de padrão e, para os métodos de MAWD e MAWD-UV, pela decomposição de materiais de referência certificados (CRMs). Utilizando a MIC, não foi possível obter recuperações quantitativas para V em nenhuma das condições avaliadas em amostras com excipientes inorgânicos. Para a MAWD, a decomposição da CANA foi possível usando HNO_3 3 mol L⁻¹, 1 mL de H₂O₂ 50% e programa de irradiação de 55 min. Para as demais amostras, a decomposição foi possível usando HNO_3 2 mol L⁻¹, 1 mL de H₂O₂ 50% e tempo de irradiação de 45 min. Usando a MAWD-UV, foi possível decompor todas as amostras usando HNO_3 1 mol L⁻¹, 1,6 mL de H₂O₂ 50% e programa de irradiação de 55 min. Os digeridos dos métodos de decomposição otimizados apresentaram baixo teor de acidez residual e carbono dissolvido, possibilitando a determinação por ICP-OES livre de interferências. Desta forma, foi possível desenvolver métodos eficientes para a decomposição da matriz orgânica de medicamentos de uso oral e posterior determinação de impurezas elementares das classes 1 e 2A do Guia ICH Q3D.

Palavras-chave: Impurezas elementares. MAWD. MAWD-UV. Fármacos. Diabetes tipo 2.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF SAMPLE PREPARATION METHODS FOR ELEMENTAL IMPURITIES DETERMINATION IN ORAL PHARMACEUTICAL DRUGS

AUTHOR: Vitoria Hagemann Cauduro

ADVISOR: Prof. Dr. Erico Marlon de Moraes Flores

In this study, sample preparation methods were developed for the digestion of oral pharmaceutical drugs used in the treatment of type 2 diabetes, with the objective of quantifying elemental impurities from classes 1 (As, Cd, Hg and Pb) and 2A (Co, Ni and V) by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). For this, the microwave induced combustion (MIC), microwave-assisted wet digestion (MAWD) and microwave and ultraviolet-assisted wet digestion (MAWD-UV) methods were evaluated. Six pharmaceutical drugs from different classes, containing metformine hydrochloride (MET), glibenclamide (GLIB), pioglitazone hydrochloride (PIO), sitagliptin hydrochloride (SITA), canagliflozin (CANA) and repaglinide (REPA) were used for the development of the methods. The drugs MET and CANA were chosen for the optimization of the methods. For the MIC method, the reflux step (5 or 10 min), the absorbing solution (7 and 14.4 mol L⁻¹ HNO₃, mixtures of 14.4 mol L⁻¹ HNO₃, 12 mol L⁻¹ HCl and H₂O in the proportion of 1+1+1, and mixtures of 14.4 mol L⁻¹ HNO₃ and 12 mol L⁻¹ HCl in the proportions of 1+1, 1+3 and 3+1), and the use of combustion aids (microcrystallin cellulose or NH₄Cl) were evaluated. For the MAWD method, the irradiation time (45 or 55 min), the digestion solution (1, 2, 3, 7 or 14.4 mol L⁻¹ HNO₃), the addition of an auxiliary reagent (1 or 2 mL of 50% H₂O₂) and the use of simultaneous cooling during the digestion (60 m³ h⁻¹ or 125 m³ h⁻¹ air flow rate) were evaluated. As for the MAWD-UV method, the following conditions were used: 1 mol L⁻¹ HNO₃, irradiation program of 55 min with simultaneous cooling (air flow rate of 125 m³ h⁻¹), with the auxiliary reagent being evaluated (1.6 or 3.2 mL of 50% H₂O₂). For all the procedures, both the carbon concentration and residual acidity were determined in the digests. The accuracy of the methods was evaluated based on analyte recovery after standard addition assays and, for the MAWD and MAWD-UV methods, by the digestion of certified reference materials (CRM). When using MIC, V recoveries were not possible for samples containing inorganic excipients. For the MAWD method, CANA digestion was possible using 3 mol L⁻¹ HNO₃, 1 mL of 50% H₂O₂ and a 55 min irradiation program. The digestion of the other samples was possible using 2 mol L⁻¹ HNO₃, 1 mL of 50% H₂O₂ and a 45 min irradiation program. By using MAWD-UV, it was possible to digest all samples using 1 mol L⁻¹ HNO₃, 1.6 mL of 50% H₂O₂ and a 55 min irradiation program. The resulting digests from the optimized methods contained low residual acidity and dissolved carbon, enabling the analytes' determination free of interferences by ICP-OES. In this way, it was possible to develop efficient methods for the decomposition of oral pharmaceutical drugs and subsequent class 1 and 2A (ICH Q3D guidelines) elemental impurities determination.

Keywords: Elemental impurities. MAWD. MAWD-UV. Pharmaceutical products. Type 2 diabetes.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XVI
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 DIABETES TIPO 2.....	4
2.2 IMPUREZAS ELEMENTARES EM MEDICAMENTOS DE USO ORAL	4
2.2.1 Classificação de impurezas elementares	5
2.3 DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES EM MEDICAMENTOS DE USO ORAL	8
2.4 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA DECOMPOSIÇÃO DE FÁRMACOS	9
3 MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 INSTRUMENTAÇÃO	17
3.2 REAGENTES	19
3.3 AMOSTRAS E MATERIAIS DE REFERÊNCIA CERTIFICADOS	21
3.4 LIMPEZA E DESCONTAMINAÇÃO DOS MATERIAIS	23
3.5 PROCEDIMENTOS DE DECOMPOSIÇÃO	24
3.5.1 Combustão iniciada por micro-ondas (MIC)	25
3.5.1.1 Avaliação da solução absorvedora	26
3.5.1.2 Uso de auxiliares de combustão	26
3.5.1.3 Tempo de refluxo.....	27
3.5.2 Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado (MAWD) com ácido diluído	27
3.5.2.1 Concentração da solução digestora	27
3.5.2.2 Programa de irradiação.....	28
3.5.2.4 Resfriamento simultâneo durante a etapa de aquecimento	28
3.5.2.3 Concentração do reagente auxiliar.....	29
3.5.3 Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta (MAWD-UV)	29
3.5.3.1 Avaliação dos parâmetros experimentais	30
3.6 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DAS DECOMPOSIÇÕES.....	31

3.6.1	Determinação da concentração de carbono dissolvido	31
3.6.2	Determinação da acidez residual	31
3.7	RESUMO DOS PROCEDIMENTOS	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS RELACIONADOS À DECOMPOSIÇÃO POR MIC	34
4.1.1	Avaliação inicial do método de MIC para decomposição de fármacos	34
4.1.2	Avaliação do tempo de refluxo	37
4.1.3	Avaliação da solução absorvedora	38
4.1.4	Avaliação de auxiliares de combustão	40
4.2	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS RELACIONADOS À DECOMPOSIÇÃO POR MAWD	46
4.2.1	Avaliação da solução digestora	47
4.2.2	Avaliação dos parâmetros de decomposição por MAWD para canagliflozina	51
4.2.2.1	<i>Avaliação do programa de irradiação</i>	51
4.2.2.2	<i>Avaliação do resfriamento simultâneo durante a etapa de aquecimento</i>	52
4.2.2.2	<i>Avaliação da utilização de ácido diluído</i>	53
4.2.2.3	<i>Avaliação do reagente auxiliar</i>	55
4.2.3	Determinação de impurezas elementares nas amostras de medicamentos após decomposição por MAWD com ácido diluído e peróxido de hidrogênio	56
4.2.3.1	<i>Decomposição de materiais de referência certificados</i>	58
4.3	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS RELACIONADOS À DECOMPOSIÇÃO POR MAWD-UV	60
4.3.1	Avaliação da exatidão do método de MAWD-UV	63
4.3.1.1	<i>Ensaio de recuperação</i>	63
4.3.1.2	<i>Decomposição de materiais de referência certificados</i>	64
4.4	COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS AVALIADOS PARA A DECOMPOSIÇÃO DE MEDICAMENTOS DE VIA ORAL USADOS NO TRATAMENTO DE DIABETES TIPO 2	65
5	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS	69

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Princípios ativos dos medicamentos utilizados neste trabalho: A) canagliflozina, B) glibenclamida, C) cloridrato de metformina, D) cloridrato de pioglitazona, E) repaglinida, F) fosfato de sitagliptina. 23
- Figura 2 – Comprimido de MET posicionado no suporte de quartzo dentro do frasco de mesmo material para decomposição por MIC..... 25
- Figura 3 – Fluxograma dos procedimentos experimentais desenvolvidos neste trabalho. 32
- Figura 4 – Recuperação dos analitos para a decomposição da amostra MET por MIC usando HNO_3 7 mol L^{-1} como solução absorvedora e 10 min de refluxo. A linha tracejada representa recuperação equivalente a 100%..... 35
- Figura 5 – Resíduo sólido sobre suporte de quartzo após procedimento de MIC para amostra MET usando HNO_3 7 mol L^{-1} como solução absorvedora e 10 min de refluxo. 36
- Figura 6 – Recuperação dos analitos para a decomposição da amostra MET por MIC (■), considerando as recuperações após a lixiviação dos suportes (■) e a decomposição dos resíduos sólidos (■). A linha tracejada representa recuperação equivalente a 100%..... 37
- Figura 7 – Recuperação dos analitos após procedimento de MIC com diferentes soluções absorvedoras usando 10 min de refluxo e volume de 6 mL: HNO_3 7 mol L^{-1} (■); HNO_3+HCl (1+1) (■); $\text{HNO}_3+\text{HCl}+\text{H}_2\text{O}$ (1+1+1) (■); HNO_3+HCl (3+1) (■); e HNO_3+HCl (1+3) (■). A linha tracejada representa recuperação equivalente a 100%..... 39
- Figura 8 – Recuperação dos analitos após procedimento de MIC com diferentes auxiliares de combustão usando 10 min de refluxo e 6 mL de HNO_3+HCl (1+3) ou HNO_3+HCl (3+1) como solução absorvedora: comprimido de 400 mg de NH_4Cl , HNO_3+HCl (3+1) (■); comprimido contendo 500 mg de MET e 400 mg de NH_4Cl , HNO_3+HCl (3+1) (■); comprimido contendo 300 mg de MET e 300 mg de NH_4Cl , HNO_3+HCl (3+1) (■); comprimido contendo 200 mg de MET e 300 mg de celulose microcristalina, HNO_3+HCl (3+1)

- (■);comprimido contendo 200 mg de MET e 300 mg de celulose microcristalina, HNO₃+HCl (1+3) (■). A linha tracejada representa recuperação equivalente a 100%. 41
- Figura 9 – Resíduos sólidos provenientes da combustão iniciada por micro-ondas das amostras: A) MET; B) REPA e C) SITA..... 44
- Figura 10 – Espectros de raios-X das amostras e dos resíduos sólidos provenientes da MIC. A) MET; B) MET, resíduo sólido; C) SITA; D) SITA, resíduo sólido, E) REPA; F) REPA, resíduo sólido; G) PIO; H) GLIB e I) CANA. 45
- Figura 11 – Concentração de carbono dissolvido (■), acidez residual (■) e aspecto dos digeridos finais para diferentes concentrações de HNO₃ usadas na decomposição de MET por MAWD. 1 mL de H₂O₂ 50% foi usado como reagente auxiliar para as condições em que se usou HNO₃ diluído. As barras representam a média com seu respectivo desvio padrão (n=3). *A barra mais clara indica a decomposição incompleta. 48
- Figura 12 – Concentração de carbono dissolvido (■) e acidez residual (■) nos digeridos finais após a decomposição de 500 mg de medicamentos por MAWD usando HNO₃ 2 mol L⁻¹ e 1 mL de H₂O₂ 50%. As barras representam a média com seu respectivo desvio padrão (n = 3). *A barra mais clara indica decomposição incompleta..... 50
- Figura 13 – Concentração de carbono dissolvido (■) e acidez residual (■) nos digeridos finais após decomposição de CANA por MAWD usando diferentes concentrações de HNO₃ (2 mL de H₂O₂ 50% como reagente auxiliar e o programa de irradiação 2). As barras representam a média com seu respectivo desvio padrão (n = 3). A barra em cinza representa a decomposição com ácido concentrado, sem adição de reagente auxiliar. 54
- Figura 14 – Concentração de carbono dissolvido (■) e acidez residual (■) nos digeridos finais após decomposição de 500 mg de CANA por MAWD usando diferentes concentrações de H₂O₂. Foi usado o programa de irradiação 2 e manteve-se a concentração de HNO₃

em 3 mol L ⁻¹ . As barras representam a média com seu respectivo desvio padrão (n = 3).	55
Figura 15 – Concentração de carbono dissolvido nos digeridos finais após a decomposição de 500 mg de MET por MAWD (■) e MAWD-UV (■) usando HNO ₃ 1 mol L ⁻¹ e diferentes concentrações de H ₂ O ₂ . *Decomposição incompleta.	61
Figura 16 – Concentração de carbono dissolvido (■) e acidez residual (■) nos digeridos finais após decomposição de 500 mg de amostras de medicamento com HNO ₃ 1 mol L ⁻¹ e 1,6 mL de H ₂ O ₂ 50% por MAWD-UV.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exposições diárias permitidas para as impurezas das classes 1, 2A, 2B e 3 em fármacos por via de administração. ⁵	7
Tabela 2 – Métodos de preparo de amostras para a determinação de impurezas elementares em fármacos.....	10
Tabela 3 – Condições operacionais para a determinação de impurezas elementares das classes 1 e 2A, elementos majoritários e C por ICP-OES.	18
Tabela 4 – Medicamentos utilizados no desenvolvimento do trabalho.	22
Tabela 5 – Programas de irradiação para a decomposição das amostras por MAWD com ácido diluído.	28
Tabela 6 – Programa de irradiação utilizado nas decomposições por MAWD-UV.....	30
Tabela 7 – Recuperação dos analitos em função do tempo de refluxo do procedimento de MIC, usando HNO ₃ 7 mol L ⁻¹ como solução absorvedora (valores em %, média ± desvio padrão, n = 3).....	38
Tabela 8 – Recuperação os analitos após decomposição das amostras de medicamentos, usando HNO ₃ 7 mol L ⁻¹ como solução absorvedora e refluxo de 10 min (valores em %, média ± desvio padrão, n = 3).	43
Tabela 9 – Concentração de elementos majoritários nos digeridos das amostras de medicamento após MAWD com ácido diluído e H ₂ O ₂ (valores em µg g ⁻¹ , média ± desvio padrão, n = 3).....	57
Tabela 10 – Recuperação dos analitos após decomposição das amostras de medicamentos por MAWD usando as condições otimizadas (valores em %, média ± desvio padrão, n=3).	58
Tabela 11 – Resultados obtidos para os analitos após decomposição de CRMs botânico e biológico misturados a amostra GLIB por MAWD (valores em µg g ⁻¹ , média ± desvio padrão, n = 3).....	59
Tabela 12 – Recuperação dos analitos após decomposição das amostras de medicamentos por MAWD-UV (valores em %, média ± desvio padrão, n = 3).....	63

Tabela 13 – Resultados obtidos para os analitos após decomposição de CRMs botânico e biológico misturados a amostra GLIB por MAWD-UV (valores em $\mu\text{g g}^{-1}$, média \pm desvio padrão, n = 3).....	64
Tabela 14 – Resumo dos parâmetros dos métodos de decomposição para medicamentos de uso oral avaliados neste trabalho.	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CANA	Canagliflozina
CRM	Material de referência certificado, do inglês, <i>certified reference material</i>
EDP	Exposição diária permitida
FEG	Filamento de emissão por campo, do inglês, <i>field emission gun</i>
GLIB	Glibenclamida
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês, <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
ICP-OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês, <i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>
LOD	Limite de detecção, do inglês, <i>limit of detection</i>
LOQ	Limite de quantificação, do inglês, <i>limit of quantification</i>
MAWD	Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas, do inglês, <i>microwave-assisted wet digestion</i>
MAWD-UV	Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta, do inglês, <i>microwave and ultraviolet-assisted wet digestion</i>
MET	Cloridrato de metformina
MIC	Combustão iniciada por micro-ondas, do inglês, <i>microwave-induced combustion</i>
PIO	Cloridrato de de pioglitazona
PTFE	Politetrafluoretileno, do inglês, <i>polytetrafluoroethylene</i>
REPA	Repaglinida
SED	Detector de elétrons secundário, do inglês, <i>secondary electrons detector</i>
SEM	Microscopia eletrônica de varredura, do inglês, <i>scanning electron microscopy</i>
SITA	Fosfato de sitagliptina
UV	Ultravioleta, do inglês, <i>ultraviolet</i>

1 INTRODUÇÃO

A diabetes tipo 2 é uma doença que acomete cerca de 8,8% da população mundial, e é caracterizada pela resistência e deficiência relativa de insulina no organismo.¹⁻³ Apesar de uma dieta balanceada e estilo de vida saudável ajudarem no controle da diabetes tipo 2, em grande parte dos casos é necessária a utilização de medicamentos de uso contínuo, destacando-se o cloridrato de metformina como tratamento de primeira linha.⁴

Tendo em vista que a presença de contaminantes em medicamentos pode causar o aparecimento de efeitos colaterais ou, até mesmo, a intoxicação do paciente, um controle de qualidade rigoroso é necessário, especialmente considerando medicamentos de uso prolongado.⁵ Dentre os possíveis contaminantes em fármacos, destacam-se as impurezas elementares, que podem estar presentes devido a resíduos de catalisadores usados no processo de fabricação, serem naturalmente encontrados nas matérias-primas utilizadas ou, também, podendo ser adicionadas de maneira involuntária pelo contato do fármaco com equipamentos ou embalagens.⁵ Quanto aos tipos de impurezas elementares, estas estão classificadas em três classes (1, 2A, 2B e 3), de acordo com a toxicidade do elemento e a probabilidade de ocorrência no fármaco, sendo o controle dos elementos das classes 1 (As, Cd, Hg e Pb) e 2A (Co, Ni e V) necessário em medicamentos de via oral.⁵

Para o controle das impurezas elementares em medicamentos, geralmente são usadas técnicas espectrométricas de detecção, em especial a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).⁶ Entretanto, como a maior parte dos medicamentos de via oral utilizados no tratamento da diabetes tipo 2 é disponibilizada na forma de comprimidos, é necessária uma decomposição prévia da matriz, uma vez que a montagem tradicional destes equipamentos exige a introdução da amostra na forma de solução ou suspensão. É importante ressaltar, também, que os digeridos devem ser compatíveis com a técnica de detecção, apresentando concentração de elementos facilmente ionizáveis, carbono dissolvido e acidez relativamente baixa, de modo a evitar interferências espectrais, de transporte e por alterações nas características do plasma.⁷

Assim, diversos métodos de preparo de amostras têm sido utilizados para a decomposição de fármacos e posterior determinação elementar, destacando-se os métodos de decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas (MAWD) e combustão iniciada por micro-ondas (MIC). Entretanto, há poucos relatos na literatura sobre métodos utilizando menores volumes de solução e reagentes diluídos para a decomposição. Geralmente, são usados reagentes e misturas de reagentes concentrados, que geram um grande volume de resíduos e podem estar relacionados a valores de brancos mais elevados. Além disso, o uso de reagentes concentrados geralmente resulta em um alto teor de acidez residual nos digeridos, sendo necessário diluir as alíquotas previamente à determinação dos analitos por ICP-OES e ICP-MS.⁸ Ademais, cabe destacar que a grande maioria dos trabalhos publicados apresenta métodos de decomposição de princípios ativos, havendo poucos relatos de métodos de preparo de amostras para a decomposição de produtos acabados.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver métodos de preparo de amostras para a decomposição de medicamentos de via oral usados no controle da diabetes tipo 2, visando à determinação de impurezas elementares das classes 1 e 2A por ICP-OES. Cabe destacar que os métodos foram desenvolvidos com o intuito de utilizar condições brandas de decomposição, ao mesmo tempo mantendo a eficiência de decomposição das amostras estudadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta seção, serão apresentados os medicamentos de uso oral aplicados no tratamento da diabetes tipo 2, cuja análise foi o foco deste trabalho. Serão tratados também aspectos relacionados ao controle de impurezas elementares em medicamentos de uso oral, incluindo as principais técnicas de detecção e métodos de preparo de amostras empregados para este fim.

2.1 DIABETES TIPO 2

A diabetes tipo 2 é caracterizada pela resistência à insulina nos tecidos periféricos (pâncreas, fígado, músculo esquelético, rins, cérebro, intestino delgado e tecido adiposo) e pela disfunção das células β pancreáticas, conhecida como deficiência relativa de insulina.^{1,2,9} Os principais fatores etiológicos da diabetes tipo 2 são a obesidade e o sedentarismo, com cerca de 60% dos portadores sendo obesos, porém fatores genéticos também podem influenciar no desenvolvimento da doença.^{2,9} Como consequência destes fatores, em 2017 estimava-se que cerca de 8,8% da população mundial era portadora de diabetes tipo 1 ou 2, sendo esperado um aumento de 1,1% no número de casos até 2045.³

Apesar de mudanças na dieta e no estilo de vida ajudarem a amenizar os efeitos da doença, o tratamento contínuo à base de medicamentos de uso oral também é necessário. Dentre os medicamentos utilizados, o cloridrato de metformina é considerado como primeira opção de tratamento para a diabetes tipo 2, atuando na diminuição da produção de glicose pelo fígado e aumento da sensibilidade deste órgão à insulina.² Este medicamento pode ser utilizado de maneira individual ou em conjunto com fármacos das classes das sulfonilureias, meglitinidas, tiazolidinedionas, inibidores da dipeptil peptidase-4 e inibidores do co-transportador de sódio-glicose-2, podendo também ser substituído por estes compostos em caso de contraindicações.⁴

Como o uso destes medicamentos muitas vezes deve ser feito de forma contínua, é necessário que seja feito um controle de qualidade rigoroso de modo a evitar problemas agudos ou crônicos derivados da presença de contaminantes. Em especial, a concentração de impurezas elementares deve ser monitorada, uma vez que estas podem ser responsáveis por efeitos colaterais ou mesmo pela intoxicação do paciente, dependendo de sua toxicidade.⁵

2.2 IMPUREZAS ELEMENTARES EM MEDICAMENTOS DE USO ORAL

A determinação de impurezas elementares é de grande importância no controle de qualidade de produtos farmacêuticos, uma vez que estas geralmente não apresentam benefícios terapêuticos ao paciente, podendo ocasionar efeitos

adversos e disfunções no organismo.⁵ Além do viés toxicológico, o monitoramento de impurezas elementares em medicamentos também pode servir como meio de identificação de problemas durante o processo de fabricação e/ou estocagem do produto, uma vez que a principal fonte de contaminação dos medicamentos são os catalisadores metálicos utilizados em seu processo de fabricação.⁷ Além disso, os contaminantes podem estar naturalmente presentes nas matérias-primas ou ser adicionados de forma involuntária pelo contato do produto farmacêutico com equipamentos ou embalagens durante a manufatura e estoque, respectivamente.^{5,10}

2.2.1 Classificação de impurezas elementares

O guia ICH Q3D (2019) divide as impurezas elementares em três classes, de acordo com sua toxicidade (dependente da via de administração do fármaco e da biodisponibilidade e estado de oxidação do elemento) e probabilidade de ocorrência no medicamento. A classe 1 é composta por As, Cd, Hg e Pb, os quais são elementos tóxicos com abundância natural relativamente elevada, podendo estar presentes em excipientes minerais e outros materiais usados na fabricação de produtos farmacêuticos. Na classe 2, estão presentes elementos cuja toxicidade é dependente da via de administração do medicamento. Esta classe é subdividida em 2A (Co, Ni e V) e 2B (Ag, Au, Ir, Os, Pd, Pt, Rh, Ru, Se, Tl). Os elementos contidos na subclasse 2A apresentam maior abundância e, por isso, requerem maior atenção durante a avaliação de risco, enquanto os elementos da subclasse 2B apresentam menor probabilidade de ocorrência no produto farmacêutico e devem ser monitorados apenas quando sua adição é intencional. Por fim, os elementos Ba, Cr, Cu, Li, Mo, Sb e Sn compõem a classe 3. As impurezas desta classe apresentam baixa toxicidade pela via oral, com exposições diárias permitidas (EDPs) maiores que $500 \mu\text{g dia}^{-1}$, porém seu controle em medicamentos de via inalatória e parenteral pode ser necessário.^{5,10}

Os elementos que devem ser considerados durante a avaliação de risco de um medicamento variam de acordo com a via de administração deste. Os elementos das classes 1 e 2A devem ser obrigatoriamente monitorados em medicamentos destinados a todas as vias de administração, devido à sua maior toxicidade e abundância, sendo os únicos elementos que devem ser monitorados para medicamentos de via oral. Para medicamentos de via parenteral, os elementos Cu,

Li e Sb também devem ser monitorados, enquanto para fármacos de via inalatória a classe 3 deve ser incluída na avaliação de risco. Além disso, quaisquer elementos adicionados intencionalmente durante a manufatura do produto farmacêutico também devem ser controlados. Na Tabela 1 estão dispostas as EDPs para as classes mencionadas de acordo com a via de administração do produto farmacêutico.⁵

Tabela 1 – Exposições diárias permitidas para as impurezas das classes 1, 2A, 2B e 3 em fármacos por via de administração.⁵

Elemento	Classe	EDP ($\mu\text{g dia}^{-1}$)		
		Via oral	Via parenteral	Via inalatória
Cd	1	5	2	3
Pb	1	5	5	5
As	1	15	15	2
Hg	1	30	3	1
Co	2 ^a	50	5	3
V	2 ^a	100	10	1
Ni	2 ^a	200	20	5
Tl	2B	8	8	8
Au	2B	100	100	1
Pd	2B	100	10	1
Ir	2B	100	10	1
Os	2B	100	10	1
Rh	2B	100	10	1
Ru	2B	100	10	1
Se	2B	150	80	130
Ag	2B	150	10	7
Pt	2B	100	10	1
Li	3	550	250	25
Sb	3	1200	90	20
Ba	3	1400	700	300
Mo	3	3000	1500	10
Cu	3	3000	300	30
Sn	3	6000	600	60
Cr	3	11000	1100	3

Como pode ser observado, os elementos da classe 1 apresentam EDPs baixas para todas as vias de administração, por se tratarem de elementos tóxicos com grande probabilidade de ocorrência. Já os elementos da classe 3 apresentam as maiores EDPs, especialmente Ba, Cr e Mo que apresentam os maiores limites nas vias inalatória, oral e parenteral, respectivamente.

2.3 DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES EM MEDICAMENTOS DE USO ORAL

Frente aos limites de exposição estabelecidos pelo guia ICH Q3D, faz-se necessário o uso de técnicas de determinação com capacidade multielementar e sensíveis o bastante para possibilitar a determinação de impurezas elementares em níveis traço e ultra traço. As técnicas de determinação mais comumente utilizadas são a espectrometria de absorção atômica (AAS),^{11,12} a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES)¹²⁻¹⁵ e a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).^{12,14,16-21} Dentre estas, as técnicas baseadas em plasma indutivamente acoplado destacam-se por possuírem amplas faixas lineares de trabalho (mais de quatro ordens de magnitude para ICP-OES e cerca de 6 ordens de magnitude para ICP-MS) e capacidade multielementar, necessárias ao se trabalhar com as diferentes EDPs impostas pelo guia ICH Q3D.^{5,7,22} Além disso, o plasma de argônio, utilizado nos equipamentos de ICP-OES e ICP-MS, fornece energia suficiente para atomizar, ionizar e excitar a maior parte dos elementos, proporcionando uma maior abrangência do que os equipamentos de AAS.⁷

Quanto à possibilidade de determinação em níveis traço, a técnica de ICP-MS apresenta os menores limites de detecção (LODs), na ordem de ng g^{-1} , ao passo que os LODs para ICP-OES são da ordem de $\mu\text{g g}^{-1}$. Entretanto, a maior sensibilidade da técnica de ICP-MS também faz com que esta seja menos robusta, suportando geralmente até 0,2% de sólidos dissolvidos totais, enquanto para a ICP-OES este valor é 125 vezes maior.⁶ Geralmente, as amostras devem estar na forma de solução ou suspensão para que seja feita a análise por ICP-OES e ICP-MS. Cabe destacar, porém, que apesar das técnicas baseadas em plasma indutivamente acoplado serem adequadas para a determinação de impurezas elementares em fármacos, estas (principalmente a ICP-MS) são suscetíveis a interferências causadas por soluções muito ácidas ou com teores de carbono elevados,²³⁻²⁶ sendo frequentemente necessário um tratamento prévio das amostras para minimizar estes efeitos.^{7,27}

A maior parte dos medicamentos de uso oral empregados no tratamento da diabetes tipo 2 é administrada na forma de comprimidos. Para a determinação de impurezas elementares nestes fármacos, existe a possibilidade de utilização de

amostragem direta de sólidos, como a vaporização eletrotérmica acoplada à espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ETV-ICP-OES),²⁸ a vaporização eletrotérmica acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ETV-ICP-MS),²⁹ a ablação a laser acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (LA-ICP-MS)³⁰ e a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS).^{11,31} Entretanto, a maioria das técnicas de determinação, operando no modo convencional, exige que a amostra esteja na forma de solução. Desta forma, é necessário que seja feita uma etapa prévia de preparo de amostra de modo a convertê-la em uma solução compatível com a técnica de detecção.²⁷

2.4 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA DECOMPOSIÇÃO DE FÁRMACOS

Para a decomposição de produtos farmacêuticos, é necessário que se tenha conhecimento prévio dos componentes da amostra, de modo que a escolha do método analítico seja adequada para se obter uma solução final compatível com os métodos de determinação sem interferências.²⁷ Desta forma, diversos métodos de preparo de amostras têm sido desenvolvidos visando à posterior determinação de impurezas elementares (majoritariamente por ICP-MS e ICP-OES). Na Tabela 2 estão expostos alguns dos métodos mais recentes desenvolvidos para este fim.

Tabela 2 – Métodos de preparo de amostras para a determinação de impurezas elementares em fármacos.

(continua)

Amostras	Analitos	Método de preparo de amostra	Técnica(s) de quantificação	Referência
Cloridrato de amitriptilina, carbamazepina, clozapina, cloridrato de ciclobenzaprina, entre outros	As, Cd, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru e V	<u>MIC</u> : 125 mg Solução absorvedora: 6 mL de HNO ₃ 14,4 mol L ⁻¹ . Programa de irradiação: 1400 W por 5 min.	ICP-MS	28
Cloridrato de amitriptilina, carbamazepina e cloridrato de imipramina	As, Cd, Hg e Pb	<u>MIC</u> : 500 mg Solução absorvedora: 6 mL de HNO ₃ 7 mol L ⁻¹ . Programa de irradiação: 1400 W por 10 min.	ICP-MS	18
Aspirina	As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ir, Mn, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru e V	<u>MIC</u> : 400-700 mg Solução absorvedora: 5 mL de HNO ₃ 20%. Programa de irradiação: 1400 W por 5 min.	ICP-MS	32
Pomada aciclovir e suas matérias-primas (edetato dissódico, aciclovir, cera emulsificante não-iônica e metilparabeno)	As, Cu, Cr, Ni, Pb e V	<u>MAWD</u> : 200 mg Solução de decomposição: 6 mL de HNO ₃ 7 mol L ⁻¹ + 2 mL H ₂ O ₂ 30%. Programa de aquecimento: (i) rampa de 20 min até 160 °C; (ii) permanência de 20 min em 160 °C.	ICP-MS	19
Princípio ativo TP-6076	As, Cd, Hg, Pb, V, Cr, Ni, Mo, Cu, Pt, Pd, Ru, Rh, Os e Ir	<u>Dissolução</u> : 10 mg Solução: 10 mL de uma solução composta por HCl 5% (v/v) + ácido acético 0,1% (v/v) + tioureia 0,076% (m/v) + ácido ascórbico 0,01% (m/v).	ICP-MS	17
Medicamentos de uso oral (cloridrato de metformina, losartana potássica, omeprazol, entre outros) e suplemento alimentar	Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl e V	<u>MAWD-SRC</u> : 100 ou 500 mg Solução de decomposição: 7 mL de HNO ₃ 2 mol L ⁻¹ . Programa de aquecimento: (i) rampa de 2,5 min até 140 °C; (ii) permanência de 2,5 min em 140 °C; (iii) rampa de 2,5 min até 180 °C; (iv) permanência de 2,5 min em 180 °C; (v) rampa de 10 min até 220 °C; (vi) permanência de 10 min em 220 °C. Após a decomposição, os digeridos foram centrifugados por 3 min a 6000 rpm.	ICP-MS e ICP-OES	33

Tabela 2 – Métodos de preparo de amostras para a determinação de impurezas elementares em fármacos.

(continuação)

Amostras	Analitos	Método de preparo de amostra	Técnica(s) de quantificação	Referência
Comprimidos de Lu	As, Cd, Cu, Cr, Fe, Hg, Ir, Mn, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, V e Zn	<u>MAWD</u> : 450 mg Solução de decomposição: 12 mL água régia invertida (HNO ₃ + HCl, 3+1). Programa de aquecimento: rampa de 30 min até 220 °C, permanência de 40 min em 220 °C.	ICP-OES	13
BaSO ₄	As, Cd, Hg e Pb	<u>MIC</u> : 300 mg + 600 mg celulose microcristalina + 500 mg NH ₄ Cl Solução absorvedora: 6 mL de HNO ₃ 5,5 mol L ⁻¹ + HCl 1,5 mol L ⁻¹ . Programa de irradiação: 1400 W por 5 min.	ICP-MS	34
Excipientes e substâncias farmacêuticas	Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl e V	<u>MAWD</u> : 200-300 mg Solução de decomposição: 3 mL de HNO ₃ 70% + HCl 37%, 1+1 (com adição de 1 mL de H ₂ O ₂ 30% ou 0,7 mL de HF 50% dependendo da amostra). Programa de aquecimento: (i) rampa de 10 min até 190 °C; (ii) permanência de 20 min em 190 °C.	ICP-MS	16
Ácido acetilsalicílico e L-serina	As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Ir, Mn, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, V e Zn	<u>Dissolução</u> : 100 mg Solução: 10 g HNO ₃ 1%/ HCl 0,15% (v/v). <u>MAWD</u> : 100 mg Solução de decomposição: 3 mL de HNO ₃ ultra limpo. Programa de aquecimento: 25 min a 600 W (temperatura e pressão máxima de 160 °C e 25 bar). Adição de estabilizantes HCl para Hg e de tiourea para Os após a decomposição.	FI-ICP-MS e FI-ICP-SFMS	20
Princípios ativos, intermediários e produtos farmacêuticos	Al, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pd, Pt, Rh, Ru, W, Zn e Zr	<u>Dissolução</u> : 10 mg ou 10 µL Solução: 5 mL de EDTA/DMF (2 g/100 mL, aquecimento a 120 °C por 30 min).	ICP-OES	35

Tabela 2 – Métodos de preparo de amostras para a determinação de impurezas elementares em fármacos.

(conclusão)

Amostras	Analitos	Método de preparo de amostra	Técnica(s) de quantificação	Referência
Captopril, enalapril, benazepril, lisinopril, entre outros princípios ativos	As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, I, Mn, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, S, Sn, V e Zn	<u>MAWD</u> : 400 mg amostra Solução de decomposição: 2 mL de H ₂ O + 4 mL de HNO ₃ 65% + HCl 37% (1+1). Programa de aquecimento: (i) 85 °C por 8 min, (ii) rampa de 5 min até 130 °C, (iii) rampa de 5 min até 200 °C, (iv) permanência de 30 min em 200 °C.	ICP-MS, ICP-OES, GFAAS, CVAAS e HGAAS	12
Levodopa, difosfato de primaquina, cloridrato de propranolol, sulfametoxazol, entre outros princípios ativos.	As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ir, Mn, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru e V	<u>MAWD-SRC</u> : 250 ou 500 mg Solução de decomposição: 6 mL de HNO ₃ 65% ou 6 mL água régia invertida (HNO ₃ + HCl, 3:1). Programa de aquecimento: (i) rampa de 10 min até 270 °C; (ii) permanência de 20 min em 270 °C, pressão máx. 199 bar.	ICP-MS, DRC-ICP-MS e FI-CVG-ICP-MS	21
Aspirina e lisinopril	Ag, As, Au, Cd, Co, Hg, Ir, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Se, Tl e V	<u>MAWD</u> : 200 mg Solução de decomposição: 3 mL de HNO ₃ 70% + 1 mL de H ₂ O ₂ (10 min de pré digestão); + 4 mL HNO ₃ 70% + 2 mL HCl 37%. Programa de aquecimento: (i) rampa de 5 min até 210 °C; (ii) permanência de 5 min em 210 °C; (iii) rampa de 3 min até 250 °C; (iv) permanência de 6 min em 250 °C.	USN-ICP-OES	15

Como pode ser observado na Tabela 2, o principal método utilizado para o preparo de amostras farmacêuticas visando à determinação de impurezas elementares é a decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas (MAWD). Destaca-se também o método de combustão iniciada por micro-ondas (MIC), o qual pode ser considerado uma alternativa para o preparo de amostras de difícil decomposição, como fármacos tricíclicos¹⁸ ou excipientes inorgânicos,³⁴ por exemplo. A tendência cada vez maior para o uso de micro-ondas no preparo de amostras se deve à possibilidade de aquecer diretamente a solução no interior dos frascos, os quais são transparentes à radiação micro-ondas.³⁶ Além disso, os equipamentos de micro-ondas modernos possibilitam o monitoramento da temperatura e pressão no interior dos frascos em tempo real, fornecendo uma maior segurança operacional.⁸ Cabe mencionar, também, que os métodos de MIC e MAWD são citados em ambas as farmacopeias brasileira³⁷ e americana³⁸ para a decomposição de fármacos e posterior determinação de impurezas elementares.

O método de MIC consiste na reação de combustão da amostra, que ocorre com o auxílio de um iniciador de combustão (geralmente NH_4NO_3) em frascos pressurizados com O_2 (geralmente 20 bar), após irradiação dos mesmos com micro-ondas.³⁹ Este método apresenta, como principais vantagens, a rápida decomposição de massas relativamente altas de amostra (até 1,5 g) e a obtenção de digeridos contendo baixas concentrações de carbono dissolvido.³⁹ Cabe destacar que este método geralmente possibilita a utilização de soluções absorvedoras diluídas, uma vez que a decomposição da matriz se dá, majoritariamente, pela reação de combustão, a qual é altamente energética ($> 1000\text{ }^\circ\text{C}$).³⁹ Desta forma, este método apresenta grande potencial para a decomposição de medicamentos de via oral.

Já o método de MAWD consiste na decomposição da matriz da amostra pela ação de reagentes oxidantes ou complexantes, idealmente convertendo completamente a fração orgânica em CO_2 .³⁶ O reagente mais utilizado para decomposições por MAWD é o ácido nítrico, tendo em vista seu caráter oxidante e a formação de nitratos solúveis dos elementos presentes na amostra.⁴⁰ Além disso, a ação da pressão e temperatura elevadas atingidas durante os procedimentos de MAWD, com frasco fechado, também fornece um aumento na eficiência de decomposição. Geralmente, quanto mais drásticas forem as condições de decomposição (maior temperatura, pressão e concentração dos reagentes), melhor

a eficiência e, conseqüentemente, menor o teor de carbono e acidez residuais nos digeridos.^{8,36} Entretanto, a maior parte dos métodos de MAWD desenvolvidos para a decomposição de produtos farmacêuticos emprega misturas de ácidos concentrados, resultando em maior gasto de reagentes, volume elevado de resíduos, maiores valores de brancos e alto teor de acidez residual nos digeridos. Desta forma, seria necessária a diluição das amostras antes da análise por ICP-OES e, principalmente, por ICP-MS para minimizar o efeito do ácido, comprometendo a detectabilidade do método. Com o intuito de minimizar as desvantagens observadas pela utilização de reagentes concentrados na MAWD, métodos mais verdes têm sido desenvolvidos utilizando ácido diluído.⁸ Dentre estes, destacam-se o método modificado de MAWD empregando ácido diluído e o método de decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta (MAWD-UV).⁸

O método de MAWD usando ácido diluído geralmente emprega o ácido nítrico como solução digestora e depende de dois fatores: do gradiente de temperatura observado entre fase gasosa e líquida no interior do frasco e da presença de O₂ no meio reacional (o que pode ser obtido tanto pela pressurização com O₂ como pela decomposição do H₂O₂). A reação dos óxidos de nitrogênio, gerados na decomposição da matriz da amostra, com o O₂ proporciona a regeneração do ácido, o qual é condensado ao entrar em contato com a fração mais fria do frasco, repetindo o ciclo até que todo o O₂ seja consumido. Este método tem sido utilizado com sucesso na decomposição de matrizes botânicas e biológicas, apresentando potencial para aplicação em amostras farmacêuticas.^{36,41-45}

A radiação UV compreende os comprimentos de onda de 10 a 400 nm, sendo capaz de excitar os elétrons da camada de valência de moléculas e quebrar ligações (fotólise), dando origem a espécies radicalares. No método de MAWD-UV, a radiação UV é emitida a partir da utilização de lâmpadas de descarga sem eletrodo acionadas pela radiação micro-ondas. A radiação UV gerada com as micro-ondas age como catalisadora na decomposição dos agentes oxidantes utilizados (HNO₃, H₂O₂), formando principalmente radicais hidroxila, os quais reagem com a matriz da amostra acelerando a degradação de substâncias orgânicas (mesmo compostos estáveis, como anéis aromáticos).⁴⁶ Essa sinergia entre os dois tipos de radiação faz com que seja possível a utilização de reagentes diluídos sem perdas na eficiência de decomposição. Apesar de não constarem métodos na literatura para a

decomposição de fármacos empregando MAWD-UV, este método de preparo tem sido utilizado na decomposição de diversas matrizes, como resíduos poliméricos de equipamentos elétricos e eletrônicos,⁴⁷ alimentos,^{48,49} algas marinhas,^{50,51} petróleo e combustíveis⁵²⁻⁵⁴ e corantes.⁵⁵

Considerando o elevado número de amostras farmacêuticas submetidas ao controle de qualidade diariamente, é necessário desenvolver métodos de preparo de amostras que proporcionem a redução não apenas dos resíduos gerados, mas também do consumo de reagentes. Desta forma, o presente trabalho se destinou ao desenvolvimento de métodos de preparo de amostras, aplicando condições mais brandas, para a decomposição de medicamentos de via oral usados no controle da diabetes tipo 2, visando à determinação de impurezas elementares das classes 1 e 2A por ICP-OES.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesse capítulo são descritas a instrumentação, os equipamentos, reagentes, materiais e as amostras utilizadas no desenvolvimento deste trabalho. Também são abordados os parâmetros avaliados na otimização de métodos de preparo de amostras para a posterior determinação de As, Cd, Co, Hg, Ni, Pb e V em medicamentos empregados no controle da diabetes tipo 2, bem como os procedimentos utilizados.

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

A decomposição das amostras por MIC, MAWD e MAWD-UV foi feita usando um forno de micro-ondas (modelo Multiwave 3000[®], Anton Paar, Áustria) equipado com rotor com capacidade para 8 frascos de quartzo (volume interno de 80 mL). Para as decomposições por MIC, foram utilizados suportes de quartzo desenvolvidos no laboratório de hialotecnica da Universidade Federal de Santa Maria.

Para as decomposições por MAWD-UV, foram utilizadas lâmpadas de descarga sem eletrodo de Cd de baixa pressão preenchidas com Ar (part number 16847, Anton Paar), com emissão de radiação predominantemente nos comprimentos de onda de 228 nm e 326 nm. Suportes de politetrafluoretileno (PTFE), fornecidos pelo fabricante, foram usados para o posicionamento das lâmpadas no interior dos frascos de quartzo. A pressão e temperatura no interior dos frascos, assim como a potência de irradiação de micro-ondas, foram monitoradas em tempo real durante os procedimentos de decomposição através de sensores disponíveis no equipamento.

Para os procedimentos de MIC e MAWD, foram estabelecidas como pressão e temperatura máximas 80 bar e 280 °C, respectivamente. Para os procedimentos de MAWD-UV, a temperatura máxima de trabalho foi limitada em 250 °C, para evitar danos aos dispositivos de PTFE. Para a confecção dos comprimidos utilizados na avaliação de auxiliares de combustão no método de MIC, foi usada uma prensa hidráulica (modelo Hydraulic Press 15 ton, Specac, Inglaterra). Para a decomposição dos resíduos sólidos da combustão das amostras por MIC foi utilizado um bloco digestor equipado com frascos de PTFE (modelo TE 015, Tecnal, São Paulo).

A determinação das impurezas elementares das classes 1 e 2A, elementos majoritários e C foram feitas em um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (modelo Spectro Ciros CCD[®], Spectro Analytical Instruments, Alemanha), configurado com vista axial e sistema óptico selado. Foi utilizado um nebulizador do tipo *cross-flow*, uma câmara de nebulização de duplo passo (*Scott*), tocha e tubo injetor de quartzo. As condições operacionais do equipamento estão descritas na Tabela 3. Para os cálculos dos limites de quantificação (LOQ), expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$, foram feitas 10 leituras dos brancos, sendo o desvio padrão obtido por estas leituras multiplicado por 10 e adicionando ao valor da média das concentrações dos brancos, levando-se em consideração a

massa de amostra utilizada no procedimento de decomposição (aproximadamente 500 mg), bem como o volume de aferição (25 mL).

Tabela 3 – Condições operacionais para a determinação de impurezas elementares das classes 1 e 2A, elementos majoritários e C por ICP-OES.

Parâmetro	ICP-OES
Potência do gerador de radiofrequência, W	1400
Vazão de argônio principal, L min ⁻¹	12,0
Vazão de argônio auxiliar, L min ⁻¹	1,0
Vazão de argônio do nebulizador, L min ⁻¹	1,00
Câmara de nebulização	Duplo passo
Nebulizador	Cross-flow
Analitos	Linha de emissão, nm
As	189,042 (I)
Ca	396,847 (II)
Cd	214,438 (II)
Co	230,786 (II)
Fe	259,941 (II)
Hg	194,227 (II)
K	766,491 (I)
Mg	279,553 (II)
Na	589,592 (I)
Ni	231,604 (II)
Pb	220,353 (II)
V	292,402 (II)
C	193,030 (I)
Y	371,029 (II)

I: Linha de emissão atômica; II: linha de emissão iônica.

A acidez residual dos digeridos foi determinada utilizando um titulador automático (modelo Titrand 836, Metrohm, Suíça) equipado com um agitador magnético (modelo 803 Ti Stand, Metrohm), uma bureta de 20 mL (modelo Dosino 800, Metrohm) e um eletrodo de pH de vidro combinado para meio aquoso (LL Electrode Plus, modelo 6.0262.100, Metrohm). Todos os procedimentos de pesagem foram feitos em uma balança analítica com resolução de 0,0001 g e carga máxima de 220 g (modelo AY220, Shimadzu do Brasil, Brasil). Para os procedimentos de

secagem, foi utilizada uma estufa convencional com circulação de ar (modelo 400/2ND, Nova Ética, Brasil).

As amostras e resíduos sólidos provenientes das decomposições por MIC foram caracterizados quanto à morfologia utilizando um microscópio eletrônico de varredura (modelo Sigma 300 VP, Carl Zeiss, Alemanha) do tipo FEG (field emission gun), composto por um filamento de emissão por campo do tipo Schottky (tungstênio com recobrimento de ZrO_2) e equipado com uma coluna Gemini (Zeiss, Inglaterra). As caracterizações morfológicas foram feitas no modo de alto vácuo (1×10^{-11} mbar) e as imagens foram obtidas utilizando detector de elétrons secundários (SED). Também foi feita a determinação composicional qualitativa das amostras e resíduos, utilizando-se um detector de raios-X EDS (modelo Quantax, 200-Z10, Bruker, Alemanha), equipado com janela de quartzo de 10 mm^2 e software ESPRIT.

A avaliação dos resultados foi feita a partir da aplicação de testes estatísticos utilizando o software GraphPad InStat, versão 3.0, 1997 (GraphPad InStat Software, EUA). Para isso, foram aplicados o teste t de *student* ou a análise de variância ANOVA, ambos com nível de confiança de 95%, para a comparação de médias.

3.2 REAGENTES

A água utilizada neste trabalho foi previamente destilada, deionizada em coluna de troca iônica (condutividade máxima de $0,6 \mu\text{S cm}^{-1}$) e purificada em sistema Milli-Q[®] (Milli-Q[®], Millipore, EUA), de modo a apresentar resistividade superior a $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$. O ácido nítrico P.A. (65%, $1,4 \text{ kg L}^{-1}$, Sigma Aldrich, EUA) e ácido clorídrico P.A. (37%, $1,19 \text{ kg L}^{-1}$, Merck, Alemanha) utilizados nos procedimentos de decomposição foram previamente destilados em sistema de destilação *sub-boiling* (modelo duoPUR, Milestone, Itália).

Peróxido de hidrogênio P.A. (50%, $1,14 \text{ kg L}^{-1}$, Vetec), sem purificação prévia, foi utilizado nos procedimentos de MAWD com ácido diluído e MAWD-UV. Ácido fluorídrico concentrado P.A. (23 mol L^{-1} , $1,15 \text{ kg L}^{-1}$, Sigma Aldrich) foi usado na decomposição dos resíduos sólidos da combustão das amostras por MIC. Ácido nítrico P.A. sem purificação prévia foi utilizado nos procedimentos de descontaminação.

Como iniciador de combustão na MIC, foi utilizada uma solução de nitrato de amônio P.A. (Merck) 6 mol L^{-1} , preparada a partir da dissolução do respectivo sal em água. Discos de papel filtro com baixo teor de cinzas (Black Ribbon Ashless, Schleicher & Schüll GmbH, Alemanha), cloreto de amônio (Vetec) e celulose microcristalina (adquirida em mercado local) foram utilizados como auxiliares de combustão.

Nos experimentos com adição de padrão foi preparada uma solução estoque a partir da diluição de padrões de referência monoelementares de As, Cd, Co, Hg, Ni, Pb e V (1000 mg L^{-1} , Merck) em água. As soluções de calibração de As, Cd, Pb e V (1 a $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ em água régia invertida 5%) e de Ca, Co, Fe, K, Mg, Na e Ni (10 a $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ em água régia invertida 5%) foram preparadas a partir de diluições sucessivas de uma solução estoque (10 mg L^{-1} , SCP33MS, SCP Science, Canadá). A solução de calibração de Hg foi preparada a partir de um padrão de referência monoelementar (1000 mg L^{-1} , Merck).

Para a determinação de C dissolvido nos digeridos, os padrões de calibração (10 a 500 mg L^{-1}) foram preparados por diluições sucessivas de uma solução estoque de 1000 mg L^{-1} C, obtida pela dissolução de ácido cítrico P.A. (Vetec) em HNO_3 5%. Ítrio, na concentração de 1 mg L^{-1} , foi utilizado como padrão interno na determinação de C, sendo diluído a partir de uma solução de referência monoelementar (1000 mg L^{-1} em HNO_3 2%, Spex, EUA). As amostras e padrões foram purgadas com Ar por 2 min previamente à medida.

Para a determinação da acidez residual nos digeridos, foi preparada uma solução titulante de KOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a partir da dissolução da base (KOH P.A., Merck) em água. A padronização da solução titulante foi feita com biftalato de potássio (Merck) previamente seco a $105 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 h.

Oxigênio com pureza de 99,6% (White Martins, Brasil) foi usado na pressurização dos frascos de quartzo para os procedimentos de MIC. Para as determinações por ICP-OES utilizou-se gás argônio com pureza de 99,998% (Air Products, Brasil) para a geração do plasma e como gás auxiliar.

3.3 AMOSTRAS E MATERIAIS DE REFERÊNCIA CERTIFICADOS

Neste trabalho, foram utilizados 6 medicamentos de via oral usados no tratamento da diabetes tipo 2, os quais estão descritos na Tabela 4. As amostras foram obtidas em farmácias de Santa Maria, RS. Quando possível, foram adquiridos medicamentos genéricos (cloridrato de metformina, cloridrato de pioglitazona, glibenclamida e repaglinida). Nos casos em que a versão genérica não estava disponível, foram obtidos os medicamentos de referência (canagliflozina e fosfato de sitagliptina). Para os procedimentos de decomposição, as amostras foram utilizadas na sua forma original de comprimidos, sem cominuição prévia. Para isso, foram usados um ou mais comprimidos de cada amostra de modo a se ter uma massa de aproximadamente 500 mg (sendo atingidas massas de 420 a 600 mg). As amostras de cloridrato de metformina (MET) e canagliflozina (CANA) foram utilizadas para a avaliação dos métodos de decomposição.

A avaliação da exatidão foi feita utilizando os materiais de referência certificados (CRMs) de fígado de cação, DOLT-4 (*dogfish liver*, National Research Council of Canada, Canadá), de hepatopâncreas de lagosta, TORT-2 (*lobster hepatopancreas*, National Research Council of Canada, Canadá) e de planta aquática, BCR 60 (*aquatic plant*, Community Bureau of Reference, Bélgica).

Tabela 4 – Medicamentos utilizados no desenvolvimento do trabalho.

Identificação	Princípio ativo (PA)	Dosagem do PA (mg)	Massa média por comprimido (mg)	N*	Classe	Excipientes
MET	Cloridrato de metformina	500	600	1	Biguanidas	Amido, copolímero de poli(álcool vinílico) e macrogol, SiO ₂ , povidona, estearato de magnésio, amidoglicolato de sódio, macrogol.
GLIB	Glibenclamida	5	125	4	Sulfonilureias	Lactose monoidratada, povidona, crospovidona, estearato de magnésio.
SITA	Fosfato de sitagliptina	50	210	2	Inibidores da DPP-4	Celulose microcristalina, CaHPO ₄ , croscarmelose sódica, amidoglicolato de sódio, estearato de magnésio, estearilfumarato de sódio, poli(álcool vinílico), macrogol, talco, TiO ₂ , Fe ₂ O ₃ , FeO.
PIO	Cloridrato de pioglitazona	45	180	3	Tiazolidinedionas	Lactose monoidratada, croscarmelose sódica, amidoglicolato de sódio, hiprolose, estearato de magnésio, H ₂ O.
CANA	Canagliflozina	100	210	2	Inibidores da SGLT2	Celulose microcristalina, lactose anidra, croscarmelose sódica, hiprolose, estearato de magnésio, poli(álcool vinílico), TiO ₂ , macrogol, talco, FeO.
REPA	Repaglinida	2	100	5	Meglitinidas	Celulose microcristalina, CaHPO ₄ .2H ₂ O, CaCO ₃ , amido, povidona, crospovidona, laurilsulfato de sódio, estearato de magnésio, Fe ₂ O ₃ .

DPP-4: enzima dipeptil peptidase-4; SGLT2: co-transportador de sódio-glicose-2

* Número de comprimidos utilizados nos procedimentos de decomposição.

Na Figura 1, estão expostos os princípios ativos dos medicamentos utilizados neste trabalho. Como pode ser observado, com a exceção da amostra MET, todos os princípios ativos contêm grupamentos aromáticos em suas estruturas. Além disso, vários dos compostos contêm grupos desativadores, como $-\text{COOH}$, $-\text{Cl}$ e $-\text{F}$ ligados aos anéis (conferindo-lhes maior estabilidade), o que pode fazer com que estes sejam mais resistentes ao ataque ácido durante o procedimento de decomposição.

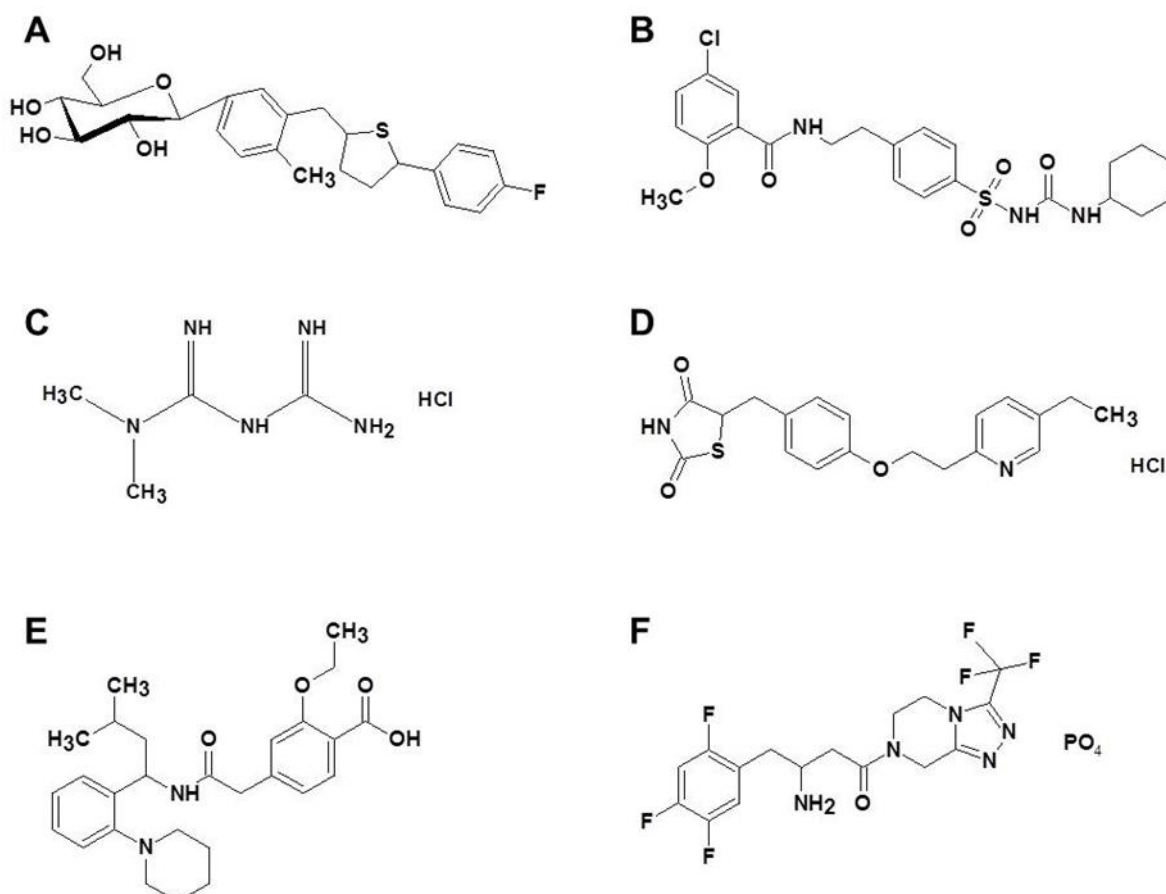


Figura 1 – Princípios ativos dos medicamentos utilizados neste trabalho: A) canagliflozina, B) glibenclamida, C) cloridrato de metformina, D) cloridrato de pioglitazona, E) repaglinida, F) fosfato de sitagliptina.

3.4 LIMPEZA E DESCONTAMINAÇÃO DOS MATERIAIS

Os materiais comuns de laboratório utilizados neste estudo foram lavados e descontaminados por imersão em HNO_3 10% (v v⁻¹) por pelo menos 24 h, e lavados com água antes de serem utilizados. O papel filtro utilizado como auxiliar de combustão nos procedimentos de MIC foi descontaminado previamente ao uso com

HNO₃ 20% (v v⁻¹) em banho de ultrassom durante 30 min, seguido por lavagem com água e secagem em capela de fluxo laminar.

Os frascos de quartzo utilizados nos procedimentos de decomposição por MIC, MAWD e MAWD-UV, assim como os suportes de quartzo e os dispositivos de PTFE foram descontaminados com 6 mL de HNO₃ 14,4 mol L⁻¹ em forno de micro-ondas utilizando o seguinte programa de irradiação: 1000 W por 10 min e resfriamento a 0 W por 20 min. Após o término do programa, o resíduo ácido foi descartado e os materiais foram lavados com água, seguido de secagem com ar comprimido. A descontaminação dos frascos de PTFE utilizados no bloco digestor foi feita com 6 mL de HNO₃ 14,4 mol L⁻¹ e aquecimento a 120 °C por uma hora, seguido do descarte do resíduo ácido, lavagem com água e secagem com ar comprimido. A descontaminação das lâmpadas UV foi feita pela imersão das mesmas em HNO₃ 14,4 mol L⁻¹ e aquecimento em chapa durante 30 min a 120 °C. Após este período, as lâmpadas foram lavadas com água e secas com ar comprimido.

3.5 PROCEDIMENTOS DE DECOMPOSIÇÃO

Durante o desenvolvimento dos métodos de preparo de amostras, foram feitos ensaios de recuperação com adição de analito às amostras. Para isso, foram adicionados 100 µL de uma solução estoque contendo As (30 mg L⁻¹), Cd (10 mg L⁻¹), Co (100 mg L⁻¹), Hg (60 mg L⁻¹), Ni (400 mg L⁻¹), Pb (10 mg L⁻¹) e V (200 mg L⁻¹) diretamente sobre os comprimidos antes dos procedimentos de decomposição. A adição de solução de referência foi feita na concentração máxima permitida de cada elemento, em µg L⁻¹, considerando a massa de amostra (500 mg) e volume final dos digeridos (25 mL). A concentração dos elementos foi calculada de acordo com a Equação 1,⁵ utilizando a dosagem diária da amostra MET para este procedimento, uma vez que este medicamento possui a maior dosagem dentre os produtos avaliados (2,5 g dia⁻¹):

$$C = \frac{\text{EDP}}{\text{Dose diária do medicamento}} \quad (1)$$

Onde C é a concentração do elemento, em $\mu\text{g g}^{-1}$, EDP corresponde à exposição diária permitida do elemento, em $\mu\text{g dia}^{-1}$, e a dose diária do medicamento corresponde à quantidade máxima do mesmo, em g, que pode ser ingerida por dia.

3.5.1 Combustão iniciada por micro-ondas (MIC)

Para os procedimentos de decomposição por MIC, foram utilizados aproximadamente 500 mg de amostra, inseridos nos suportes de quartzo contendo um disco de papel filtro previamente umedecido com 50 μL de NH_4NO_3 6 mol L^{-1} . Após, os suportes foram inseridos nos frascos de quartzo contendo 6 mL de solução absorvedora, de acordo com a Figura 2.



Figura 2 – Comprimido de MET posicionado no suporte de quartzo dentro do frasco de mesmo material para decomposição por MIC.

Em seguida, os frascos foram fechados e fixados no rotor, prosseguindo-se com a pressurização dos mesmos com 20 bar de O_2 . Após o procedimento de pressurização, a capa de proteção foi posicionada e o rotor foi inserido na cavidade do forno de micro-ondas e o seguinte programa de irradiação foi aplicado: (i) 1400 W por 10 min, e (ii) 0 W por 20 min (etapa de resfriamento). Após o programa de aquecimento, o rotor foi retirado do forno de micro-ondas e a pressão interna dos frascos foi aliviada pela abertura da válvula posicionada na tampa do frasco. Os digeridos foram transferidos para frascos de polipropileno (50 mL) e diluídos a 25 mL com água. Para o desenvolvimento do método de decomposição por MIC, foram avaliados os seguintes parâmetros: composição da solução absorvedora, uso de auxiliares de combustão e tempo de refluxo. A exatidão do método foi avaliada através de ensaios de recuperação dos analitos, conforme citado no item 3.5.

3.5.1.1 Avaliação da solução absorvedora

Foram empregadas diferentes soluções absorvedoras com o intuito de melhorar a eficiência da recuperação das impurezas elementares das amostras de fármaco. A avaliação da solução absorvedora mais adequada para a absorção dos analitos foi feita levando-se em consideração os ensaios de recuperação com adição de padrão. Para isso, foram avaliadas soluções absorvedoras constituídas de HNO_3 (7 e 14,4 mol L^{-1}), misturas de HNO_3 14,4 mol L^{-1} , HCl 12 mol L^{-1} e H_2O (na proporção de 1+1+1), e misturas de HNO_3 14,4 mol L^{-1} e HCl 12 mol L^{-1} (nas proporções de 1+1, 1+3 e 3+1).

3.5.1.2 Uso de auxiliares de combustão

Visando melhorar a recuperação dos analitos em fármacos contendo excipientes inorgânicos, foi avaliada a utilização de NH_4Cl e celulose microcristalina como auxiliares de combustão. A avaliação dos auxiliares foi feita mantendo-se água régia invertida (HNO_3+HCl , 3+1) como solução absorvedora e um tempo de refluxo de 10 min. Os auxiliares de combustão foram inseridos tanto na forma de comprimidos embaixo do comprimido de MET (em sua forma original) no suporte de quartzo, como misturados à matriz da amostra, variando-se ambas a massa de MET e de auxiliar. Para os procedimentos em que houve a mistura do auxiliar à amostra, os comprimidos desta foram previamente moídos em almofariz de ágata, misturados com os auxiliares e prensados em prensa hidráulica a 3 ton por 1 min. Para a utilização do NH_4Cl , foram utilizadas as condições otimizadas por Corazza (2015),⁵⁶ sendo preparado um comprimido contendo 300 mg de MET e 300 mg de NH_4Cl . Além disso, foram feitos experimentos com comprimidos contendo 500 mg de amostra e 400 mg de NH_4Cl . Ademais, foi avaliado o posicionamento de um comprimido contendo 200 ou 400 mg de NH_4Cl abaixo do medicamento. Avaliações usando a celulose microcristalina foram feitas usando um comprimido contendo 200 mg de MET e 300 mg de celulose. Também foi avaliada a possibilidade de utilizar um comprimido contendo 300 mg de celulose abaixo do comprimido de MET sobre o suporte de quartzo.

3.5.1.3 Tempo de refluxo

O tempo de irradiação micro-ondas necessário para promover a lavagem das paredes internas dos frascos de quartzo e dos suportes foi avaliado. Inicialmente, foi utilizado um tempo de refluxo de 10 min, conforme estudado por Barin *et al.*¹⁸ Além disso, foi avaliado o tempo de refluxo de 5 min, normalmente empregado em procedimentos de MIC.²⁷

3.5.2 Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado (MAWD) com ácido diluído

Para os procedimentos de MAWD, cerca de 500 mg de amostra foram inseridos nos frascos de decomposição, seguido da adição de 6 mL de solução digestora (constituída por uma mistura de HNO₃ e H₂O₂). Após, os frascos foram fechados e fixados no rotor, o qual foi inserido na cavidade do forno de micro-ondas e submetido ao programa de irradiação. Após o término do programa, o rotor foi retirado do forno de micro-ondas e a pressão interna dos frascos foi liberada lentamente. Os digeridos foram transferidos para frascos de polipropileno com volume interno de 50 mL e diluídos a 25 mL com água.

Os parâmetros avaliados no desenvolvimento do método de MAWD foram: a concentração da solução digestora, o programa de irradiação, a concentração do reagente auxiliar e a utilização de resfriamento simultâneo na etapa de aquecimento. A eficiência de decomposição destes procedimentos foi avaliada pela determinação do carbono dissolvido nos digeridos. A acidez residual também foi avaliada, assim como os ensaios de recuperação dos analitos.

3.5.2.1 Concentração da solução digestora

Ácido nítrico nas concentrações de 1, 2, 3, 7 e 14,4 mol L⁻¹ dentro do frasco de decomposição foi avaliado como solução digestora. Para isso, foram utilizados 500 mg de amostra e 1 mL de H₂O₂ 50% como reagente auxiliar (exceto para a condição empregando HNO₃ 14,4 mol L⁻¹, na qual não foi adicionado auxiliar). Cabe destacar que o H₂O₂ foi adicionado mantendo-se o volume de 6 mL no interior do

frasco, sendo utilizado em conjunto com água para diluir o HNO_3 até as concentrações mencionadas.

3.5.2.2 Programa de irradiação

Foram avaliados dois programas de irradiação durante o desenvolvimento do método de MAWD. Inicialmente, foi avaliado o programa de irradiação adaptado de Bizzi *et al.*⁴⁴ para a decomposição de MET, o qual será referido como programa de irradiação 1 na Tabela 5. Posteriormente, foi avaliado um programa de irradiação mais longo para a amostra CANA, sendo utilizada uma rampa mais lenta, até 1000 W, (10 min) e também um tempo de permanência maior nesta potência (15 min). Ambos os programas de irradiação estão mostrados na Tabela 5, onde os tempos mais curtos se referem ao programa de irradiação 1 e os tempos mais longos, ao programa de irradiação 2.

Tabela 5 – Programas de irradiação para a decomposição das amostras por MAWD com ácido diluído.

Etapa	Potência (W)	Rampa (min)	Tempo (min)	Ventilação
<i>i</i>	1000	5 ou 10	10 ou 15	60 m ³ h ⁻¹
<i>ii</i>	0	-	20	125 m ³ h ⁻¹

Taxa de aumento de pressão: 0,5 bar s⁻¹, temperatura máx.: 280 °C, pressão máx.: 80 bar.

3.5.2.4 Resfriamento simultâneo durante a etapa de aquecimento

De modo a avaliar a eficiência de regeneração do ácido, dois tipos de ventilação foram avaliados durante o procedimento de decomposição.⁴⁴ Inicialmente, avaliou-se a utilização de uma vazão de ar de 60 m³ h⁻¹ (FAN 1), convencionalmente empregado em decomposições por MAWD. Posteriormente, avaliou-se também a circulação forçada de ar com vazão de 125 m³ h⁻¹ (FAN 2). Para isso, foram decompostos 500 mg de amostra usando 6 mL de solução contendo HNO_3 2 mol L⁻¹ (diluído *in situ* a partir de HNO_3 14,4 mol L⁻¹ com água e 1 mL de H_2O_2 50%), sendo usado o programa de irradiação 1.

3.5.2.3 Concentração do reagente auxiliar

A utilização de H_2O_2 como reagente auxiliar foi avaliada nas condições em que se utilizou ácido diluído, devido à possibilidade deste reagente atuar como fonte de O_2 no meio reacional, o qual, por sua vez, proporciona a regeneração do HNO_3 presente.³⁶ Foi avaliada a adição de 1 ou 2 mL de H_2O_2 50% (equivalendo a teores de 8,3 e 16,7%, respectivamente, no frasco de decomposição) para a decomposição de 500 mg de amostra, sendo importante destacar que a concentração de ácido e volume final de solução não foram alterados, uma vez que as diluições do HNO_3 foram feitas considerando o volume de H_2O_2 e água utilizados. A concentração do reagente auxiliar foi otimizada utilizando o programa de irradiação 1 e fixando-se a concentração de HNO_3 em 2 mol L^{-1} .

3.5.3 Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta (MAWD-UV)

Para a decomposição por MAWD-UV, os comprimidos de fármaco (500 mg) foram inseridos nos frascos de quartzo contendo o dispositivo inferior de PTFE e 10 mL de solução digestora. Após, os espaçadores de PTFE foram posicionados na parte superior das lâmpadas de emissão UV, as quais foram inseridas nos frascos com o auxílio de uma haste de quartzo. Foram utilizados 10 mL de solução digestora para todos os procedimentos de MAWD-UV, de modo a aumentar o contato com o bulbo da lâmpada de emissão UV e maximizar os efeitos da radiação. Após, os frascos foram fechados, fixados no rotor e inseridos na cavidade do forno de micro-ondas.

O programa de irradiação usado nas decomposições por MAWD-UV foi adaptado a partir do programa de irradiação 2 (uma vez que o fabricante recomenda rampas de aquecimento 10 a 15 min)⁵⁷ e está mostrado na Tabela 6. A vazão ar foi mantido em $125 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ durante todo o procedimento de decomposição de modo a manter a potência de irradiação constante durante mais tempo, intensificando a emissão de radiação UV pelas lâmpadas (tendo em vista que a intensidade de emissão é dependente da potência aplicada).^{46,54} Além disso, a temperatura máxima foi limitada a $250 \text{ }^\circ\text{C}$ para evitar possíveis danos por superaquecimento aos

constituintes de PTFE. Após o término do programa de irradiação, os digeridos foram recolhidos em frascos de polipropileno (50 mL) e o volume foi completado para 25 mL com água. Para as decomposições por MAWD-UV, foi avaliada a composição da solução digestora e a concentração do reagente auxiliar. A exatidão do método foi avaliada por ensaios de recuperação dos analitos e pela decomposição de CRMs botânicos e biológicos misturados ao medicamento (escolhido aleatoriamente). Além disso, a adequabilidade dos digeridos provenientes das decomposições por MAWD-UV com o equipamento de ICP-OES foi avaliada através da determinação da concentração de carbono dissolvido e do teor de acidez residual.

Tabela 6 – Programa de irradiação utilizado nas decomposições por MAWD-UV.

Etapa	Potência (W)	Rampa (min)	Tempo (min)	Ventilação
<i>i</i>	1000	10	15	125 m ³ h ⁻¹
<i>ii</i>	0	-	20	125 m ³ h ⁻¹

Taxa de aumento de pressão: 0,5 bar s⁻¹, temperatura máx: 250 °C, pressão máx: 80 bar

3.5.3.1 Avaliação dos parâmetros experimentais

Para a avaliação da MAWD-UV, foram feitos procedimentos utilizando as condições de decomposição em que não se foi observada a decomposição completa das amostras utilizando apenas a MAWD. Deste modo, inicialmente foi avaliada a decomposição de 500 mg da amostra MET usando HNO₃ 1 mol L⁻¹. Também foi feita a avaliação da influência da concentração de H₂O₂ na decomposição por MAWD-UV, sendo avaliada a adição de 1,6 ou 3,2 mL de H₂O₂ 50% (mesma concentração final obtida na MAWD, de 8,3 e 16,7%) em conjunto com HNO₃ 1 mol L⁻¹ (o qual foi diluído *in situ* a partir de HNO₃ 14,4 mol L⁻¹ com água e H₂O₂ 50%). A melhor condição foi selecionada comparando-se os resultados de carbono dissolvido e acidez residual.

3.6 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DAS DECOMPOSIÇÕES

3.6.1 Determinação da concentração de carbono dissolvido

A concentração de carbono dissolvido nos digeridos após os procedimentos de decomposição foi determinado utilizando um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, sendo monitorada a linha de emissão em 193,030 nm para C. Ítrio foi adicionado às amostras e padrões em uma concentração final de 1 mg L⁻¹, sendo utilizado como padrão interno nas determinações (linha de emissão em 371,029 nm). Previamente às decomposições, as alíquotas das amostras e padrões foram purgadas durante 2 min com argônio de modo a remover o CO₂ dissolvido.⁴⁵

3.6.2 Determinação da acidez residual

A acidez remanescente nos digeridos após os procedimentos de decomposição por MAWD e MAWD-UV foi determinada por titulação potenciométrica em meio aquoso. Para esta análise, foram utilizados até 3 g de digerido, os quais foram adicionados a frascos de vidro contendo 20 mL de água. Após, as amostras foram tituladas em titulador automático, sob agitação magnética, usando uma solução de KOH 0,1 mol L⁻¹ previamente padronizada como titulante. Esse parâmetro foi determinado de modo a quantificar o ácido consumido durante a oxidação da matriz orgânica das amostras.

3.7 RESUMO DOS PROCEDIMENTOS

Neste trabalho, métodos de preparo de amostras foram avaliados e otimizados visando a aplicação de condições brandas de decomposição e a recuperação quantitativa de impurezas elementares em amostras de medicamentos de uso oral aplicados no tratamento da diabetes tipo 2. O fluxograma mostrado na Figura 3 apresenta, de forma resumida, os parâmetros avaliados e descritos nesta seção.

MEDICAMENTOS DE USO ORAL PARA DIABETES TIPO 2

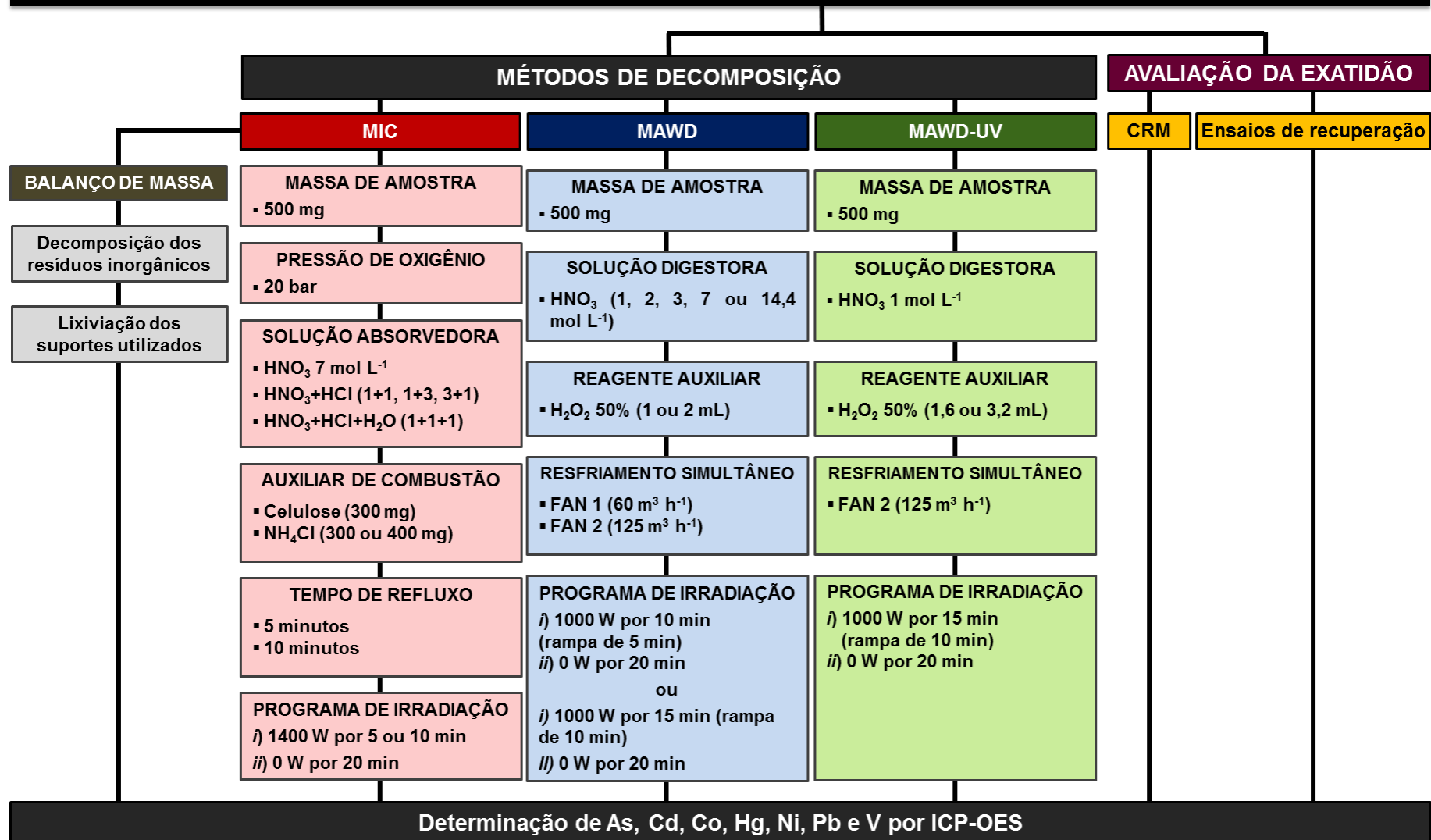


Figura 3 – Fluxograma dos procedimentos experimentais desenvolvidos neste trabalho.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

*Neste capítulo, serão apresentados e discutidos os resultados obtidos nas avaliações e otimizações de diferentes parâmetros empregados nos métodos de MIC, MAWD e MAWD-UV visando à determinação de impurezas elementares das classes 1 e 2A em medicamentos de via oral empregados no controle da diabetes tipo 2. Para o desenvolvimento do método de MIC, foram avaliadas diferentes soluções absorvedoras, auxiliares de combustão e tempos de irradiação. Para os métodos de MAWD e MAWD-UV, foram avaliadas diferentes concentrações de HNO_3 e H_2O_2 como solução digestora e reagente auxiliar, respectivamente, além de diferentes programas de irradiação e a possibilidade de se aplicar resfriamento simultâneo durante o processo de decomposição. A seleção das melhores condições foi feita com base em ensaios de recuperação dos analitos e na determinação do teor de carbono dissolvido e acidez residual nos digeridos, utilizando o teste *t* de student ou ANOVA (com nível de confiança de 95%).*

4.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS RELACIONADOS À DECOMPOSIÇÃO POR MIC

4.1.1 Avaliação inicial do método de MIC para decomposição de fármacos

Inicialmente, foi aplicado o método proposto por Barin *et al.*,¹⁸ o qual utilizou a MIC como método de decomposição para a posterior determinação de elementos da classe 1 de acordo com o ICH (As, Cd, Hg e Pb) em fármacos tricíclicos. Assim, cerca de 600 mg (1 comprimido) da amostra MET foram decompostos utilizando 6 mL de HNO₃ 7 mol L⁻¹ como solução absorvedora. O programa de irradiação usado consistiu em 10 min de irradiação a 1400 W, seguidos de 20 min a 0 W (etapa de resfriamento). Conforme comentado anteriormente (item 3.5), foram feitos ensaios de recuperação com adição de analito para o desenvolvimento dos métodos de decomposição. Estes ensaios foram utilizados para avaliar a exatidão do método de MIC. A adição foi feita diretamente sobre os comprimidos antes da MIC, de modo que o digerido final apresentasse as impurezas elementares em seus respectivos limites máximos de exposição. Na Figura 4 estão apresentados os resultados para o ensaio de recuperação dos analitos após a MIC de 600 mg de MET utilizando HNO₃ 7 mol L⁻¹ como solução absorvedora.

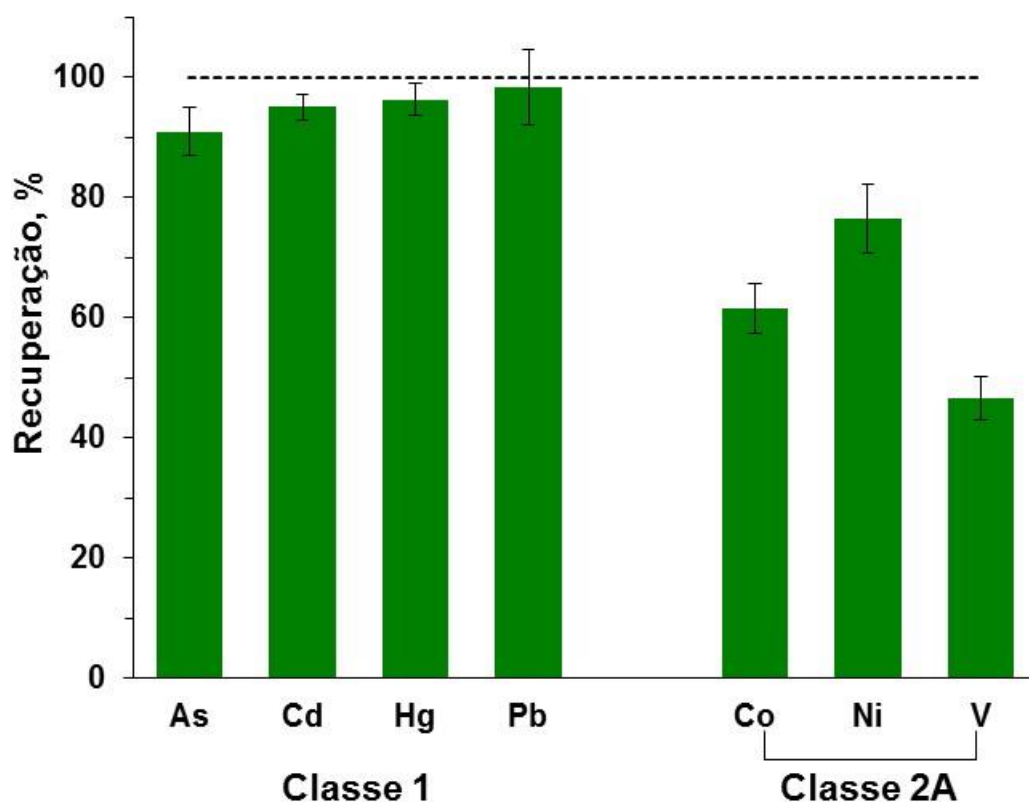


Figura 4 – Recuperação dos analitos para a decomposição da amostra MET por MIC usando HNO_3 7 mol L^{-1} como solução absorvedora e 10 min de refluxo. A linha tracejada representa recuperação equivalente a 100%.

Observou-se que, para os elementos estudados por Barin *et al.*¹⁸ (As, Cd, Hg e Pb) foram obtidas recuperações entre 92 e 104%, atestando a eficiência do método para a quantificação dos elementos da classe 1. Entretanto, foram observadas recuperações abaixo de 70% para os elementos da classe 2A (Co, Ni e V), sendo que para V a recuperação foi de apenas 40%. De acordo com o capítulo 232 da Farmacopeia Americana,³⁸ são consideradas aceitáveis as recuperações entre 70 e 150% em ensaios de recuperação para determinação de impurezas elementares em fármacos. Desta forma, a recuperação dos elementos da classe 2A foi ineficiente por este método. Cabe destacar que, após o procedimento de MIC, foi observada a presença de um resíduo sólido com cerca de 15 mg sobre o suporte de quartzo (Figura 5). Como os elementos Co, Ni e V tendem a formar óxidos em atmosfera oxidante sob aquecimento,⁵⁸⁻⁶⁰ é possível que, durante a combustão, os óxidos destes analitos tenham se formado e aderido ao resíduo sólido. Para confirmar esta hipótese, foi feita a decomposição do resíduo de combustão utilizando

um bloco digestor. Além disso, foi feita uma lixiviação ácida dos suportes usados na combustão, a fim de avaliar a possibilidade de ter havido retenção dos analitos no suporte de quartzo.



Figura 5 – Resíduo sólido sobre suporte de quartzo após procedimento de MIC para amostra MET usando HNO_3 7 mol L^{-1} como solução absorvedora e 10 min de refluxo.

O procedimento de decomposição dos resíduos sólidos provenientes da MIC foi adaptado do método descrito por Corazza (2015),⁵⁶ utilizado na decomposição de sólidos residuais após MIC de carvão. Os resíduos de combustão da amostra MET foram inseridos em frascos de PTFE, contendo 5 mL de HNO_3 $14,4 \text{ mol L}^{-1}$, os quais foram fechados e aquecidos a $150 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 h em bloco digestor. Após, a solução foi evaporada quase completamente e adicionou-se 3 mL de HF 23 mol L^{-1} . A mistura foi então novamente aquecida a $150 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 h, sendo posteriormente evaporada sem quase completamente. Após, foram adicionados 10 mL de H_2O e 1 mL de HNO_3 $14,4 \text{ mol L}^{-1}$, aquecendo-se os frascos a $130 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 h. Ao término do procedimento, a solução resultante foi recolhida em frascos de polipropileno (50 mL) e avolumada a 25 mL para posterior determinação dos analitos por ICP-OES. Além disso, foi feita a lixiviação ácida dos suportes de quartzo utilizando HNO_3 $14,4 \text{ mol L}^{-1}$ sob irradiação micro-ondas (1200 W por 10 min). A solução resultante foi recolhida em frascos de polipropileno (50 mL) e avolumada a 25 mL com água a fim de determinar os analitos lixiviados por ICP-OES. O somatório das recuperações levando em

consideração a lixiviação dos suportes e a decomposição dos resíduos sólidos pode ser observado na Figura 6.

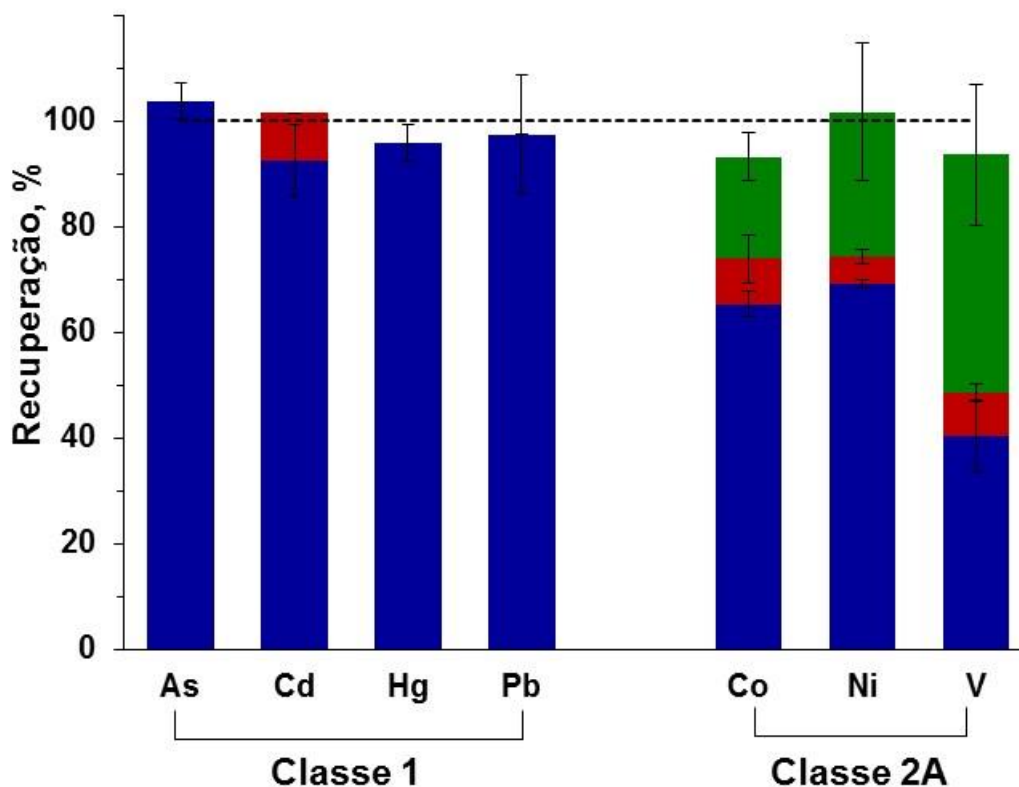


Figura 6 – Recuperação dos analitos para a decomposição da amostra MET por MIC (■), considerando as recuperações após a lixiviação dos suportes (■) e a decomposição dos resíduos sólidos (■). A linha tracejada representa recuperação equivalente a 100%.

É possível verificar que, somando-se os valores obtidos nos 3 procedimentos, foram obtidas recuperações entre 90 e 104% para todos os analitos. Cabe destacar que uma concentração considerável de Co, Ni e V estava presente na fração inorgânica remanescente após a combustão, confirmando a hipótese sugerida. Deste modo, alguns parâmetros foram avaliados visando proporcionar recuperações quantitativas de todos os analitos utilizando o método de MIC.

4.1.2 Avaliação do tempo de refluxo

A influência do tempo de refluxo na recuperação dos analitos foi avaliada utilizando 5 ou 10 min nesta etapa do programa de irradiação. Para isto, foi utilizado

HNO₃ 7 mol L⁻¹ como solução absorvedora, a fim de se fazer uma comparação com o método desenvolvido por Barin et al.¹⁸ As recuperações dos analitos em ambos os procedimentos estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 – Recuperação dos analitos em função do tempo de refluxo do procedimento de MIC, usando HNO₃ 7 mol L⁻¹ como solução absorvedora (valores em %, média ± desvio padrão, n = 3).

Tempo de refluxo	Analito						
	As	Cd	Co	Hg	Ni	Pb	V
5 min	101 ± 6	92,4 ± 6,2	65,5 ± 5,5	95,7 ± 5,1	69,2 ± 9,9	97,4 ± 5,3	40,4 ± 4,5
10 min	91,0 ± 4,0	95,0 ± 2,1	61,5 ± 4,2	96,3 ± 2,7	76,5 ± 5,7	98,3 ± 6,4	46,6 ± 3,7

De acordo com os resultados mostrados na Tabela 7, não houve diferença significativa entre os tempos de refluxo de 5 e 10 min (teste t de *student*). Entretanto, é possível observar que um maior tempo de refluxo possibilitou a recuperação dos analitos com um desvio padrão menor. Assim, o tempo de 10 min foi mantido para a avaliação dos demais parâmetros do método.

4.1.3 Avaliação da solução absorvedora

Uma vez que não foram obtidas recuperações quantitativas para todos os analitos utilizando o método de referência (HNO₃ 7 mol L⁻¹), foram avaliadas diferentes soluções absorvedoras buscando melhorar a eficiência do método. Em estudos anteriores utilizando MIC para a decomposição de amostras inorgânicas para a posterior determinação de impurezas elementares, é relatado o uso de misturas de HNO₃ e HCl para a recuperação de As, Cd, Hg e Pb.^{34,56,61} Desta forma, além de HNO₃ 7 mol L⁻¹, foram avaliadas a mistura HNO₃+HCl+H₂O (1+1+1) e misturas dos ácidos HNO₃+HCl concentrados (3+1, 1+3 e 1+1) como solução absorvedora do método de MIC, mantendo-se um volume de 6 mL de solução. O tempo de refluxo foi mantido em 10 min para estes experimentos. Na Figura 7 estão expostas as recuperações obtidas usando as diferentes soluções absorvedoras.

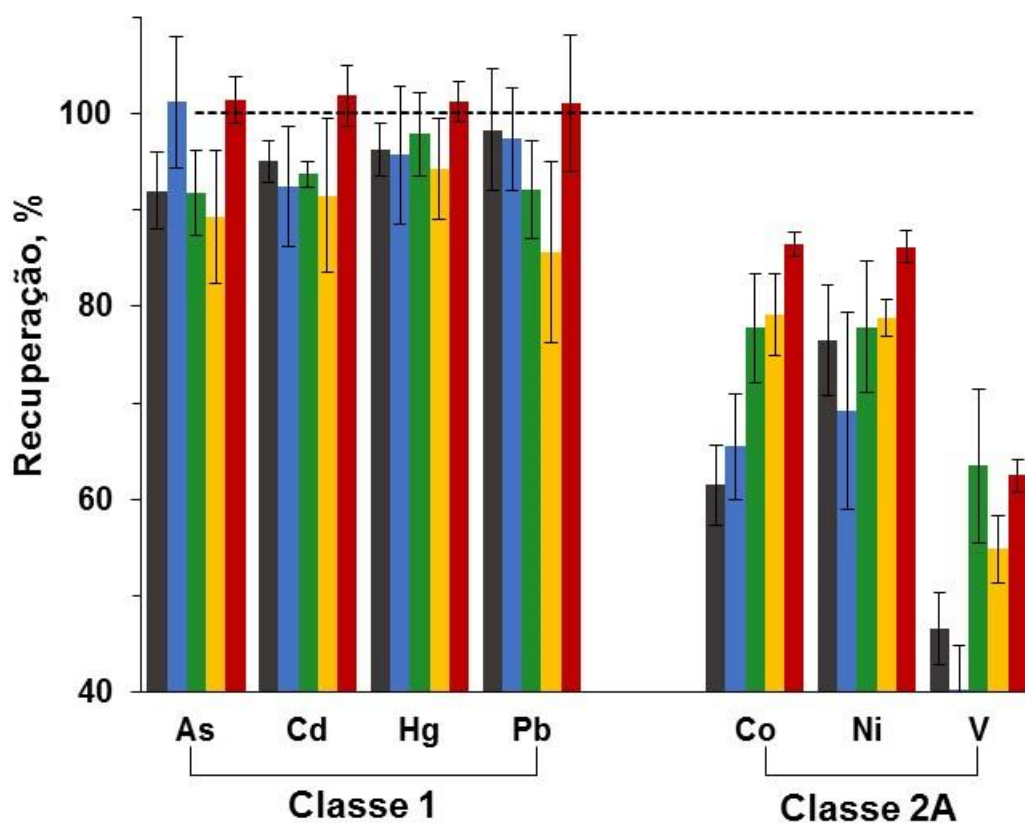


Figura 7 – Recuperação dos analitos após procedimento de MIC com diferentes soluções absorvedoras usando 10 min de refluxo e volume de 6 mL: HNO₃ 7 mol L⁻¹ (■); HNO₃+HCl (1+1) (■); HNO₃+HCl+H₂O (1+1+1) (■); HNO₃+HCl (3+1) (■); e HNO₃+HCl (1+3) (■). A linha tracejada representa recuperação equivalente a 100%.

Aplicando a análise de variância ANOVA, observou-se que as recuperações de Co e V foram significativamente inferiores nas condições em que se usou HNO₃ 7 mol L⁻¹ e HNO₃+HCl (1+1) como solução absorvedora. Para os demais analitos, não foi observada diferença estatística entre as condições avaliadas. Entretanto, é possível observar que o uso de água régia (HNO₃+HCl, 1+3) proporcionou recuperações mais elevadas com um desvio padrão menor, o que pode ser devido à maior eficiência na lixiviação dos elementos durante a etapa de refluxo. Além disso, a adição de HCl pode ter solubilizado uma fração dos óxidos formados durante a combustão. Entretanto, mesmo quando água régia foi utilizada como solução absorvedora, as recuperações para V permaneceram abaixo de 70%. Assim, foi

avaliada a possibilidade de adição de auxiliares de combustão à amostra, com o intuito de melhorar a recuperação para os elementos da classe 2A.

4.1.4 Avaliação de auxiliares de combustão

Quando a temperatura atingida no processo de combustão da amostra não é suficientemente elevada para causar a volatilização dos analitos da matriz, existe a possibilidade de se adicionar aditivos, de modo a aumentar a temperatura de combustão (celulose) ou evitar a formação de espécies refratárias, como óxidos, durante a queima (NH_4Cl).^{39,62} Em um estudo desenvolvido por Picoloto *et al.* (2012),⁶³ 300 mg de amostra foram misturados a 300 mg de celulose microcristalina para a volatilização de Hg de amostras de solo. Mais recentemente, foi feita a aplicação deste método para a volatilização de As, Cd, Hg e Pb, também em amostras de solo.⁶¹ Quanto à utilização do cloreto de amônio como auxiliar de combustão, um estudo desenvolvido por Mello *et al.* (2015)⁶² abordou a utilização de NH_4Cl na proporção de 1:1 com amostra para a recuperação de Cr em resíduos de equipamentos elétricos e eletrônicos (nos quais a espécie prevalente de Cr era Cr_2O_3). A adição de NH_4Cl também foi abordada por Corazza (2015)⁵⁶ para a recuperação de As, Cd, Hg, Pb e S em amostras de carvão. Neste estudo, foram misturados 500 mg de carvão a 300 mg do aditivo.

Com base nestas informações, NH_4Cl e celulose microcristalina foram avaliados como possíveis auxiliares de combustão na decomposição da amostra MET. Como foi observado o aumento de pressão em taxas maiores do que $0,8 \text{ bar s}^{-1}$ durante a etapa de refluxo nos experimentos usando água régia (gerando picos de pressão, possivelmente devido à geração de Cl_2 , e comprometendo a segurança do método), optou-se por utilizar água régia invertida para as avaliações usando NH_4Cl . Para os procedimentos utilizando celulose microcristalina, água régia invertida ou água régia foram usadas como solução absorvedora. Conforme descrito no item 3.5.1.2, a adição de NH_4Cl foi avaliada na forma de um comprimido contendo 200 ou 400 mg de NH_4Cl , posicionado abaixo do medicamento, também sendo avaliada a sua adição misturada diretamente com a amostra (comprimido contendo 300 ou 500 mg de MET e 300 ou 400 mg de NH_4Cl). Para a avaliação da celulose microcristalina, foram preparados comprimidos contendo 200 mg de MET e

300 mg de celulose, também sendo avaliada a sua adição na forma de comprimidos de 300 mg posicionados abaixo da amostra. Para as avaliações usando celulose, também foi avaliada a utilização de água régia como solução absorvedora. Para ambos os auxiliares de combustão avaliados, o tempo de refluxo foi mantido em 10 min. Os resultados referentes a esses experimentos estão expressos na Figura 8.

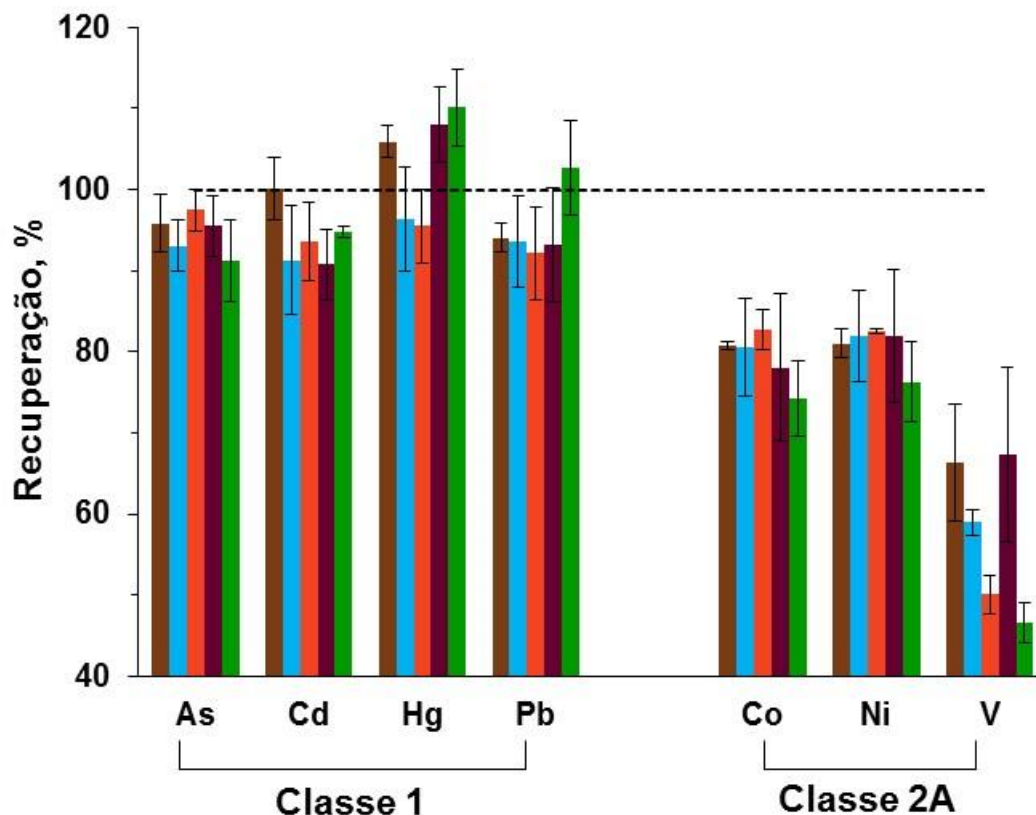


Figura 8 – Recuperação dos analitos após procedimento de MIC com diferentes auxiliares de combustão usando 10 min de refluxo e 6 mL de HNO₃+HCl (1+3) ou HNO₃+HCl (3+1) como solução absorvedora: comprimido de 400 mg de NH₄Cl, HNO₃+HCl (3+1) (■); comprimido contendo 500 mg de MET e 400 mg de NH₄Cl, HNO₃+HCl (3+1) (■); comprimido contendo 300 mg de MET e 300 mg de NH₄Cl, HNO₃+HCl (3+1) (■); comprimido contendo 200 mg de MET e 300 mg de celulose microcristalina, HNO₃+HCl (3+1) (■); comprimido contendo 200 mg de MET e 300 mg de celulose microcristalina, HNO₃+HCl (1+3) (■). A linha tracejada representa recuperação equivalente a 100%.

Com base nos resultados apresentados na Figura 8, é possível verificar que não houve diferença significativa nas recuperações de As, Cd, Co, Ni e Pb entre as

condições avaliadas (ANOVA). Para a recuperação de Hg, o resultado obtido usando o comprimido contendo 200 mg de MET e 300 mg de celulose (solução absorvedora água régia) foi significativamente superior (ANOVA) aos obtidos usando comprimidos contendo 500 mg de MET e 400 mg de NH_4Cl ou 300 mg de MET e 300 mg de NH_4Cl (solução absorvedora água régia invertida). Entretanto, todas as condições avaliadas levaram a recuperações quantitativas para este elemento. Para V, as condições em que se utilizou água régia invertida como solução absorvedora e um comprimido de NH_4Cl (400 mg) posicionado sob a amostra, ou um comprimido contendo 200 mg de MET e 300 mg de celulose, levaram a recuperações significativamente superiores às demais (ANOVA). Porém, apesar da utilização de reagentes concentrados aliados à adição de NH_4Cl ou celulose microcristalina como aditivos, as recuperações para V ainda foram inferiores aos limites estabelecidos pelo capítulo 233 da farmacopeia americana.³⁸ As recuperações para os demais elementos (As, Cd, Co, Hg, Ni e Pb) foram quantitativas considerando os limites estabelecidos pela farmacopeia americana.³⁸ Entretanto, cabe destacar que as recuperações para todos os elementos da classe 2A foram inferiores a 90%.

Visando confirmar que as recuperações inferiores para os elementos da classe 2A devem-se à presença de excipientes inorgânicos na amostra, foi feita a combustão de um comprimido contendo apenas 500 mg do princípio ativo cloridrato de metformina e 100 mg de celulose microcristalina usando HNO_3 7 mol L^{-1} como solução absorvedora e refluxo de 10 min. Após o procedimento de MIC para o medicamento simulado (sem nenhum componente inorgânico), foram obtidas recuperações entre 91 e 97% para todos os analitos, como era esperado.

Uma vez que a composição dos comprimidos para as demais amostras apresenta grande variação quanto à presença e tipos de excipientes inorgânicos, estas também foram decompostas por MIC usando HNO_3 7 mol L^{-1} e refluxo de 10 min. Os resultados dos ensaios de recuperação com adição de analito para as amostras de medicamento estão expostos na Tabela 8.

Tabela 8 – Recuperação os analitos após decomposição das amostras de medicamentos, usando HNO_3 7 mol L^{-1} como solução absorvedora e refluxo de 10 min (valores em %, média \pm desvio padrão, n = 3).

Amostra	Analito						
	As	Cd	Co	Hg	Ni	Pb	V
CANA	80,7 \pm 0,4	91,5 \pm 0,8	68,1 \pm 3,8	86,2 \pm 1,0	69,1 \pm 4,9	72,4 \pm 1,5	28,6 \pm 1,2
GLIB	94,2 \pm 2,0	102 \pm 1	102 \pm 1	101 \pm 1	103 \pm 1	94,8 \pm 3,4	92,3 \pm 3,3
MET	90,0 \pm 2,3	95,0 \pm 2,1	66,2 \pm 8,4	95,2 \pm 4,1	76,5 \pm 5,7	98,3 \pm 6,3	46,6 \pm 1,4
PIO	92,9 \pm 0,2	97,8 \pm 3,0	93,9 \pm 3,8	103 \pm 2	93,6 \pm 4,8	105 \pm 5	99,4 \pm 6,2
REPA	45,3 \pm 0,6	78,9 \pm 2,2	44,8 \pm 4,1	88,1 \pm 2,4	45,2 \pm 2,2	67,8 \pm 1,3	47,2 \pm 3,8
SITA	89,3 \pm 2,0	58,0 \pm 5,2	38,2 \pm 9,7	89,2 \pm 1,3	37,7 \pm 9,4	40,4 \pm 14,1	29,4 \pm 9,1

Com base nos resultados expressos na Tabela 8, pode-se observar que a recuperação quantitativa de todos os elementos é possível apenas em amostras que não apresentam excipientes inorgânicos (GLIB e PIO). Para a amostra MET, que apresentou cerca de 15 mg de resíduos sólidos após a MIC, foi possível a recuperação dos elementos da classe 1 (As, Cd, Hg e Pb) e de Ni utilizando ácido diluído. Para a amostra CANA, foram obtidas recuperações aceitáveis (entre 72% e 91,5%) para As, Cd, Hg e Pb. Já as amostras REPA e SITA apresentaram resíduos sólidos em quantidades muito superiores (cerca de 100 e 130 mg, respectivamente), não sendo observadas recuperações acima de 89% para nenhum dos analitos. Dentre os elementos determinados, Hg foi o único analito com recuperações aceitáveis (entre 86,2% e 103%) em todas as amostras. Quando considerados os elementos mais voláteis (As, Cd, Hg e Pb), estes resultados estão de acordo com o esperado para amostras com grande fração inorgânica, devido a possíveis efeitos de resfriamento causados pelo material não combustível.^{56,61,63}

Os comprimidos de medicamento e os resíduos sólidos gerados após a decomposição por MIC foram analisados por EDS visando a elucidação do que pode ter influenciado a baixa eficiência de recuperação dos analitos (Figura 10). É importante mencionar que os resíduos inorgânicos provenientes da MIC da amostra CANA ficaram aderidos aos suportes de quartzo de maneira irreversível, causando danos ao equipamento. Desta forma, não foi possível assim efetuar uma análise mais detalhada destes. O aspecto dos resíduos sólidos recolhidos após o procedimento de MIC está mostrado na Figura 9.



Figura 9 – Resíduos sólidos provenientes da combustão iniciada por micro-ondas das amostras: A) MET; B) REPA e C) SITA.

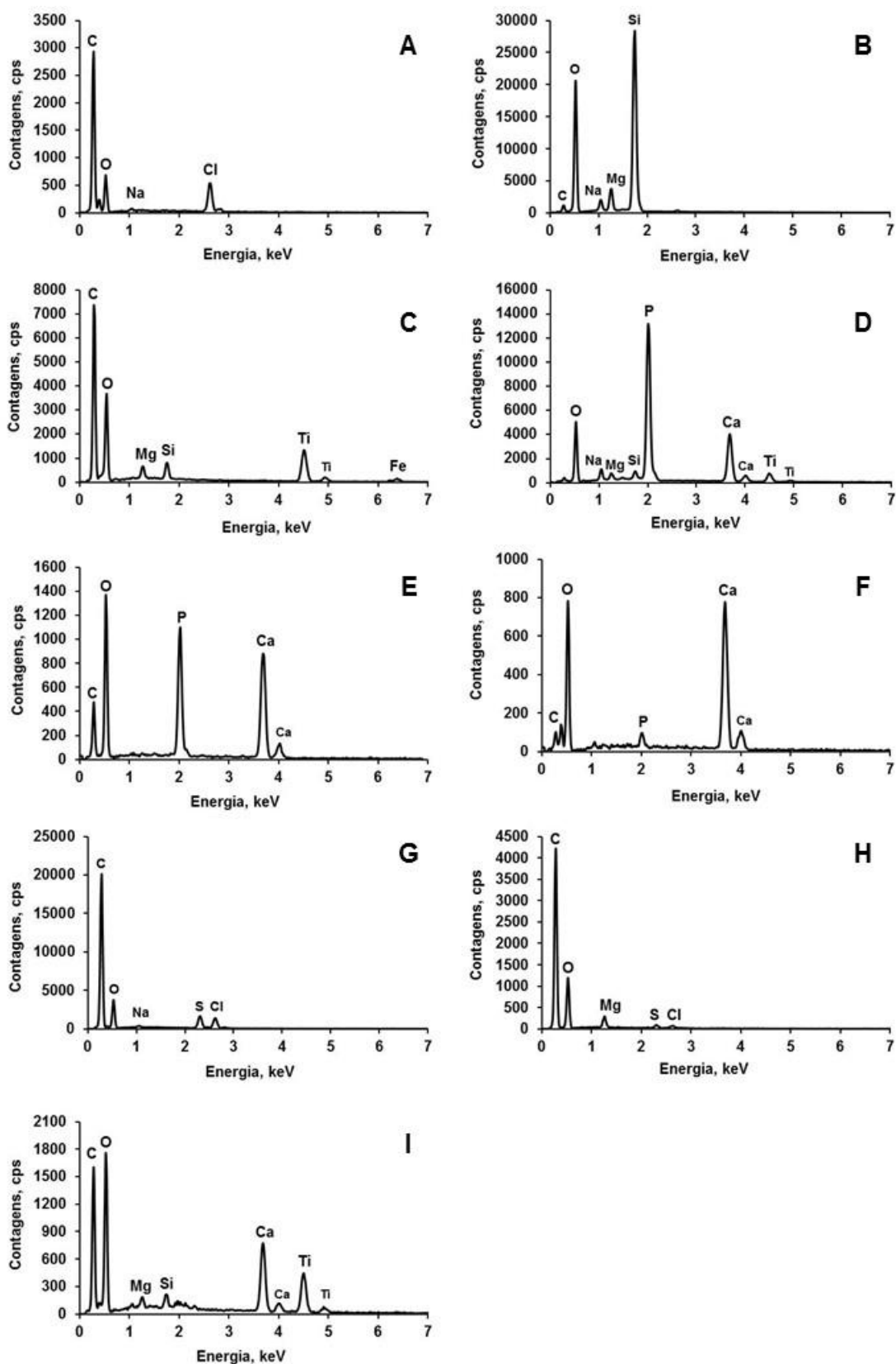


Figura 10 – Espectros de raios-X das amostras e dos resíduos sólidos provenientes da MIC. A) MET; B) MET, resíduo sólido; C) SITA; D) SITA, resíduo sólido, E) REPA; F) REPA, resíduo sólido; G) PIO; H) GLIB e I) CANA.

Como era esperado para as amostras contendo excipientes inorgânicos, os elementos constituintes ou ligados à fração orgânica não são observados (ou ocorre uma redução drástica na intensidade do sinal) no espectro do resíduo sólido. Conforme pode ser observado na Figura 10B, o resíduo sólido proveniente da decomposição da amostra MET por MIC é composto majoritariamente por SiO_2 , único excipiente inorgânico presente na amostra. Também são observados os elementos Mg e Na, provenientes do estearato de magnésio e amidoglicolato de sódio usados como excipientes. Possivelmente, estes elementos tenham ficado adsorvidos ao SiO_2 na forma de óxidos. O resíduo sólido proveniente da MIC da amostra REPA (Figura 10F) apresentou Ca como principal componente, devido à presença de $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e CaCO_3 . Para a amostra SITA (Figura 10D), foi observado que os componentes majoritários do resíduo sólido são Ca (proveniente de CaHPO_4) e PO_4^{3-} (proveniente de CaHPO_4 e do fosfato de sitagliptina). A presença de TiO_2 também pode ser observada para esta amostra.

Por fim, observou-se que os resíduos sólidos provenientes das decomposições das amostras com fração inorgânica são constituídos majoritariamente de óxidos, ou fosfato, no caso da amostra SITA. Além disso, a partir da análise morfológica das amostras, observou-se que os resíduos sólidos apresentaram superfície altamente porosa, o que não foi observado para os comprimidos previamente à sua decomposição. Ambos estes fatores parecem contribuir para a retenção dos analitos à matriz, podendo ter ocorrido a formação de óxidos dos elementos menos voláteis, causando sua resistência à lixiviação mesmo quando foram usados reagentes concentrados.

4.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS RELACIONADOS À DECOMPOSIÇÃO POR MAWD

Os seguintes parâmetros foram avaliados na otimização do método de decomposição por MAWD: concentração final da solução digestora (HNO_3 1, 2, 3 e $14,4 \text{ mol L}^{-1}$), programa de irradiação (15 e 25 min), reagente auxiliar de digestão (1 e 2 mL de H_2O_2 50%) e resfriamento simultâneo durante a etapa de aquecimento (60 e $125 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$). Cabe destacar que a adição de H_2O_2 foi feita de modo a não alterar a concentração final de HNO_3 . A avaliação da eficiência do método de MAWD com

base nos parâmetros avaliados foi feita pela comparação dos resultados de concentração de carbono dissolvido. O teor de acidez residual nos digeridos também foi determinado de modo a investigar a eficiência de regeneração do ácido no meio reacional.

4.2.1 Avaliação da solução digestora

Para a decomposição por MAWD dos medicamentos usados no controle da diabetes tipo 2, HNO_3 nas concentrações de 1, 2, 3 e 14,4 mol L^{-1} foi avaliado como solução digestora. A avaliação da utilização de HNO_3 diluído foi feita com o intuito de minimizar o consumo de reagentes e, ao mesmo tempo, minimizar os riscos associados ao uso de reagentes concentrados, uma vez que ácidos diluídos acabam sendo menos corrosivos. Além disso, o objetivo desta avaliação foi manter a eficiência das decomposições, obtendo digeridos com baixos teores de carbono dissolvido e acidez residual. Para isso, peróxido de hidrogênio foi utilizado em conjunto com o HNO_3 , como reagente auxiliar, devido à sua capacidade de regenerar o ácido no meio reacional.⁸

Inicialmente, foi feita uma decomposição da amostra MET usando HNO_3 14,4 mol L^{-1} como solução digestora a fim de se estabelecer um resultado de referência para a concentração de carbono dissolvido e teor de acidez residual para as demais avaliações. Após, foram feitas as decomposições empregando HNO_3 diluído e 1 mL de H_2O_2 50% como reagente auxiliar. O programa de irradiação usado nestes experimentos foi o programa de irradiação 1 (rampa de aquecimento de 5 min até 1000 W e permanência de 10 min, seguido de uma etapa de resfriamento de 20 min a 0 W). Na Figura 11 estão apresentados o aspecto, a concentração de carbono e o teor de acidez residual nos digeridos finais após os procedimentos de MAWD usando HNO_3 de 1 a 14,4 mol L^{-1} .

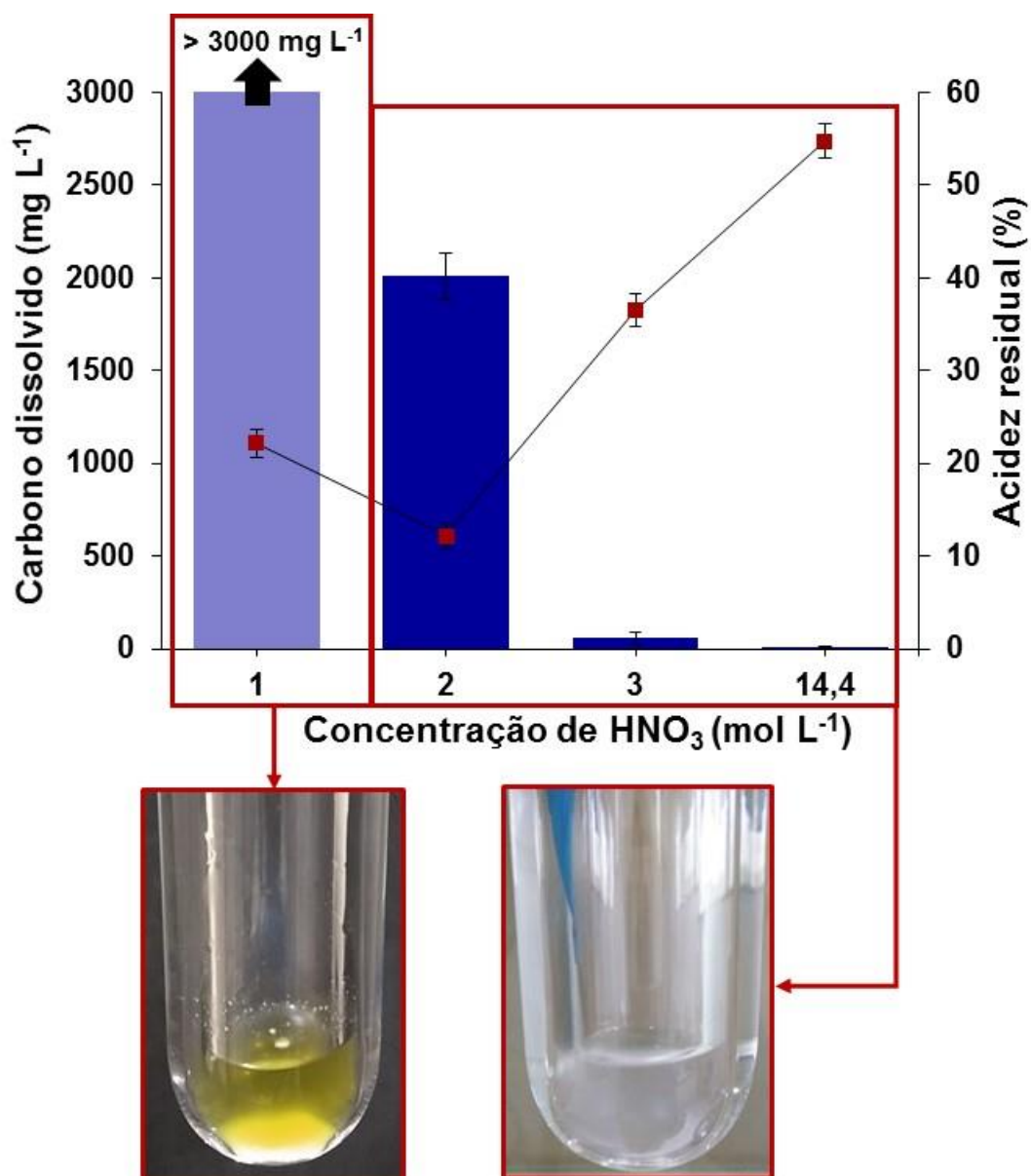


Figura 11 – Concentração de carbono dissolvido (■), acidez residual (■) e aspecto dos digeridos finais para diferentes concentrações de HNO₃ usadas na decomposição de MET por MAWD. 1 mL de H₂O₂ 50% foi usado como reagente auxiliar para as condições em que se usou HNO₃ diluído. As barras representam a média com seu respectivo desvio padrão (n=3). *A barra mais clara indica a decomposição incompleta.

Quando a decomposição da amostra MET foi feita utilizando HNO₃ nas concentrações de 2, 3 e 14,4 mol L⁻¹, foram obtidos digeridos finais com aspecto límpido. Entretanto, a decomposição com HNO₃ 1 mol L⁻¹ foi incompleta, resultando em um digerido de coloração amarelada e com a presença de sólidos residuais

provenientes da amostra não decomposta (Figura 11). Cabe ressaltar que, em todos os digeridos, foi possível observar a presença de um sólido branco insolúvel, referente ao SiO_2 utilizado como excipiente na amostra MET. O teor de acidez residual também foi determinado durante as avaliações da MAWD empregando diferentes concentrações de HNO_3 . Como pode ser observado, a decomposição com ácido concentrado resultou em uma acidez residual elevada ($54,8 \pm 1,9\%$), uma vez que havia um excesso de ácido para reagir com a amostra. Quando foi utilizado HNO_3 3 mol L^{-1} , a acidez residual foi de $36,5 \pm 1,4\%$, que também pode ser considerada relativamente alta, mesmo com uma concentração de ácido 4,8 vezes menor. Isso se deve à adição de H_2O_2 , cuja decomposição fornece O_2 para sistema, o qual reage com NO para regenerar o HNO_3 durante a decomposição.⁴³ Cabe destacar que, apesar de o teor de acidez residual ser elevado, a concentração final de HNO_3 em solução é relativamente baixa (cerca de 7,8%), possibilitando a análise do digerido final sem diluições prévias livre de interferências associadas a acidez. Para a condição usando HNO_3 2 mol L^{-1} , o teor de acidez residual foi menor ($12,1 \pm 1,5\%$), indicando o maior consumo do H_2O_2 presente no frasco, o que é evidenciado também pelo aumento do teor de carbono dissolvido. Uma condição intermediária usando HNO_3 $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ também foi avaliada, porém a decomposição da amostra foi incompleta, com o digerido apresentando aspecto semelhante ao obtido para a decomposição usando HNO_3 1 mol L^{-1} .

De acordo com um estudo desenvolvido por Wiltsche, Winkler e Tirk (2015),²⁶ a presença de carbono (a partir de fenilalanina) na concentração de 8 g L^{-1} pouco influencia na determinação elementar por ICP-OES, gerando apenas um aumento de sinal de até 8% para As. Esta informação é condizente com os ensaios de recuperação feitos para as decomposições utilizando HNO_3 2, 3 e $14,4 \text{ mol L}^{-1}$ neste trabalho, em que foram obtidas recuperações entre 95 e 108% para todos os analitos, mesmo com uma concentração de carbono dissolvido de $2007 \pm 130 \text{ mg L}^{-1}$. Cabe destacar que a concentração de carbono dissolvido obtida para a decomposição da amostra de MET usando HNO_3 2 mol L^{-1} e 1 mL de H_2O_2 50% é concordante com os valores encontrados na literatura para a decomposição do mesmo fármaco, usando o método de MAWD-SRC e HNO_3 2 mol L^{-1} como solução digestora.³³ Sendo assim, a condição em que se utilizou HNO_3 2 mol L^{-1} foi selecionada para a decomposição dos demais medicamentos.

Uma vez definida a melhor condição para a decomposição da amostra MET, esta foi aplicada para as demais amostras de medicamentos. Deste modo, na Figura 12 estão apresentadas as concentrações de carbono dissolvido e teores de acidez residual nos digeridos finais após a decomposição das amostras utilizando HNO_3 2 mol L^{-1} como solução digestora e 1 mL de H_2O_2 50% como reagente auxiliar. Para estes experimentos foi empregado o programa de irradiação 1. Cabe destacar que foram observados materiais particulados nos digeridos das amostras CANA, MET, REPA e SITA. As partículas observadas são referentes ao material inorgânico presente nessas amostras, não decompostos durante o procedimento de MAWD.

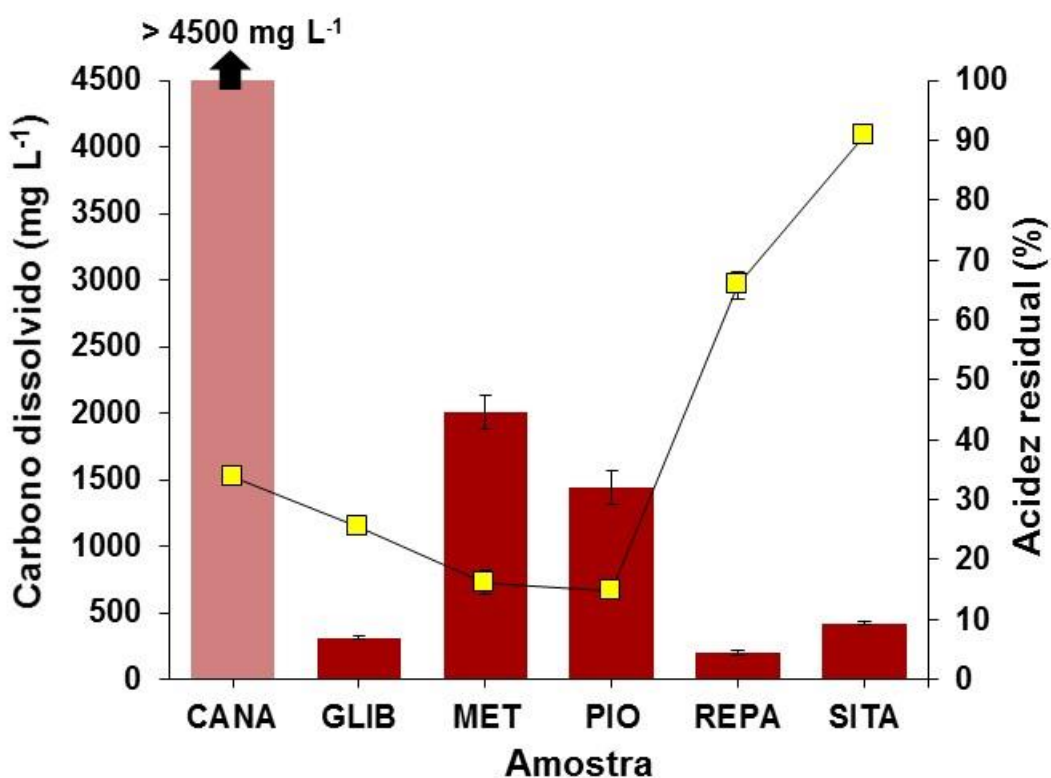


Figura 12 – Concentração de carbono dissolvido (■) e acidez residual (■) nos digeridos finais após a decomposição de 500 mg de medicamentos por MAWD usando HNO_3 2 mol L^{-1} e 1 mL de H_2O_2 50%. As barras representam a média com seu respectivo desvio padrão ($n = 3$). *A barra mais clara indica decomposição incompleta.

Com base nos dados expostos na Figura 12, é possível afirmar que a decomposição por MAWD foi eficiente para quase todas as amostras, com a exceção da amostra CANA, a qual apresentou forte coloração amarela e pedaços de

comprimido não decompostos. Como pode ser observado, os digeridos das amostras GLIB, REPA e SITA apresentaram as menores concentrações de carbono dissolvido e maior regeneração do ácido (evidenciado pela elevada acidez residual, 65,8 a 91,0%). Isso se deve ao fato dessas amostras possuírem menores quantidades relativas de princípio ativo nos comprimidos (4, 2 e 19%, respectivamente). Apesar da amostra PIO apresentar quantidade relativa de princípio ativo similar à SITA (23%), a concentração de carbono dissolvido após a decomposição desta foi consideravelmente superior. Possivelmente, em consequência da amostra PIO não conter nenhum componente inorgânico, enquanto a SITA apresenta alguns excipientes inorgânicos (CaHPO_4 , talco, TiO_2 , Fe_2O_3 e FeO). Desta forma, o teor de carbono original na amostra SITA é menor, quando comparada à PIO.

No que diz respeito às amostras MET e CANA, estas apresentaram as maiores concentrações de carbono dissolvido após a decomposição, isso porque ambas possuem as maiores quantidades relativas de PA (65 e 48%, respectivamente) dentre os medicamentos utilizados neste trabalho. Entretanto, ao se analisar as estruturas dos princípios ativos de ambos os fármacos, pode-se notar que a molécula de canaglifozina é muito mais complexa e estável, devido à presença de anéis aromáticos e um grupamento desativador (F), sendo assim menos suscetível ao ataque ácido.^{64,65} Tendo estas considerações em vista, alguns parâmetros adicionais foram avaliados para a decomposição da amostra CANA por MAWD.

4.2.2 Avaliação dos parâmetros de decomposição por MAWD para canagliflozina

4.2.2.1 Avaliação do programa de irradiação

Após a decomposição da amostra CANA por MAWD utilizando os parâmetros otimizados para a amostra MET (HNO_3 2 mol L^{-1} e 1 mL de H_2O_2 50%), foi observada uma decomposição incompleta, evidenciada pela coloração amarela e pela presença de amostra não decomposta no digerido final. Dessa forma, com o objetivo de obter um digerido final adequado para a determinação das impurezas

elementares, primeiramente o programa de irradiação foi avaliado. Para isso, o tempo de rampa e a permanência de irradiação na potência máxima de 1000 W foram aumentados (programa de irradiação 2, mostrado na Tabela 5). Deste modo, esperou-se obter uma maior eficiência na decomposição devido a um aumento mais gradual na pressão interna dos frascos (permitindo a irradiação ininterrupta durante a rampa de potência), além de um maior tempo de permanência em pressão e temperatura elevadas. Para estes experimentos, a concentração de HNO_3 foi mantida em $14,4 \text{ mol L}^{-1}$ e não foi feita a adição de reagente auxiliar.

Após a decomposição da amostra CANA usando o programa de irradiação 2, foi observada uma redução de aproximadamente 1,5 vezes na concentração de carbono dissolvido nos digeridos finais, quando comparado ao programa de irradiação 1 ($3310 \pm 160 \text{ mg L}^{-1}$ de C para o programa de irradiação 1 e $2230 \pm 270 \text{ mg L}^{-1}$ para o programa de irradiação 2). Já a acidez residual foi maior que 75% para ambas as decomposições, evidenciando um excesso de ácido. Desta forma, a condição utilizando o programa de irradiação 2 foi escolhida para as avaliações dos demais parâmetros.

4.2.2.2 Avaliação do resfriamento simultâneo durante a etapa de aquecimento

De forma a melhorar a eficiência de decomposição da amostra CANA, a utilização de FAN 2 (vazão de ar a $125 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$) também foi avaliada durante o programa de irradiação. De acordo com a literatura, o resfriamento simultâneo durante a etapa de aquecimento favorece a condensação no interior dos frascos, consequentemente diminuindo a pressão interna destes. Deste modo, torna-se possível irradiar os frascos na potência máxima durante mais tempo, devido ao aumento de pressão ser mais gradual. Além disso, o aumento na taxa de condensação favorece também a reação de regeneração do ácido, aumentando a eficiência de decomposição do método.^{41,44} Sendo assim, a influência da utilização de FAN 2 na decomposição da amostra CANA foi avaliada usando HNO_3 $14,4 \text{ mol L}^{-1}$ e o programa de irradiação 2. Além disso, a decomposição utilizando o FAN 2 também foi avaliada para a amostra MET, empregando as condições otimizadas de HNO_3 2 mol L^{-1} , 1 mL de H_2O_2 50% e o programa de irradiação 1.

Após os procedimentos de decomposição utilizando FAN 2 durante a etapa de aquecimento, foram determinadas a concentração de carbono dissolvido e teor de acidez residual nos digeridos finais. Ao serem comparadas as condições utilizando FAN 1 e FAN 2, foi observado um aumento no teor de acidez residual para a amostra CANA (de $80,0 \pm 2,5\%$ com FAN 1, para $85,0 \pm 0,7\%$ com FAN 2) e, também, para a amostra MET (de $12,1 \pm 1,5\%$ com FAN 1, para $14,7 \pm 0,2\%$ com FAN 2). Esses resultados são consistentes com a hipótese de que, com o uso do FAN 2 uma maior eficiência na regeneração do ácido é obtida. Entretanto, apesar do aumento na acidez residual, não foi observada diferença significativa ($p=0.232$ para CANA e $p=0.984$ para MET) nas concentrações de carbono dissolvido nos digeridos obtidos utilizando os dois modos de ventilação para ambas as amostras ($3480 \pm 150 \text{ mg L}^{-1}$ de C para CANA e $2000 \pm 350 \text{ mg L}^{-1}$ de C para MET), indicando que apenas o aumento na regeneração do ácido não foi suficiente para melhorar a eficiência de decomposição. Desse modo, optou-se por manter a condição inicial usando FAN 1 para as demais avaliações dos parâmetros do método de MAWD.

4.2.2.2 Avaliação da utilização de ácido diluído

A decomposição por MAWD utilizando ácidos concentrados resulta em teores de acidez residual elevados, como pode ser observado na Figura 13, fazendo com que seja necessário aplicar fatores de diluição maiores para a determinação dos analitos por técnicas espectrométricas e, por consequência, comprometendo a detectabilidade do método. Além disso, há um aumento nos resíduos gerados e na periculosidade dos procedimentos de preparo de amostras. Sendo assim, foram avaliadas diferentes concentrações de HNO_3 (3, 7 e 10 mol L^{-1}) para a decomposição de 500 mg da amostra CANA por MAWD. Para estes experimentos, utilizou-se o programa de irradiação 2. Além disso, foram adicionados 2 mL de H_2O_2 50% como reagente auxiliar, de modo a promover a regeneração do ácido diluído. Na Figura 13 estão expressas as concentrações de carbono dissolvido e os teores de acidez residual nos digeridos finais após estes procedimentos.

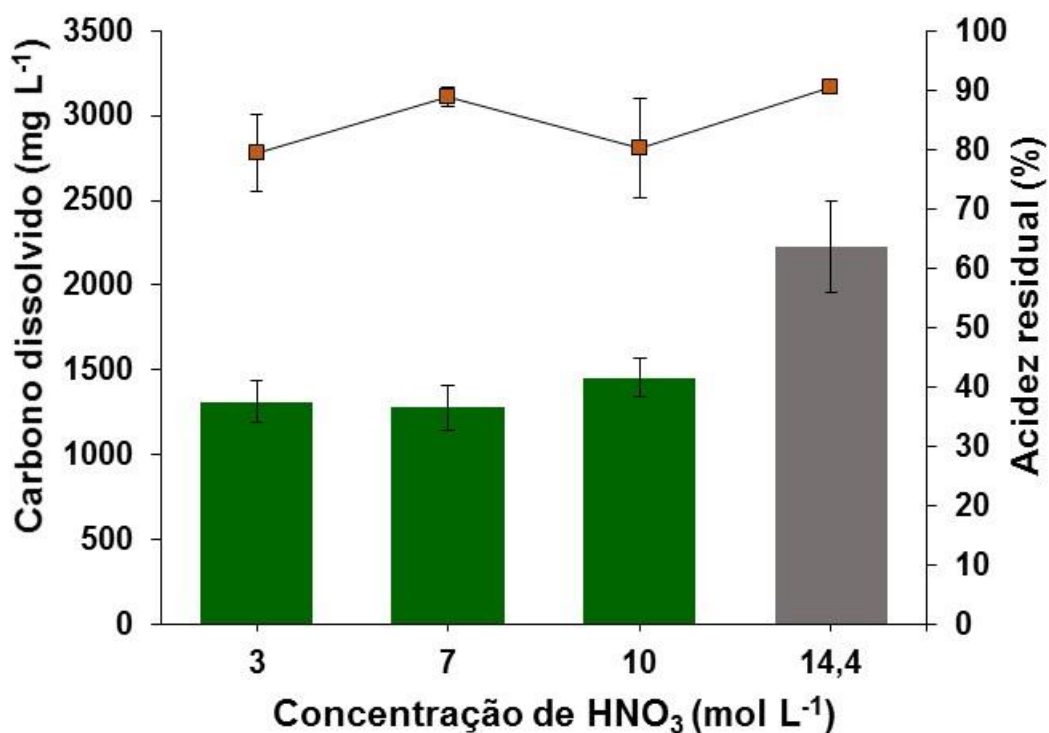


Figura 13 – Concentração de carbono dissolvido (■) e acidez residual (■) nos digeridos finais após decomposição de CANA por MAWD usando diferentes concentrações de HNO₃ (2 mL de H₂O₂ 50% como reagente auxiliar e o programa de irradiação 2). As barras representam a média com seu respectivo desvio padrão (n = 3). A barra em cinza representa a decomposição com ácido concentrado, sem adição de reagente auxiliar.

Com base nos resultados da Figura 13, é possível verificar que não houve diminuição da eficiência de decomposição com a diminuição da concentração de HNO₃ e adição de 2 mL de H₂O₂ 50% como reagente auxiliar. Ao contrário, observou-se uma diminuição significativa ($p=0,0075$) na concentração de carbono nos digeridos finais quando a combinação dos dois reagentes foi utilizada, em comparação com a decomposição utilizando HNO₃ concentrado. Isso se deve tanto pela regeneração do ácido, como pela ação oxidante do próprio peróxido de hidrogênio. Entre as condições utilizando ácido diluído, não foi observada diferença significativa nas concentrações de carbono dissolvido ($p=0,255$) e teores de acidez residual ($p=0,195$). Sendo assim, a condição utilizando HNO₃ 3 mol L⁻¹ foi considerada adequada para a decomposição das amostras de CANA por MAWD.

4.2.2.3 Avaliação do reagente auxiliar

Como o teor de acidez residual foi de quase 90% nos digeridos finais para a condição usando HNO_3 3 mol L^{-1} , e 2 mL de H_2O_2 50% e o programa de irradiação 2, possivelmente existe um excesso de ácido no sistema. Desta forma, a utilização de 1 mL de H_2O_2 50% também foi avaliada na decomposição da amostra CANA, juntamente com HNO_3 3 mol L^{-1} e usando o programa de irradiação 2. Os resultados para esta avaliação estão expostos na Figura 14.

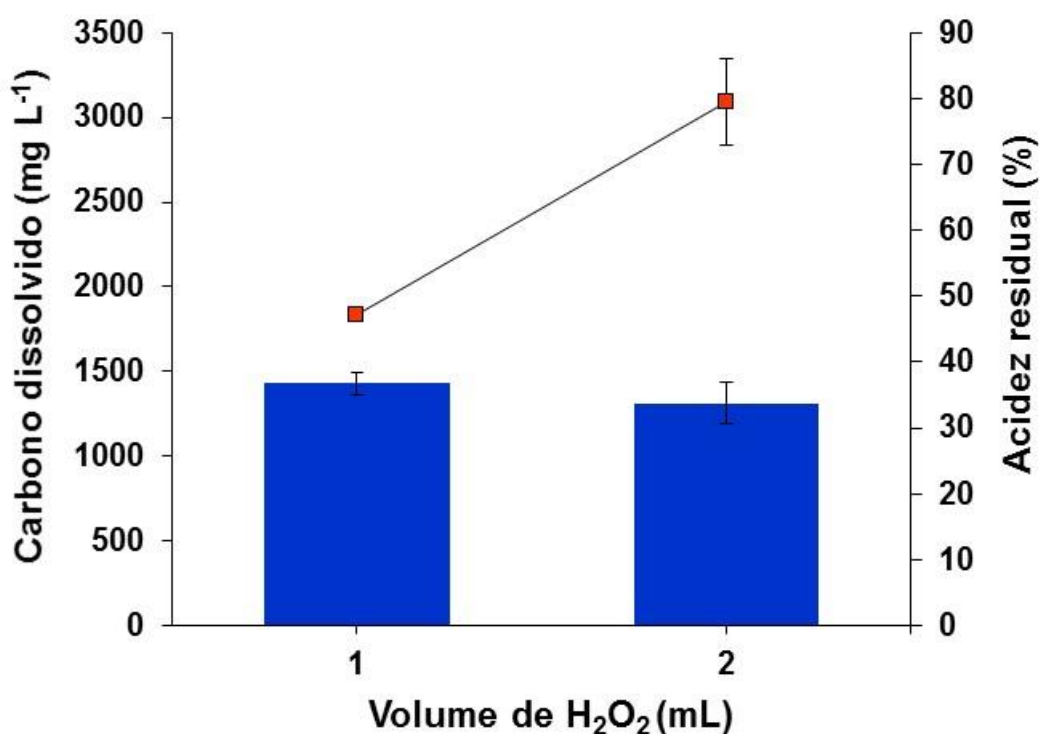


Figura 14 – Concentração de carbono dissolvido (■) e acidez residual (■) nos digeridos finais após decomposição de 500 mg de CANA por MAWD usando diferentes concentrações de H_2O_2 . Foi usado o programa de irradiação 2 e manteve-se a concentração de HNO_3 em 3 mol L^{-1} . As barras representam a média com seu respectivo desvio padrão ($n = 3$).

Conforme era esperado, ao se utilizar 1 mL de H_2O_2 50% houve uma redução na acidez residual do digerido, indicando um maior consumo do oxigênio gerado pela decomposição do H_2O_2 . É importante destacar, também, que a redução da concentração de reagente auxiliar não resultou em um aumento significativo da concentração de carbono dissolvido para a amostra CANA. Por este motivo, a

decomposição da amostra CANA usando HNO_3 3 mol L^{-1} como solução digestora e 1 mL de H_2O_2 50% como reagente auxiliar foi considerada adequada, quando foi utilizado o programa de irradiação 2. É importante mencionar que a aplicação das mesmas concentrações de reagentes, porém utilizando o programa de irradiação 1 resultou em uma decomposição incompleta da amostra CANA, sinalizando a importância de um programa de irradiação mais longo para uma decomposição eficiente. Para as demais amostras, foi mantida a condição usando HNO_3 2 mol L^{-1} , 1 mL de H_2O_2 50% e o programa de irradiação 1.

4.2.3 Determinação de impurezas elementares nas amostras de medicamentos após decomposição por MAWD com ácido diluído e peróxido de hidrogênio

Após a otimização do programa de irradiação e das concentrações de HNO_3 e H_2O_2 utilizadas na decomposição das amostras de medicamento por MAWD, foi feita a determinação de elementos majoritários nos digeridos. Sendo assim, foi feita a digestão da amostra CANA usando-se HNO_3 3 mol L^{-1} , 1 mL de H_2O_2 50% e o programa de irradiação 2, enquanto as demais amostras foram decompostas usando HNO_3 2 mol L^{-1} , 1 mL de H_2O_2 50% e o programa de irradiação 1 (Tabela 9). Cabe destacar que, após a decomposição das amostras, não houve a necessidade de diluições prévias à determinação dos analitos por ICP-OES, uma vez que a concentração residual de ácido nos digeridos foi baixa e quaisquer frações insolúveis ficaram depositadas no fundo dos frascos de polipropileno.

Tabela 9 – Concentração de elementos majoritários nos digeridos das amostras de medicamento após MAWD com ácido diluído e H₂O₂ (valores em µg g⁻¹, média ± desvio padrão, n = 3).

Amostra	Elemento				
	Ca	Fe	K	Mg	Na
CANA ^b	27,7 ± 2,0	142 ± 1	26,1 ± 1,0	574 ± 2	2964 ± 24
GLIB ^a	96,2 ± 3,3	3,95 ± 0,90	84,0 ± 2,2	304 ± 6	< 83,9
MET ^a	20,5 ± 0,8	2,25 ± 0,29	10,1 ± 1,0	1376 ± 40	1856 ± 140
PIO ^a	17,8 ± 0,8	3,50 ± 0,29	59,1 ± 0,8	191 ± 13	5129 ± 267
REPA ^a	< 10,8	101 ± 4	83,4 ± 0,8	1407 ± 82	4865 ± 113
SITA ^a	< 10,8	242 ± 5	27,9 ± 1,4	1139 ± 75	3012 ± 35

a: MAWD: 500 mg de amostra, HNO₃ 2 mol L⁻¹, 1 mL de H₂O₂ 50% e programa de irradiação 1;

b: MAWD: 500 mg de amostra, HNO₃ 3 mol L⁻¹, 1 mL de H₂O₂ 50% e programa de irradiação 2.

De acordo com a literatura,²⁴⁻²⁶ a presença de elevadas concentrações (> 1 g L⁻¹) de elementos facilmente ionizáveis (como Na, K, Ca, Mg) pode causar a diminuição da energia do plasma e afetar as energias de excitação dos analitos, sendo reportadas reduções de sinal em espectrômetros de ICP-OES com vista axial para as linhas de Pb em 220 nm, de Co em 230 nm e de Ni em 231 nm quando da adição de Na e Ca na concentração de 10 g L⁻¹ a soluções padrão. Como o somatório das concentrações dos elementos facilmente ionizáveis não foi superior a 150 mg L⁻¹ em todas as amostras utilizadas neste estudo, não houve a necessidade de serem feitos estudos posteriores quanto à interferência por elementos facilmente ionizáveis. Cabe destacar que durante as determinações dos analitos, foram feitas adições de padrão às alíquotas de amostra, e as eventuais diluições realizadas foram concordantes entre si.

Após a caracterização das amostras, foram feitos ensaios de recuperação para as impurezas elementares, utilizando as condições otimizadas do método de MAWD para cada medicamento. Na Tabela 11 estão expressos os resultados para as recuperações de As, Cd, Co, Hg, Ni, Pb e V.

Tabela 10 – Recuperação dos analitos após decomposição das amostras de medicamentos por MAWD usando as condições otimizadas (valores em %, média \pm desvio padrão, n=3).

Amostra	Analito						
	As	Cd	Co	Hg	Ni	Pb	V
CANA ^b	108 \pm 3	101 \pm 2	103 \pm 2	93,9 \pm 2,2	103 \pm 2	94,2 \pm 3,8	92,8 \pm 1,6
GLIB ^a	95,9 \pm 2,1	99,4 \pm 1,1	96,8 \pm 1,9	101 \pm 3	105 \pm 1	101 \pm 3	98,5 \pm 1,8
MET ^a	108 \pm 5	103 \pm 2	101 \pm 1	97,9 \pm 3,4	100 \pm 1	105 \pm 5	104 \pm 1
SITA ^a	93,7 \pm 3,6	90,2 \pm 1,2	97,9 \pm 0,9	96,6 \pm 1,3	99,9 \pm 0,7	90,5 \pm 0,7	102 \pm 3
PIO ^a	98,8 \pm 2,7	94,9 \pm 2,5	100 \pm 1	109 \pm 1	102 \pm 2	93,2 \pm 0,3	95,9 \pm 0,6
REPA ^a	97,5 \pm 0,7	90,1 \pm 1,9	95,5 \pm 4,2	102 \pm 2	98,9 \pm 1,0	97,0 \pm 2,9	95,4 \pm 1,9

a: MAWD: 500 mg de amostra, HNO₃ 2 mol L⁻¹, 1 mL de H₂O₂ 50% e programa de irradiação 1

b: MAWD: 500 mg de amostra, HNO₃ 3 mol L⁻¹, 1 mL de H₂O₂ 50% e programa de irradiação 2

Como pode ser observado na Tabela 11, as recuperações de todos os analitos variaram entre 90 e 109% após a decomposição das amostras utilizando as condições otimizadas para o método de MAWD. Sendo assim, é possível inferir que a concentração de carbono, teor de acidez residual e presença de elementos majoritários nos digeridos não gerou interferências durante as determinações das impurezas elementares por ICP-OES. Cabe destacar que não foi necessária a diluição das amostras previamente à determinação. Com base nos resultados obtidos utilizando o método de MAWD com ácido diluído e H₂O₂, foi possível confirmar a adequabilidade do método desenvolvido, uma vez que digeridos compatíveis com a técnica de determinação foram obtidos.

4.2.3.1 Decomposição de materiais de referência certificados

Além dos ensaios de recuperação por adição de padrão às amostras, também foram feitas decomposições de materiais de referência certificados (CRMs). Levando em consideração a indisponibilidade de CRMs que contenham estrutura química semelhante às matrizes dos medicamentos estudados neste trabalho, foi feita uma adição de CRM à uma das amostras, escolhida aleatoriamente. Para este procedimento, comprimidos da amostra GLIB foram moídos em almofariz de ágata. Após, 250 mg de GLIB foram misturados a 250 mg de CRM e a mistura foi prensada na forma de comprimido (1 ton, 1 min). Para este procedimento, foram utilizados o

CRM botânico BCR 60 (*aquatic plant*) e os CRMs biológicos TORT-2 (*lobster hepatopancreas*) e DOLT-4 (*dogfish liver*). Após a confecção dos comprimidos, estes foram decompostos utilizando as condições otimizadas para o método de MAWD e os digeridos foram analisados por ICP-OES. Os resultados para esses procedimentos estão mostrados na Tabela 11.

Tabela 11 – Resultados obtidos para os analitos após decomposição de CRMs botânico e biológico misturados a amostra GLIB por MAWD (valores em $\mu\text{g g}^{-1}$, média \pm desvio padrão, n = 3).

Analito	CRM BCR 60		CRM DOLT-4		CRM TORT-2	
	Valor obtido	Valor certificado	Valor obtido	Valor certificado	Valor obtido	Valor certificado
As	6,87 \pm 0,19	8,00*	9,71 \pm 0,53	9,66 \pm 0,62	22,0 \pm 0,5	21,6 \pm 1,8
Cd	2,19 \pm 0,02	2,20 \pm 0,10	24,5 \pm 0,2	24,3 \pm 0,8	26,7 \pm 0,3	26,7 \pm 0,6
Co	3,97 \pm 0,09	4,00*	<0,396	0,250*	0,512 \pm 0,011	0,510 \pm 0,090
Hg	<0,493	0,340 \pm 0,040	2,62 \pm 0,06	2,58 \pm 0,22	<0,493	0,270 \pm 0,060
Ni	40,1 \pm 2,1	40,0*	0,992 \pm 0,073	0,970 \pm 0,110	2,53 \pm 0,06	2,50 \pm 0,19
Pb	63,5 \pm 1,9	63,8 \pm 3,2	<0,889	0,160 \pm 0,023	<0,889	0,350 \pm 0,130
V	4,75 \pm 0,09	6,00*	0,575 \pm 0,039	0,600*	1,66 \pm 0,03	1,64 \pm 0,19

*Valor informado.

A partir dos resultados obtidos na determinação dos analitos nos CRMs misturados à amostra GLIB, não foi observada diferença significativa entre os valores obtidos e os valores certificados (teste t de *student*), com a exceção de V no CRM BCR 60 ($p=0,0017$). Cabe destacar, entretanto, que o valor expresso no CRM para este elemento não é um valor certificado, não existindo informações quanto à incerteza associada à medida. Logo, os resultados demonstram a adequabilidade do método de MAWD para a decomposição de amostras de medicamentos de via oral usados no tratamento de diabetes tipo 2 para posterior determinação de impurezas elementares das classes 1 e 2A por ICP-OES.

4.3 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS RELACIONADOS À DECOMPOSIÇÃO POR MAWD-UV

A radiação ultravioleta age como catalisadora na decomposição dos agentes oxidantes HNO_3 e H_2O_2 , além de promover a quebra de diversos compostos orgânicos, inclusive compostos aromáticos e insaturados.^{27,46} Por este motivo, a ação conjunta de ambas as radiações ultravioleta e micro-ondas possui um grande potencial para aumentar a eficiência de decomposição de produtos farmacêuticos. Desta forma, o método de MAWD-UV foi aplicado para a decomposição das amostras de medicamentos de via oral. Esta avaliação foi feita utilizando uma concentração de ácido para a qual não foi observada a decomposição completa das amostras (HNO_3 1 mol L^{-1}) utilizando a MAWD. O método de MAWD-UV foi aplicado, inicialmente, utilizando a amostra MET. A decomposição foi feita empregando o programa de irradiação apresentado na Tabela 6 (item 3.5.3). Além disso, H_2O_2 50% (1,6 ou 3,2 mL) foi avaliado como reagente auxiliar para estes procedimentos.

A eficiência de decomposição da amostra MET por MAWD-UV pode ser observada na Figura 15. Cabe destacar que todas as decomposições por MAWD-UV foram feitas usando 10 mL de solução digestora e FAN 2 durante a etapa de aquecimento. Ademais, a temperatura foi limitada a 250 °C para evitar danos aos dispositivos de PTFE. Considerando-se estas informações, os resultados de carbono e acidez residual foram comparados com os resultados obtidos por uma decomposição por MAWD usando HNO_3 1 mol L^{-1} , 1,6 mL de H_2O_2 50%, 10 mL de solução e FAN 2, de forma a garantir que os efeitos observados tenham sido provenientes da utilização da radiação UV.

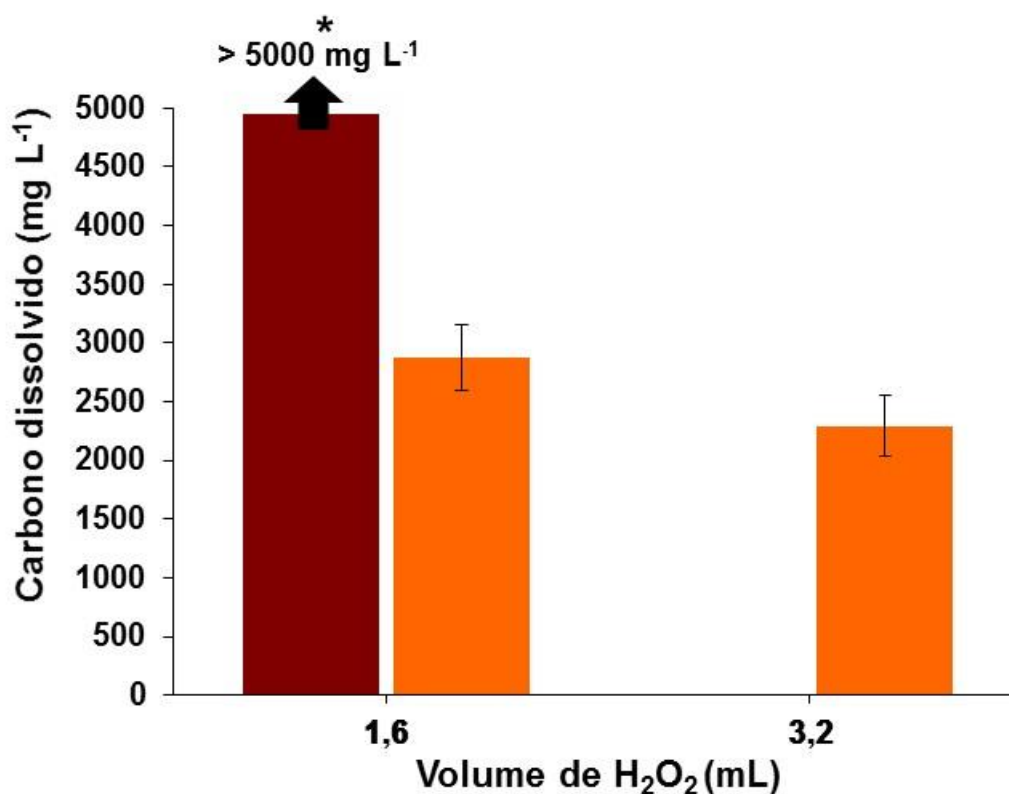


Figura 15 – Concentração de carbono dissolvido nos digeridos finais após a decomposição de 500 mg de MET por MAWD (■) e MAWD-UV (■) usando HNO₃ 1 mol L⁻¹ e diferentes concentrações de H₂O₂. *Decomposição incompleta.

Com o uso de lâmpadas emissoras de radiação UV em conjunto com a radiação micro-ondas (MAWD-UV), a decomposição completa da amostra MET foi atingida. Entretanto, quando a amostra foi decomposta por MAWD usando as mesmas condições, foram obtidos digeridos amarelados com resíduos sólidos provenientes de uma decomposição incompleta. Deste modo, é possível afirmar que a utilização da radiação UV durante a etapa de aquecimento promove uma melhora significativa ($p=0,0005$) na decomposição da amostra MET. Quando foram comparadas as adições de 1,6 e 3,2 mL de H₂O₂ 50%, não foi observada diferença significativa na eficiência de decomposição ($p=0,058$). Assim, a condição de MAWD-UV usando HNO₃ 1 mol L⁻¹ e 1,6 mL de H₂O₂ 50% foi considerada adequada, sendo então aplicada para as demais amostras de medicamentos de via oral, utilizando as condições otimizadas. A eficiência da decomposição destas amostras está exposta na Figura 16.

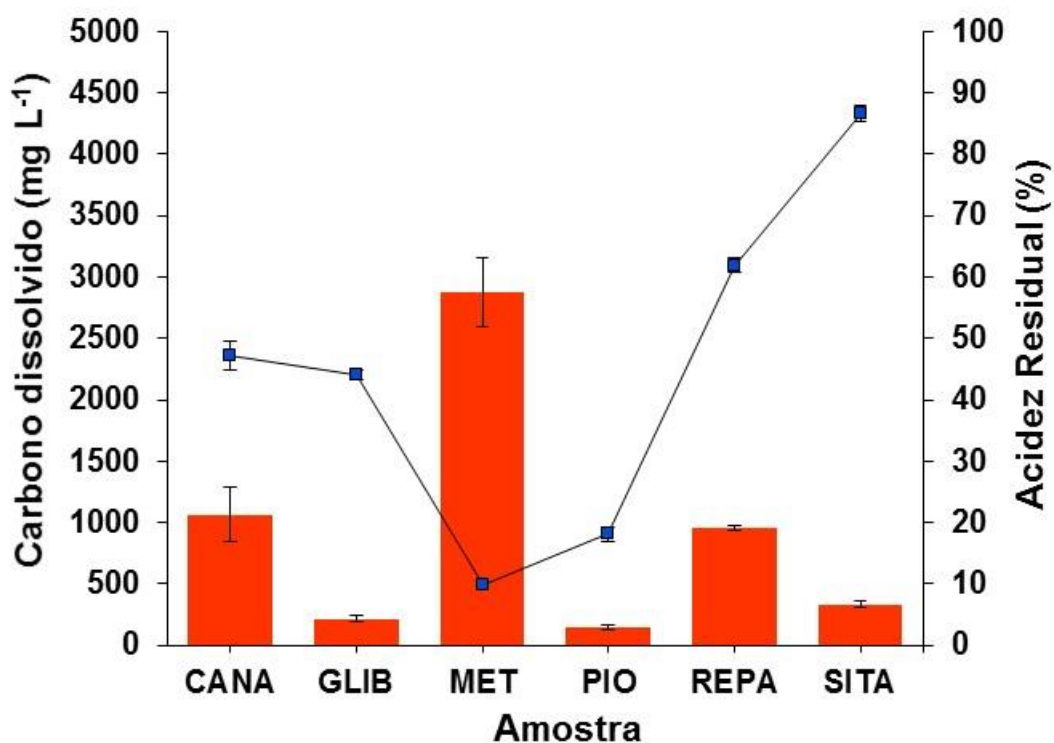


Figura 16 – Concentração de carbono dissolvido (■) e acidez residual (■) nos digeridos finais após decomposição de 500 mg de amostras de medicamento com HNO₃ 1 mol L⁻¹ e 1,6 mL de H₂O₂ 50% por MAWD-UV.

Com base nos resultados mostrados na Figura 16, é possível confirmar a eficiência da decomposição das amostras por MAWD-UV, como evidenciado pelas concentrações de carbono dissolvido relativamente baixas. Cabe destacar que, aplicando-se o método de MAWD-UV, foi possível decompor a amostra CANA empregando as mesmas condições utilizadas para as demais amostras, o que não foi possível pelo método de MAWD (item 4.2). Além disso, a concentração de HNO₃ utilizada no procedimento de MAWD-UV (1 mol L⁻¹) foi menor, em comparação com a MAWD (2 - 3 mol L⁻¹), diminuindo ainda mais o consumo de reagentes e a geração de resíduos. É importante salientar também que, para as amostras contendo excipientes inorgânicos (CANA, MET, REPA e SITA), foi observado um resíduo sólido ao final da decomposição, referente a estes componentes.

4.3.1 Avaliação da exatidão do método de MAWD-UV

4.3.1.1 Ensaios de recuperação

Após o ajuste dos parâmetros necessários no método de MAWD-UV para posterior determinação de impurezas elementares das classes 1 e 2A em medicamentos de via oral, foram feitos ensaios de recuperação dos analitos nas amostras empregando as condições otimizadas. O ensaio consistiu na adição dos analitos em sua concentração máxima permitida (considerando a massa de amostra usada e o volume final do digerido), diretamente sobre as amostras antes da decomposição. Para estes procedimentos, foram usados 10 mL de solução digestora contendo HNO_3 1 mol L^{-1} e 1,6 mL de H_2O_2 50%, sendo aplicado um programa de irradiação de 25 min com FAN 2 durante a etapa de aquecimento. Após, os analitos foram determinados por ICP-OES (Tabela 12).

Tabela 12 – Recuperação dos analitos após decomposição das amostras de medicamentos por MAWD-UV (valores em %, média \pm desvio padrão, n = 3).

Amostra	Analito						
	As	Cd	Co	Hg	Ni	Pb	V
CANA	103 \pm 1	101 \pm 2	100 \pm 2	96,7 \pm 2,8	97,8 \pm 3,2	98,3 \pm 2,4	100 \pm 3
GLIB	110 \pm 1	97,6 \pm 1,0	95,8 \pm 1,2	107 \pm 3	106 \pm 4	94,7 \pm 2,0	105 \pm 1
MET	103 \pm 3	106 \pm 3	105 \pm 3	95,5 \pm 1,6	105 \pm 3	98,3 \pm 3	96,3 \pm 3,3
PIO	106 \pm 4	100 \pm 2	97,8 \pm 1,8	97,6 \pm 2,9	99,4 \pm 1,2	104 \pm 3	105 \pm 2
REPA	106 \pm 3	96,9 \pm 2,0	94,0 \pm 3,8	92,5 \pm 2,6	92,5 \pm 3,1	98,2 \pm 1,7	97,8 \pm 3,1
SITA	107 \pm 1	96,6 \pm 2,8	104 \pm 2	98,0 \pm 1,8	101 \pm 3	106 \pm 2	99,9 \pm 1,3

Conforme os resultados mostrados na Tabela 12, foram obtidas recuperações entre 92 e 110% para os analitos em todas as amostras, o que demonstra a aplicabilidade do método proposto para decomposição de produtos farmacêuticos.

4.3.1.2 Decomposição de materiais de referência certificados

Além dos ensaios de recuperação por adição de padrão às amostras, também foram feitas decomposições de materiais de referência certificados (CRMs). O procedimento para a confecção de comprimidos contendo CRM e amostra foi feito de acordo com o item 4.2.3.1. Após, os comprimidos foram decompostos utilizando as condições otimizadas para o método de MAWD-UV. Posteriormente, os digeridos foram analisados por ICP-OES. Os resultados para as decomposições dos CRMs estão expressos na Tabela 13.

Tabela 13 – Resultados obtidos para os analitos após decomposição de CRMs botânico e biológico misturados a amostra GLIB por MAWD-UV (valores em $\mu\text{g g}^{-1}$, média \pm desvio padrão, n = 3).

Analito	CRM BCR 60		CRM DOLT-4		CRM TORT-2	
	Valor obtido	Valor certificado	Valor obtido	Valor certificado	Valor obtido	Valor certificado
As	7,08 \pm 0,19	8,00*	9,44 \pm 0,57	9,66 \pm 0,62	21,0 \pm 0,5	21,6 \pm 1,8
Cd	2,21 \pm 0,03	2,20 \pm 0,10	25,7 \pm 0,3	24,3 \pm 0,8	26,4 \pm 0,4	26,7 \pm 0,6
Co	3,91 \pm 0,07	4,00*	<0,40	0,250*	0,507 \pm 0,014	0,510 \pm 0,090
Hg	<0,50	0,340 \pm 0,040	2,41 \pm 0,07	2,58 \pm 0,22	<0,50	0,270 \pm 0,060
Ni	38,7 \pm 1,1	40,0*	1,06 \pm 0,06	0,970 \pm 0,110	2,49 \pm 0,09	2,50 \pm 0,19
Pb	64,2 \pm 2,5	63,8 \pm 3,2	<0,89	0,160 \pm 0,023	<0,89	0,350 \pm 0,130
V	4,25 \pm 0,07	6,00*	0,549 \pm 0,053	0,600*	1,76 \pm 0,05	1,64 \pm 0,19

*Valor informado.

Conforme os resultados expressos na Tabela 13, não foi identificada diferença significativa (teste t de *student*) entre os valores obtidos e os valores certificados, com a exceção, novamente, de V no CRM BCR 60, que apresentou valor inferior ao informado. Desta forma, o método de MAWD-UV também foi considerado adequado para a decomposição de amostras de medicamentos de via oral usados no tratamento de diabetes tipo 2 para posterior determinação de impurezas elementares das classes 1 e 2A por ICP-OES.

4.4 COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS AVALIADOS PARA A DECOMPOSIÇÃO DE MEDICAMENTOS DE VIA ORAL USADOS NO TRATAMENTO DE DIABETES TIPO 2

Para o método de MIC, o uso de uma solução absorvedora diluída (HNO_3 7 mol L^{-1}) foi eficiente para a recuperação de todos os analitos apenas em amostras que não continham excipientes inorgânicos (amostras GLIB e PIO). Para a amostra MET, foram obtidas recuperações aceitáveis (entre 76,5% e 98,3%)³⁸ para As, Cd, Hg, Ni e Pb utilizando estas condições. Entretanto, foi necessária a utilização de misturas de HNO_3 e HCl para se obter uma recuperação quantitativa para Co, e nenhuma condição testada foi eficiente para a recuperação de V. Usando HNO_3 7 mol L^{-1} como solução absorvedora para as demais amostras, foi possível obter recuperações aceitáveis (72,4% e 91,4%) para As, Cd, Hg e Pb para CANA, Cd e Hg (78,9% e 88,1%, respectivamente) para REPA, e As e Hg (89,3% e 89,2%, respectivamente) para SITA. Isso se deve ao maior teor de material inorgânico nestas amostras, que faz com que os analitos fiquem retidos na matriz.

Após a otimização e aplicação dos métodos de MAWD e MAWD-UV, foi possível atestar a eficiência de ambos na decomposição da matriz orgânica das amostras de medicamentos. Entretanto, é importante frisar que, com o método de MAWD, não foi possível decompor todas as amostras usando a condição mais branda, sendo necessária a utilização de ácido nítrico mais concentrado (3 mol L^{-1}) e um programa de irradiação mais longo (25 min) para a completa decomposição da amostra CANA. Já para o método de MAWD-UV, a decomposição de todas as amostras pôde ser efetuada utilizando condições mais brandas (HNO_3 1 mol L^{-1}), sem perdas na eficiência de decomposição. Para fins de comparação, na Tabela 14 estão expressos alguns parâmetros inerentes dos métodos avaliados neste trabalho.

Tabela 14 – Resumo dos parâmetros dos métodos de decomposição para medicamentos de uso oral avaliados neste trabalho.

Parâmetro	Método de decomposição		
	MIC	MAWD	MAWD-UV
Massa média de amostra (comprimidos), mg	500	500	500
Reagentes	HNO ₃ 7 mol L ⁻¹	HNO ₃ 2 mol L ⁻¹ + 1 mL de H ₂ O ₂ 50% ou HNO ₃ 3 mol L ⁻¹ + 1 mL de H ₂ O ₂ 50% (CANA)	HNO ₃ 1 mol L ⁻¹ + 1,6 mL de H ₂ O ₂ 50%
Tempo total do procedimento, min	30	45 ou 55 (CANA)	55
Número de replicatas por ciclo de decomposição	8	8	8
LOQ, µg g ⁻¹			
As	2,26	1,57	2,29
Cd	0,09	0,06	0,06
Co	0,45	0,64	0,40
Hg	1,03	0,77	0,49
Ni	0,31	0,50	0,86
Pb	0,92	1,22	0,89
V	0,27	0,10	0,14

Conforme pode ser observado na Tabela 14, o método de MIC apresenta a vantagem de um menor tempo de decomposição e concentração de carbono dissolvido desprezível. Entretanto, não foi encontrada uma condição ideal de decomposição de modo a se obter recuperações quantitativas para todos os analitos quando da decomposição de amostras contendo excipientes inorgânicos (CANA, MET, REPA e SITA).

Quanto ao método de decomposição por MAWD-UV, destaca-se sua maior eficiência na decomposição de amostras contendo maior quantidade relativa de princípio ativo, em especial amostras contendo compostos aromáticos e insaturados, como evidenciado pela concentração de carbono dissolvido nos digeridos. Para matrizes mais simples, entretanto, ambos os métodos de MAWD e MAWD-UV apresentam boa eficiência de decomposição. Nestes casos, o método de MAWD pode ser aplicado devido à sua maior praticidade e menor custo.

Cabe destacar que os métodos avaliados apresentaram LOQs semelhantes. Levando-se em consideração os limites estabelecidos pelo guia ICH Q3D, os LOQs obtidos são no mínimo duas vezes menores que a concentração máxima permitida para todos os analitos. Desta forma, a determinação de impurezas elementares das classes 1 e 2A nas amostras de medicamentos por ICP-OES de modo a atender o guia ICH Q3D foi possível.

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos para as decomposições utilizando o método de MIC, pode-se concluir que não foi possível obter recuperações quantitativas para V em nenhuma das condições avaliadas neste trabalho quando foram decompostos medicamentos contendo excipientes inorgânicos (CANA, MET, REPA e SITA). A recuperação dos elementos da classe 1 utilizando solução absorvedora diluída apenas para as amostras MET e CANA, as quais continham menor quantidade de excipientes inorgânicos. Já para os medicamentos que não contêm excipientes inorgânicos, a recuperação de todos os analitos foi possível utilizando HNO_3 7 mol L^{-1} como solução absorvedora e 10 min de refluxo.

Com relação aos métodos de MAWD e MAWD-UV, foi possível concluir que ambos estes métodos são adequados para a decomposição de medicamentos de via oral usados no tratamento da diabetes tipo 2 para posterior determinação de impurezas elementares das classes 1 e 2A por ICP-OES. Cabe destacar que para ambos os métodos foi utilizado ácido diluído para a decomposição da matriz orgânica das amostras, resultando em digeridos com baixa concentração ácida, ao mesmo tempo contendo baixa concentração de carbono dissolvido, especialmente no método de MAWD-UV.

O método de MAWD-UV possibilitou a decomposição de até 600 mg de medicamento (sem cominuição prévia) utilizando 10 mL de uma solução contendo HNO_3 1 mol L^{-1} e 1,6 mL de H_2O_2 50%, com tempo total de 55 min. As recuperações obtidas pela adição de padrão neste método foram quantitativas, e a decomposição de CRMs possibilitou resultados concordantes com os valores certificados. Quanto ao método de MAWD com ácido diluído, foi possível decompor até 600 mg de amostra de medicamento utilizando 6 mL de uma solução contendo HNO_3 2 mol L^{-1} e 1 mL de H_2O_2 50%, com tempo total de 45 min, com a exceção da amostra CANA, para a qual foi utilizado HNO_3 3 mol L^{-1} , 1 mL de H_2O_2 50% e um programa de irradiação com tempo total de 55 min. Sendo assim, o presente trabalho possibilitou a decomposição de medicamentos utilizando condições brandas e procedimentos relativamente rápidos (<1 h), ainda diminuindo os resíduos gerados e os riscos associados à etapa de preparo para este tipo de amostra, além de reduzir as possíveis interferências associadas ao uso de reagentes concentrados.

REFERÊNCIAS

1. Kahn, C. R. Insulin action, diabetogenesis, and the cause of type II diabetes, *Diabetes* 43 (1994) 1066-1085.
2. Stumvoll, M., Goldstein, B. J., Haeften, T. W. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy, *The Lancet* 365 (2005) 1333-1346.
3. Cho, N. H., Shaw, J. E., Karuranga, S., Huang, Y., Fernandes, J. D. R., Ohlrogge, A. W., Malanda, B. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045, *Diabetes Research and Clinical Practice* 138 (2018) 271-281.
4. Marín-Peñalver, J. J., Martín-Timón, I., Sevillano-Collantes, C., Del Cañizo-Gómez, F. J. Update on the treatment of type 2 diabetes mellitus, *World Journal of Diabetes* 7 (2016) 354-395.
5. Guideline for Elemental Impurities Q3D(R1). International Council For Harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use, disponível em: <https://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/guideline-for-elemental-impurities-copy-1.html>; acessado em 07/06/2019.
6. Pohl, P., Bielawska-Pohl, A., Dzimitrowicz, A., Jamroz, P., Welna, M. Impact and practicability of recently introduced requirements on elemental impurities, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 101 (2018) 43-55.
7. Barin, J. S., Mello, P. A., Mesko, M. F., Duarte, F. A., Flores, E. M. Determination of elemental impurities in pharmaceutical products and related matrices by ICP-based methods: a review, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408 (2016) 4547-4566.
8. Bizzi, C. A., Pedrotti, M. F., Silva, J. S., Barin, J. S., Nobrega, J. A., Flores, E. M. Microwave-assisted digestion methods: towards greener approaches for plasma-based analytical techniques, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 32 (2017) 1448-1466.
9. Chatterjee, S., Khunti, K., Davies, M. J. Type 2 diabetes, *The Lancet* 389 (2017) 2239-2251.

10. USP, Elemental Impurities - Limits The United States Pharmacopeia, United States Pharmacopeial Convention Rockville, 2017, pp. 8065-8068.
11. Mattiazzi, P., Bohrer, D., Becker, E., Viana, C., Nascimento, P. C., Carvalho, L. M. High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for screening elemental impurities in drugs to adhere to the new international guidelines, *Talanta* 197 (2019) 20-27.
12. Wollein, U., Bauer, B., Habernegg, R., Schramek, N. Potential metal impurities in active pharmaceutical substances and finished medicinal products – A market surveillance study, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 77 (2015) 100-105.
13. Støving, C., Jensen, H., Gammelgaard, B., Stürup, S. Development and validation of an ICP-OES method for quantitation of elemental impurities in tablets according to coming US pharmacopeia chapters, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 84 (2013) 209-214.
14. Silva, C. S., Pinheiro, F. C., Amaral, C. D. B., Nobrega, J. A. Determination of As, Cd, Hg and Pb in continuous use drugs and excipients by plasma-based techniques in compliance with the United States Pharmacopeia requirements, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 138 (2017) 14-17.
15. Menoutis, J., Parisi, A., Verma, N. Study of the use of axial viewed inductively coupled plasma atomic emission spectrometry with ultrasonic nebulization for the determination of select elemental impurities in oral drug products, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 152 (2018) 12-16.
16. Li, G., Schoneker, D., Ulman, K. L., Sturm, J. J., Thackery, L. M., Kauffman, J. F. Elemental impurities in pharmaceutical excipients, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 104 (2015) 4197-4206.
17. Chahrour, O., Malone, J., Collins, M., Salmon, V., Greenan, C., Bombardier, A., Ma, Z., Dunwoody, N. Development and validation of an ICP-MS method for the determination of elemental impurities in TP-6076 active pharmaceutical ingredient (API) according to USP <232>/<233>, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 145 (2017) 84-90.

18. Barin, J. S., Tischer, B., Picoloto, R. S., Antes, F. G., Silva, F. E. B., Paula, F. R., Flores, E. M. M. Determination of toxic elements in tricyclic active pharmaceutical ingredients by ICP-MS: a critical study of digestion methods, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 352-358.
19. Gonzalez, M. H., Silva, C. S., Amaral, C. D. B., Bianchi, S. R., Oliveira, L. H. B., Coelho, J. S., Oliveira, A., Nogueira, A. R. A. Determination of Elemental Impurities in Acyclovir Ointment and Raw Materials Using Microwave Acid Digestion (MW-AD) and ICP-MS, *Journal of the Brazilian Chemical Society* 28 (2017) 98-105.
20. Fischer, L., Zipfel, B., Koellensperger, G., Kovac, J., Bilz, S., Kunkel, A., Venzago, C., Hann, S. Flow injection combined with ICP-MS for accurate high throughput analysis of elemental impurities in pharmaceutical products according to USP <232>/<233>, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 95 (2014) 121-129.
21. Muller, A. L. H., Oliveira, J. S. S., Mello, P. A., Muller, E. I., Flores, E. M. M. Study and determination of elemental impurities by ICP-MS in active pharmaceutical ingredients using single reaction chamber digestion in compliance with USP requirements, *Talanta* 136 (2015) 161-169.
22. Hill, S. J. Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Applications, 2 ed., Blackwell Publishing 2007, p.
23. Grindlay, G., Mora, J., 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.
24. Stepan, M., Musil, P., Poussel, E., Mermet, J. M. Matrix-induced shift effects in axially viewed inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 56 (2001) 443-453.
25. Todolí, J. L., Gras, L., Hernandis, V., Mora, J. Elemental matrix effects in ICP-AES, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 17 (2002) 142-169.

26. Wiltzsche, H., Winkler, M., Tirk, P. Matrix effects of carbon and bromine in inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 30 (2015) 2223-2234.
27. Krug, F. J., Rocha, F. R. P. Métodos de preparo de amostras para análise elementar, 2 ed., EditSBQ, São Paulo, 2016, 572 p.
28. Kaczala, S., Costa, A. B., Posselt, E. L., Barin, J. S., Flores, E. M. M., Dressler, V. L. Element determination in pharmaceuticals using direct solid analysis- electrothermal vaporization inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *Journal of the Brazilian Chemical Society* 26 (2015) 475-483.
29. Lin, M., Jiang, S. Determination of trace Cr, Mo, Pd, Cd, Pt and Pb in drug tablets by ultrasonic slurry sampling electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 26 (2011) 1813-1818.
30. Rudovica, V., Viksna, A., Actins, A. Application of LA-ICP-MS as a rapid tool for analysis of elemental impurities in active pharmaceutical ingredients, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 91 (2014) 119-122.
31. Bolzan, R. C., Rodrigues, L. F., Mattos, J. C. P., Dressler, V. L., Flores, E. M. M. Chromium determination in pharmaceutical grade barium sulfate by solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry with Zeeman-effect background correction, *Talanta* 74 (2007) 119-124.
32. Knam, H., Isensee, R., Infantino, G., Putyera, K., Wang, X. Microwave-induced combustion for ICP-MS: a generic approach to trace elemental analyses of pharmaceutical products, *Spectroscopy* 26 (2011) 2-7.
33. Pinheiro, F. C., Barros, A. I., Nobrega, J. A. Microwave-assisted sample preparation of medicines for determination of elemental impurities in compliance with United States Pharmacopeia: How simple can it be?, *Analytica Chimica Acta* 1065 (2019) 1-11.
34. Carvalho, G. S., Determinação de impurezas elementares em sulfato de bário por ICP-MS após volatilização empregando combustão iniciada por micro-

- ondas, Programa de pós-graduação em química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2018, pp. 87.
35. Tu, Q., Wang, T., Antonucci, V. High-efficiency sample preparation with dimethylformamide for multi-element determination in pharmaceutical materials by ICP-AES, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 52 (2010) 311-315.
 36. Moraes, D. P., Bizzi, C. A., Nobrega, J. A., Flores, E. M. M., Nogueira, A. R. A., Barin, J. S., Mesko, M. F. Preparo de amostras assistido por radiação micro-ondas, F. J. Krug, F. R. P. Rocha (Eds.) Métodos de preparo de amostras para análise elementar, EditSBQ, São Paulo, 2016.
 37. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 5.3.2.3 Ensaio limite para metais pesados, Farmacopeia Brasileira, Brasília, 2010.
 38. The United States Pharmacopeia, <232> Elemental impurities - procedures, Rockville, 2017.
 39. Flores, E. M. M., Flores, E. L. M., Paniz, J. N. G., Barin, J. S., Mesko, M. F., Krug, F. J. Decomposição de materiais orgânicos por combustão, F. J. Krug, F. R. P. Rocha (Eds.) Métodos de preparo de amostras para análise elementar, EditSBQ, São Paulo, 2016, pp. 429-443.
 40. Kingston, H. M., Walter, P. J. The art and science of microwave sample preparations for trace and ultratrace elemental analysis, A. Montaser (Ed.) Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, John Wiley & Sons inc, Nova Iorque, 1998, pp. 33-83.
 41. Bizzi, C. A., Emprego de oxigênio e peróxido de hidrogênio como auxiliares na decomposição de amostras biológicas por via úmida assistida por radiação micro-ondas, Programa de pós-graduação em química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012, pp. 144.
 42. Bizzi, C. A., Barin, J. S., Muller, E. I., Schmidt, L., Nobrega, J. A., Flores, E. M. M. Evaluation of oxygen pressurized microwave-assisted digestion of botanical materials using diluted nitric acid, *Talanta* 83 (2011) 1324-1328.

43. Bizzi, C. A., Flores, E. L. M., Nobrega, J. A., Oliveira, J. S. S., Schmidt, L., Mortari, S. R. Evaluation of a digestion procedure based on the use of diluted nitric acid solutions and H₂O₂ for the multielement determination of whole milk powder and bovine liver by ICP-based techniques, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 332-338.
44. Bizzi, C. A., Nobrega, J. A., Barin, J. S., Oliveira, J. S. S., Schmidt, L., Mello, P. A., Flores, E. M. M. Effect of simultaneous cooling on microwave-assisted wet digestion of biological samples with diluted nitric acid and O₂ pressure, *Analytica Chimica Acta* 837 (2014) 16-22.
45. Pardino, R. B., Dalla Vecchia, P., Mendes, A. L. G., Bizzi, C. A., Mello, P. A., Duarte, F. A., Flores, E. M. M. Determination of toxic elements in yerba mate by ICP-MS after diluted acid digestion under O₂ pressure, *Food Chemistry* 263 (2018) 37-41.
46. Pereira, J. S. F., Wiltsche, H., Knapp, G. Chapter 7 - Microwave-Assisted Ultraviolet Digestion, E. M. M. Flores (Ed.) *Microwave-assisted sample preparation for trace element analysis*, Elsevier, Amsterdam, 2014, pp. 205-229.
47. Iop, G. D., Krzyzaniak, S. R., Silva, J. S., Flores, E. M. M., Costa, A. B., Mello, P. A. Feasibility of microwave-assisted ultraviolet digestion of polymeric waste electrical and electronic equipment for the determination of bromine and metals (Cd, Cr, Hg, Pb and Sb) by ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 32 (2017) 1789-1797.
48. Hartwig, C. A., Pereira, R. M., Rondan, F. S., Cruz, S. M., Duarte, F. A., Flores, E. M. M., Mesko, M. F. The synergic effect of microwave and ultraviolet radiation for chocolate digestion and further determination of As, Cd, Ni and Pb by ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 31 (2016) 523-530.
49. Picoloto, R. S., Pereira, R., Costa, V. C., Hartwig, C., Pereira, C. M. P., Colepicolo, P., Duarte, F. A., Mesko, M. Investigating essential and toxic elements in Antarctic macroalgae using a green analytical method, *Journal of Applied Phycology* 29 (2016).

50. Mesko, M. F., Picoloto, R. S., Ferreira, L. R., Costa, V. C., Pereira, C. M. P., Colepicolo, P., Muller, E. I., Flores, E. M. M. Ultraviolet radiation combined with microwave-assisted wet digestion of Antarctic seaweeds for further determination of toxic elements by ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 30 (2015) 260-266.
51. Picoloto, R. S., Pereira, R. M., Costa, V. C., Hartwig, C. A., Pereira, C. M. P., Colepicolo, P., Duarte, F. A., Mesko, M. F. Investigating essential and toxic elements in Antarctic macroalgae using a green analytical method, *Journal of Applied Phycology* 29 (2017) 741-749.
52. Souza, J. P., Barela, P. S., Kellermann, K., Santos, M. F. P., Moraes, D. P., Pereira, J. S. F. Microwave-assisted ultraviolet digestion: an efficient method for the digestion of produced water from crude oil extraction and further metal determination, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 32 (2017) 2439-2446.
53. Barela, P. S., Souza, J. P., Pereira, J. S. F., Marques, J. C., Muller, E. I., Moraes, D. P. Development of a microwave-assisted ultraviolet digestion method for biodiesel and subsequent trace elements determination by SF-ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 33 (2018) 1049-1056.
54. Pereira, J. S., Picoloto, R. S., Pereira, L. S., Guimaraes, R. C., Guarnieri, R. A., Flores, E. M. High-efficiency microwave-assisted digestion combined to in situ ultraviolet radiation for the determination of rare earth elements by ultrasonic nebulization ICPMS in crude oils, *Analytical Chemistry* 85 (2013) 11034-11040.
55. Zhang, X., Wang, Y., Li, G., Qu, J. Oxidative decomposition of azo dye C.I. Acid Orange 7 (AO7) under microwave electrodeless lamp irradiation in the presence of H₂O₂, *Journal of Hazardous Materials* 134 (2006) 183-189.
56. Corazza, G., Decomposição de carvão com elevado teor de cinzas para determinação simultânea de As, Cd, Hg, Pb e S por ICP-OES, Programa de pós-graduação em química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015, pp. 135.

57. Multiwave 3000 Microwave Sample Preparation System, Software version v1.27-Synt, Anton Paar GmbH, 2003.
58. 22 - Vanadium, Niobium and Tantalum, N. N. Greenwood, A. Earnshaw (Eds.) Chemistry of the Elements, Butterworth-Heinemann, Oxford, 1997, pp. 976-1001.
59. 27 - Nickel, Palladium and Platinum, N. N. Greenwood, A. Earnshaw (Eds.) Chemistry of the Elements, Butterworth-Heinemann, Oxford, 1997, pp. 1144-1172.
60. 26 - Cobalt, Rhodium and Iridium, N. N. Greenwood, A. Earnshaw (Eds.) Chemistry of the Elements Butterworth-Heinemann, Oxford, 1997, pp. 1113-1143.
61. Picoloto, R. S., Wiltsche, H., Knapp, G., Mello, P. A., Barin, J. S., Flores, E. M. M. Determination of inorganic pollutants in soil after volatilization using microwave-induced combustion, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 86 (2013) 123-130.
62. Mello, P. A., Diehl, L. O., Oliveira, J. S. S., Muller, E. I., Mesko, M. F., Flores, E. M. M. Plasma-based determination of inorganic contaminants in waste of electric and electronic equipment after microwave-induced combustion, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 105 (2015) 95-102.
63. Picoloto, R. S., Wiltsche, H., Knapp, G., Barin, J. S., Flores, E. M. M. Mercury determination in soil by CVG-ICP-MS after volatilization using microwave-induced combustion, *Analytical Methods* 4 (2012) 630-636.
64. Würfels, M., Jackwerth, E., Stoepler, M. Residues from biological materials after pressure decomposition with nitric acid: Part 1. Carbon conversion during sample decomposition, *Analytica Chimica Acta* 226 (1989) 1-16.
65. Würfels, M., Jackwerth, E., Stoepler, M. Residues from biological materials after pressure decomposition with nitric acid: Part 2. Identification of the reaction products, *Analytica Chimica Acta* 226 (1989) 17-30.