

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Giovanna Menezes Iozzi

**AVALIAÇÃO DAS IMPUREZAS ELEMENTARES DO MEDICAMENTO CAPTOPRIL
POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUTIVAMENTE
ACOPLADO**

Rio de Janeiro

2017

Giovanna Menezes Iozzi

**AVALIAÇÃO DAS IMPUREZAS ELEMENTARES DO MEDICAMENTO CAPTOPRIL
POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUTIVAMENTE
ACOPLADO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de Especialista em Vigilância Sanitária.

Preceptor: Lísia Maria Gobbo dos Santos
Tutor: Silvana do Couto Jacob

Rio de Janeiro

2017

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Iozzi, Giovanna Menezes

Avaliação das impurezas elementares do medicamento Captopril por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado. / Giovanna Menezes Iozzi – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2017.

60 f.: il., tab.

Trabalho de conclusão do curso (Especialista em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2017.

Preceptora: Lísia Maria Gobbo dos Santos

Tutora: Silvana do Couto Jacob

1. Captopril. 2. Contaminação de Medicamentos. 3. Espectrofotometria Atômica. 4. Controle de Qualidade. I. Título

Giovanna Menezes Iozzi

**AVALIAÇÃO DAS IMPUREZAS ELEMENTARES DO MEDICAMENTO CAPTOPRIL
POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUTIVAMENTE
ACOPLADO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de Especialista em Vigilância Sanitária.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Lucia Helena Pinto Bastos (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Leticia Kgele Lignani (Mestre)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Lisia Maria Gobbo dos Santos (Doutora) – Preceptora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Silvana do Couto Jacob (Doutora) – Tutora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dedico esse trabalho as pessoas que me incentivaram, desde o primeiro dia, a entrar, realizar e concluir mais esta etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais essa oportunidade que me deu,

Aos meus avós que tomam conta de mim lá do céu,

Aos meus pais que me incentivaram a realizar essa etapa da minha vida,

Aos meus irmãos e minha cunhada que me apoiaram e me motivaram durante esses dois anos,

Ao meu namorado que esteve ao meu lado em todos os momentos, acolhendo, suportando, motivando e amando desde o primeiro dia,

A minha prima Maria Eleonora que foi a pessoa que me informou e incentivou sobre o programa de residência,

A meus primos e primas que sempre se alegraram comigo ao ver meu crescimento profissional,

Aos meus irmãos de fé, aqueles que Deus me deu e colocou ao meu lado que se alegram comigo nos momentos bons e que me levantam nos momentos difíceis,

As pessoas do Setor de Elementos Inorgânicos que me receberam de braços abertos trazendo para esses dois anos muitos momentos divertidos e cheios de alegria,

Ao técnico do laboratório que me ajudou e apoiou tantas e tantas vezes ao longo destes dois anos.

As minhas duas queridas chefes que me acolheram, motivaram e orientaram a cada dia durante esses dois anos que se passaram.

RESUMO

A segurança e eficácia de um medicamento podem ser influenciadas pela presença de impurezas provenientes dos insumos farmacêuticos ativos (IFAs), de outras substâncias usadas para composição do produto final ou de recipientes utilizados no processo produtivo. As impurezas podem produzir, muitas vezes, efeitos indesejáveis, prejudicando ou até mesmo anulando os benefícios buscados na administração do medicamento. Para o controle destas impurezas, é fundamental que se tenha informações quantitativas específicas de cada analito, não só para atender as especificações das legislações, mas também para atender as necessidades das indústrias farmacêuticas que precisam proporcionar segurança e eficácia aos medicamentos destinados ao consumo humano. Atualmente, na farmacopéia brasileira, as análises de impurezas elementares são solicitadas apenas para o controle dos insumos farmacêuticos ativos (IFA) ou excipientes, mas não para o produto final, o medicamento. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar uma metodologia analítica, seletiva, sensível, precisa e exata, capaz de atender as atuais diretrizes da farmacopéia americana em relação à análise de impurezas elementares em medicamentos e aplicá-la na análise de seis medicamentos do antihipertensivo captopril e de uma amostra do IFA do captopril, levando em consideração ingestão, via de administração e a toxicidade de cada elemento. A técnica escolhida foi a espectrometria atômica de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). Foram determinados Ba, Co, Cu, Cr, Fe, Li, Ni, V, Zn. Para cada elemento os parâmetros de validação da metodologia analítica foram estudados de acordo com a normativa do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) e pelo capítulo 233 da USP. A avaliação da ingestão foi realizada de acordo com a dose diária permitida (PDE) preconizada no capítulo 232 da USP. Os resultados obtidos demonstraram que a técnica desenvolvida foi capaz de atender as necessidades pretendidas de seletividade, sensibilidade, precisão e exatidão. Todas as amostras analisadas apresentaram resultados satisfatórios em relação aos limites máximos exigidos pela USP, valores de concentração inferiores a 1,29 mg/kg para todos os elementos analisados, com exceção dos teores de Ferro que variaram de 1,29 a 1,70 mg/Kg. Os resultados para todos os elementos inclusive o Ferro, cujas concentrações foram mais elevadas em todos os produtos, resultaram em doses diárias inferiores aquelas preconizadas para medicamentos de uso contínuo.

Palavras-Chave: Impurezas elementares, ICP OES, Captopril.

ABSTRACT

The safety and effectiveness of a medicinal product may be influenced by the presence of impurities from active pharmaceutical ingredients (API), from other substances used in the composition of the final product or from the containers used in the production process. Impurities can often produce undesirable effects, impairing or even nullifying the benefits sought when administering the drug. In order to control these impurities, it is essential to obtain specific quantitative information for each analyte, not only to meet legislation specifications, but also to meet the needs of the pharmaceutical industries, that are required to provide for the safety and effectiveness of the medicinal products intended to for human consumption. Currently, the determination of elemental impurities are only required for the control of active pharmaceutical ingredients (API) or excipients, but not for the final product, the drug itself. The present study aimed to develop and validate a selective, sensitive, precise and accurate analytical methodology able to meet the current guidelines of the American pharmacopoeia regarding the analysis of elemental impurities in drugs and apply the developed methodology in the analysis of six different antihypertensive drugs, captopril and a sample of captopril API, taking into account the intake, administration route and toxicity of each element. The technique chosen for this end was inductively coupled plasma optical emission atomic spectrometry (ICP OES). The values of Ba, Co, Cu, Cr, Fe, Li, Ni, V and Zn were determined, and the validation parameters of the analytical methodology for each element were evaluated according to the National Institute of Metrology, Quality and Technology (INMETRO) and USP's Chapter 233. The evaluation of intake values was performed according to the maximum daily doses (MDD) recommended by chapter 232 of USP. The results demonstrated that the developed technique was able to meet the desired needs for selectivity, sensitivity, precision and accuracy. All analyzed samples presented satisfactory results regarding the maximum limits dictated by USP and concentrations lower than 1.29 mg/kg for all analyzed elements, with the exception of iron, that ranged from 1.29 to 1.70 mg/kg. The results for all elements including iron, whose concentrations were the highest in all products, resulted in lower daily doses than those recommended for continuous use drugs.

Key-words: Elemental impurities. ICP OES. Captopril

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Prevalência da hipertensão arterial ($\geq 140/90$ mmHg) em cidades brasileiras.....	19
Figura 2 - Estrutura química da Molécula do captopril.....	20
Figura 3 - Mecanismo de ação do captopril: (a) funcionamento normal do organismo; (b) resposta do organismo frente ao uso do captopril.	22
Figura 4 - Representação do princípio da espectrometria atômica.....	25
Figura 5 - Representação das 4 diferentes técnicas espectrométricas.	25
Figura 6 - Etapas do processo que uma amostra passa ao ser introduzida no ICP OES.	26
Figura 7 - Exemplo de curva analítica com identificação dos parâmetros: Faixa de Trabalho, Faixa Linear, Limite de Detecção, Limite de Quantificação, e Sensibilidade.	28
Figura 8 - Processo de digestão da amostra.....	32
Figura 9 - Diagrama de causa e efeito (diagrama de espinha de peixe) do método em estudo....	39
Figura 10 - Curva de calibração em meio aquoso e adição padrão em solução matriz para o elemento vanádio.	42
Figura 11 - Gráfico com as contribuições, em porcentagem, de cada item considerado para o cálculo da incerteza para a determinação de Bário.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Limites máximos preconizados para diversos elementos nos compêndios: brasileiro (FB), americano (USP) e europeu (EMA).....	16
Tabela 2 - Limite de exposição diária das impurezas elementares para as diferentes formas farmacêuticas.....	17
Tabela 3 - Condições do programa do micro-ondas.....	32
Tabela 4 - Elementos selecionados para o estudo e os seus respectivos comprimentos de onda selecionados.....	34
Tabela 5 - Parâmetros operacionais usados no ICP OES.....	34
Tabela 6 - Resultado do Teste <i>T-Student</i> entre a curva de adição e a curva aquosa para os oito elementos, bário, cobalto, cobre, cromo, ferro, lítio, níquel e vanádio.....	40
Tabela 7 - Intensidade do sinal analítico e cálculo de limite de detecção e limite de quantificação para os elementos Bário, Ferro e Lítio.....	43
Tabela 8 - Equação da reta e coeficientes de correlação linear obtido para cada um dos oito elementos estudados.....	45
Tabela 9 - Resultados para a exatidão relacionados ao ensaio do método analítico estudado para todos os elementos: bário, cobalto, cromo, cobre, ferro, lítio, níquel, vanádio a partir do ensaio de recuperação.....	46
Tabela 10 - Repetibilidade do método analítico para os elementos bário, cobalto, cromo, cobre, ferro, lítio, níquel e vanádio.....	48
Tabela 11 - Avaliação da precisão intermediária com seu desvio padrão e DPR respectivo para cada um dos elementos: bário, cobalto, cromo, cobre, ferro, lítio, níquel, vanádio.....	49
Tabela 12 - Resultado do teste <i>t</i> entre as duas análises feitas para a avaliação da precisão intermediária para cada um dos elementos: bário, cobalto, cromo, cobre, ferro, lítio, níquel, vanádio.....	50
Tabela 13 - Valores da incerteza relativa de cada um dos elementos avaliados na metodologia: bário, cobalto, cromo, cobre, ferro, lítio, níquel e vanádio.....	51
Tabela 14 - Comparação dos resultados das concentrações dos elementos bário, cobre, ferro e lítio em alíquotas de um mesmo produto usando comprimidos inteiros e comprimidos triturados e homogeneizados.....	53
Tabela 15 - Teores de ferro em amostras de diferentes lotes das marcas A e B de captopril 25 mg.....	54
Tabela 16 - Teor de ferro nas diferentes marcas de captopril 25 mg e na amostra do IFA.....	55
Tabela 17 - Avaliação da exposição diária do ferro com o intervalo de concentração mínima e máxima de exposição diária e seu respectivo valor de exposição diária permitida.....	57

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	Análise da Variância
Ag	Prata
AVE	Acidente Vascular Encefálico
As	Arsênio
Au	Ouro
BB	Betabloqueadores
BCC	Bloqueadores de Canais de Cálcio
BRA	Bloqueadores dos Receptores da Agiontensina II
Ba	Bário
CV AAS	Espectrômetro Atômico de Absorção com Geração de Vapor Frio
Cd	Cádmio
Co	Cobalto
Cr	Cromo
Cu	Cobre
DQ	Departamento de Química
DRP	Desvio Padrão Relativo
DIU	Diuréticos
EMA	Agência Europeia de Medicamentos
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
F AAS	Espectrômetro de Absorção Atômica com Chama
Fe	Ferro
GF AAS	Espectrômetro de Absorção Atômica com Forno de Grafite
g	Gramas
HA	Hipertensão Arterial
Hg	Mercúrio
HG AAS	Espectrômetro de Absorção Atômica com Geração de Hidretos
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
ICP OES	Espectrômetro de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ICH	Comissão Internacional Harmonizada
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
ICP-MS	Espectrômetro de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
IC	Insuficiência Cardíaca
IECA	Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina
Ir	Íridio
K	Potássio
LQ	Limite de Quantificação
LD	Limite de Detecção
L	Litro
Li	Lítio
MMQO	Método dos Mínimos Quadrados Ordinários
mg	Miligrama
Mn	Manganês

Mo	Molibdênio
Na	Sódio
Ni	Níquel
Os	Ósmio
PDE	Limite de Exposição Diária
POP	Procedimento Operacional Padrão
PROVEME	Programa Nacional de Verificação da Qualidade de Medicamentos.
Pb	Chumbo
Pd	Paládio
Pt	Platina
Rh	Ródio
Ru	Rutênio
SQR	Substância Química de Referência
SUS	Sistema Único de Saúde
SSQR	Setor de Substâncias Químicas de Referência
Sb	Antimônio
Se	Selênio
Tl	Tálio
USP	Farmacopéia Americana
W	Tungstênio
Zn	Zinco
µg	Micrograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	HIPERTENSÃO ARTERIAL NO BRASIL	19
1.2	MEDICAMENTO CAPTOPRIL.....	20
1.3	OS ELEMENTOS INORGÂNICOS	22
1.4	ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO.....	24
1.5	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	27
1.6	JUSTIFICATIVA	29
2	OBJETIVO.....	30
3	METODOLOGIA	31
3.1	MATERIAIS E REAGENTES	31
3.1.1	Vidrarias e materiais utilizados na análise.....	31
3.1.2	Reagentes	31
3.1.3	Equipamento	31
3.2	AMOSTRA	31
3.3	METODOLOGIA ANALÍTICA	32
3.3.1	Preparo e análises das amostras	32
3.3.2	Escolha dos analitos.....	33
3.3.3	Validação	34
3.3.3.1	<i>Seletividade</i>	35
3.3.3.2	<i>Limite de quantificação e limite de detecção</i>	35
3.3.3.3	<i>Linearidade</i>	35
3.3.3.4	<i>Exatidão (ensaio de recuperação)</i>	36
3.3.3.5	<i>Precisão (repetibilidade e precisão intermediária)</i>	37
3.3.4	Incerteza.....	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1	ESTUDO DA METODOLOGIA ANALÍTICA	40
4.1.1	Validação	40
4.1.2	Seletividade.....	40
4.1.3	Limite de quantificação e limite de detecção.....	43
4.1.4	Linearidade	44
4.1.5	Exatidão (ensaio de recuperação)	45
4.1.6	Precisão (repetibilidade e precisão intermediária).....	47

4.2	INCERTEZA	51
4.3	ANÁLISE DAS AMOSTRAS	52
5	CONCLUSÃO	58
6	PERSPECTIVAS DO TRABALHO	59
7	REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

O controle de qualidade de um medicamento é fundamental para garantir sua segurança e eficácia. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o controle de qualidade é um conjunto de medidas destinadas a verificar se cada lote de um medicamento foi produzido de acordo com as normas exigidas nos compêndios oficiais quanto a atividade, pureza, eficácia e inocuidade (ANVISA, 2006). Uma das análises preconizadas para o controle de um produto farmacêutico é a avaliação da presença de impurezas elementares. A Farmacopéia Brasileira tem em seu escopo vários ensaios voltados para elementos inorgânicos, utilizando análise por volumetria de precipitação e por espectrometria atômica (FB, 2010a). Esses ensaios são solicitados para o controle de qualidade de insumos farmacêuticos ativos, (IFA) ou excipientes, mas não para o produto final, o medicamento. Além disto, são indicados para o controle de qualidade dos IFA's apenas os chamados “metais pesados” (Cádmio, Arsênio, Chumbo e Mercúrio).

Em 2008, a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) publicou uma nova diretriz, capítulo 5.20, voltada para “resíduos de catálises metálicas e reagentes metálicos” (WOLLEN et al, 2015). Neste documento se ressalta a importância da análise de impurezas metálicas não só nos IFA's e excipientes, mas também nos produtos finais, medicamentos, visto que as impurezas podem vir de reações de catálises e reagentes metálicos usados na produção dos IFA's, excipientes de equipamentos utilizados na produção dos medicamentos e dos produtos de limpeza entre outros (EMA, 2008). Além disto, independentemente de onde venha a contaminação é necessário saber se o produto final está contaminado e qual o nível de concentração (EMA, 2008), já que muitos metais não precisam de altas concentrações para apresentar um elevado potencial tóxico ao ser humano.

Em 2014, a Farmacopéia Americana (USP) introduziu dois novos capítulos referentes a impurezas elementares: capítulos 232 e 233 (2016). Estes assim como o capítulo 5.20 da EMA, ressaltam a importância da avaliação de impurezas elementares não só nos insumos farmacêuticos ativos e excipientes, mas também nos medicamentos (USP, 2016a). O capítulo 232 da USP define quais elementos devem ser analisados e quais concentrações são aceitáveis, enquanto o capítulo 233 é voltado para os métodos e processos de validação das metodologias analíticas sugeridas para detectar e quantificar as impurezas elementares.

Os limites máximos preconizados para IFA, excipientes ou produto final para cada

elemento em diferentes compêndios oficiais são apresentados na tabela 1. Além de limites para o produto, a USP e a EMA estabelecem limites de exposição diária (PDE) aos elementos inorgânicos provenientes do uso de diferentes formas farmacêuticas, que são descritos na Tabela 2.

Tabela 1 - Limites máximos preconizados para diversos elementos nos compêndios: brasileiro (FB), americano (USP) e europeu (EMA).

Elemento	FB 5ed. 2010 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	USP 39 2016 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	EMA 2008 ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Ag	*	15	-
As	1,5	1,5	-
Au	-	10	-
Ba	*	140	-
Cd	0,5	0,5	-
Co	-	5	-
Cr	25	1100	25
Cu	250	300	250
Fe	*	-	1300
Hg	1,5	3	-
Ir	10	10	10
Li	*	55	-
Mn	250	-	250
Mo	25	300	25
Ni	25	20	25
Os	10	10	10
Pb	1	0,5	-
Pd	10	10	10
Pt	10	10	10
Rh	10	10	10
Ru	10	10	10
Sb	-	120	-
Se	-	15	-
Sn	*	600	-

Tl	-	0,8	-
V	25	10	25
Zn	-	-	1300

* Possui descrição do ensaio, mas sem limite máximo definido;

- Não consta na lista para ser analisado

Tabela 2 - Limite de exposição diária das impurezas elementares para as diferentes formas farmacêuticas.

Elemento	PDE Oral (µg/dia)	PDE Paraenteral (µg/dia)	PDE Inalatório (µg/dia)
Cd	5	2	2
Pb	5	5	5
As	15	15	2
Hg	30	3	1
Co	50	5	3
V	100	10	1
Ni	200	20	5
Tl	8	8	8
Au	100	100	1
Pd	100	10	1
Ir	100	10	1
Os	100	10	1
Rh	100	10	1
Ru	100	10	1
Se	150	80	130
Ag	150	10	7
Pt	100	10	1
Li	550	250	25
Sb	1200	90	20
Ba	1400	700	300
Mo	3000	1500	10
Cu	3000	300	30

Sn	6000	600	60
Cr	11000	1100	3

Fonte: USP, 2016 adaptada.

Tanto na Farmacopéia Americana quanto na Farmacopéia Brasileira têm-se indicações de metodologia de análise para realizar o controle de qualidade dos IFAs e alguns produtos farmacêuticos. Na farmacopéia brasileira são recomendados ensaios limites por meio de métodos semi-quantitativos para análise de chumbo, cálcio, magnésio, ferro, arsênio, alumínio e quantitativos utilizando diferentes técnicas espectrométricas como: absorção atômica com chama (F AAS), geração de hidretos (HG AAS), geração de vapor frio (CV AAS) e forno de grafite (GF AAS); emissão atômica (ICP OES) e espectrometria de massa (ICP-MS). A técnica de espectrometria atômica é a recomendada para quantificar os elementos, por ser uma técnica sensível e capaz de detectar níveis de concentração da ordem de mg/kg (ppm) e $\mu\text{g/kg}$ (ppb) (FB, 2010a).

Recentemente alguns estudos voltados para à análise das impurezas elementares vêm sendo realizados, e os resultados encontrados confirmam a necessidade da inclusão das análises elementares para o controle de qualidade de medicamentos. Um estudo em IFA de captopril realizado por Muller (2015) e pesquisadores analisaram 14 elementos (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ir, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru e V) por ICP-MS e encontraram 3,41 $\mu\text{g/g}$ de Cr, 0,027 $\mu\text{g/g}$ de V, 0,49 $\mu\text{g/g}$ de As, 0,006 $\mu\text{g/g}$ de Cd, 0,14 $\mu\text{g/g}$ de Mo, 0,16 $\mu\text{g/g}$ de Pb. Os outros elementos apresentaram concentrações abaixo do LQ do método aplicado que foi de 0,002 $\mu\text{g/g}$ para As, 0,001 $\mu\text{g/g}$ para Cd, 0,015 $\mu\text{g/g}$ para Cr, 0,009 $\mu\text{g/g}$ para Cu, 0,014 $\mu\text{g/g}$ para Hg, 0,003 $\mu\text{g/g}$ para Ir, 0,001 $\mu\text{g/g}$ para Mo, 0,005 $\mu\text{g/g}$ para Ni, 0,004 $\mu\text{g/g}$ para Pb, 0,005 $\mu\text{g/g}$ para Pd, 0,009 $\mu\text{g/g}$ para Pt, 0,003 $\mu\text{g/g}$ para Rh, 0,004 $\mu\text{g/g}$ para Ru e 0,002 $\mu\text{g/g}$ para V (MULLER, 2015). Em outro estudo do IFA do captopril, que também contemplou análises para o produto final, comprimido de 25mg e de 50mg de captopril, Wollein (2015) utilizou diferentes técnicas da espectrometria para quantificar 20 elementos: V, Co, Mn, Ni, Mo, Ru, Rh, Pd, Cd, Sn, Sb, Os, Ir, Pt e Pb foram analisados por ICP-MS, Cr por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, As por espectrometria de absorção atômica com geração de hidreto, Hg por espectrometria de absorção atômica por geração de vapor e Fe, Cu e Zn por ICP OES. Dentre os 20 elementos analisados no estudo, foi encontrado apenas teores de As 0,03 $\mu\text{g/g}$ para uma amostra de IFA, 0,1 $\mu\text{g/g}$ para uma segunda amostra de

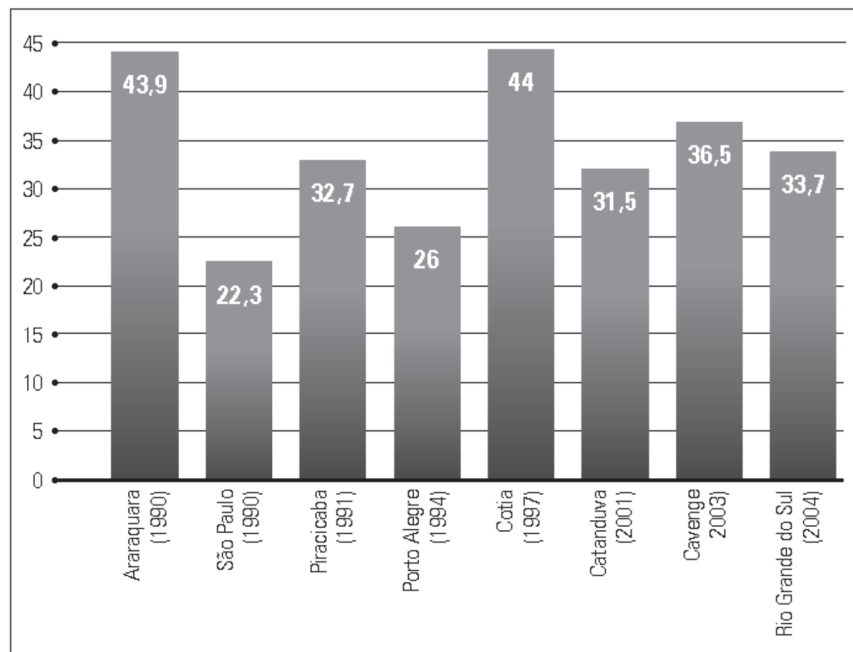
IFA e 0,1 µg/g no comprimido de 50mg de captopril. Outro estudo de bastante relevância foi o apresentado Por Li et al. (2015), neste foi avaliada a presença das impurezas elementares Cd, As Pb, Hg Co, V, Ni, Tl, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Se, Ag, Pt, Li, Sb, Ba, Mo, Cu, Sn e Cr por ICP-MS em várias amostras de excipientes usados pelas indústrias farmacêuticas.

1.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL NO BRASIL

A hipertensão arterial (HA) é uma doença silenciosa, multifatorial, que se caracteriza pela sustentação de uma pressão sistólica maior ou igual a 140 mmHg e/ou uma pressão diastólica maior ou igual a 90 mmHg, sendo fator de risco para eventos como morte súbita, acidente vascular encefálico (AVE), infarto agudo do miocárdio (IAM), insuficiência cardíaca (IC), entre outros (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016).

Hoje, no Brasil, a hipertensão acomete cerca de 32,5% dos adultos e 60% dos idosos, contribuindo, de forma direta ou indireta, com 50% das mortes de doenças cardiovasculares em todo país (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016) (Figura 1)

Figura 1 - Prevalência da hipertensão arterial ($\geq 140/90$ mmHg) em cidades brasileiras.



Fonte: SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2006 adaptada.

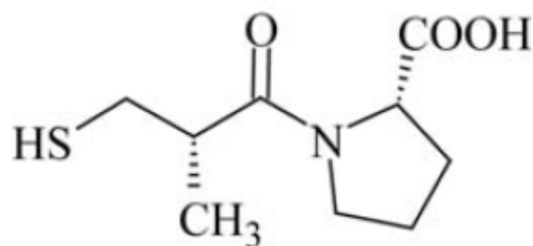
O tratamento da hipertensão pode acontecer de forma medicamentosa ou não. O tratamento não medicamentoso inclui perda de peso, controle nutricional, realização de atividade física, controle de stress entre outros (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016). O tratamento não medicamentoso sozinho nem sempre é capaz de promover a redução da pressão arterial desejada sendo necessário o uso de medicamentos para auxiliar no seu controle.

Existem diferentes classes de medicamentos que podem ser utilizados para a redução da HA como, por exemplo: diuréticos (DIU), agentes de ação central, betabloqueadores (BB), alfabloqueadores, vasodilatadores diretos, bloqueadores de canais de cálcio (BCC), inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA), bloqueadores dos receptores da angiotensina II (BRA), inibidores direto da renina (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016). Dentro de cada classe existe uma gama de medicamentos que podem ser escolhidos para o tratamento sempre indicados conjuntamente com a realização de tratamento não medicamentoso (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016).

1.2 MEDICAMENTO CAPTOPRIL

O primeiro fármaco desenvolvido para o tratamento da hipertensão foi o captopril (DELUCIA *et al.*, 2007), seu nome químico é 1-[(2S)-17 3-mercaptopropil]-L-prolina (Figura 2). Descrito como pó cristalino quase branco ou branco, solúvel em água e em soluções diluídas de hidróxidos alcalinos, facilmente solúvel em metanol e cloreto de metileno, com faixa de fusão entre 105°C e 108°C (FB, 2010b). O captopril é um dos medicamentos mais usados no Brasil para o combate da HA.

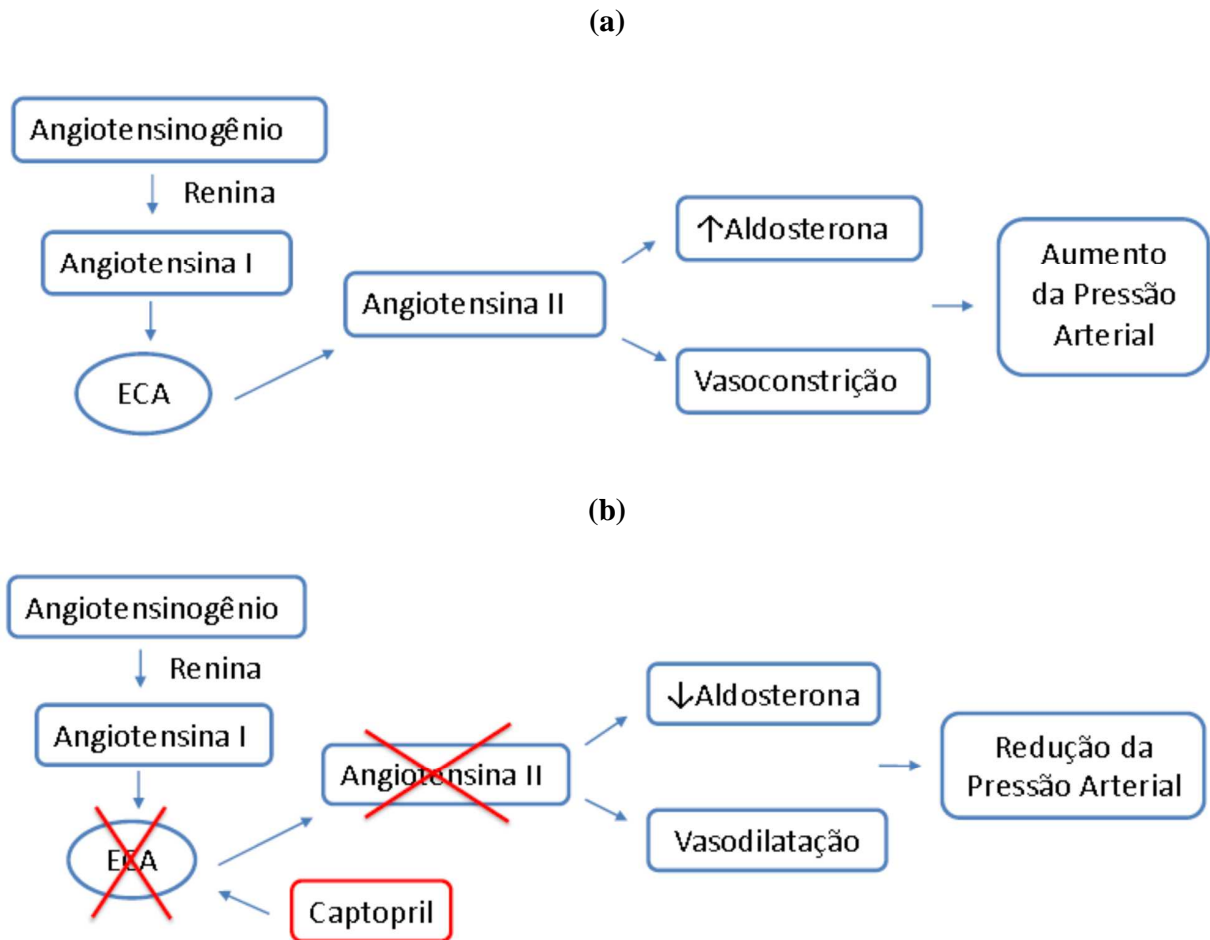
Figura 2 - Estrutura química da Molécula do captopril.



Fonte: FB, 2010b.

O captopril obteve sua patente em 1975 e um ano depois começou a ser comercializado. A descoberta do captopril teve início com uma molécula que potencializava a atuação da bradicinina, um mediador da inflamação com atuação vasodilatadora. Além de potencializar a bradicinina a molécula também atuava inibindo a conversão de angiotensina I em angiotensina II, duas enzimas importantes no processo de vasoconstrição (Figura 3), que eleva a pressão arterial (BARREIRO, 2012). Após algumas alterações estruturais na molécula capaz de inibir a enzima conversora de angiotensina (ECA), a fim de fazer com que tivesse resistência ao pH do trato gastrointestinal e apresentasse maior afinidade pela enzima que já tinha atuação inibitória, chegou-se ao que hoje em dia se conhece como captopril (BARREIRO, 2012).

Figura 3 - Mecanismo de ação do captopril: (a) funcionamento normal do organismo; (b) resposta do organismo frente ao uso do captopril.



Fonte: Próprio autor.

No mercado brasileiro o captopril possui apresentação em forma de comprimidos com dosagem de 12,5 mg, 25 mg e 50 mg (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013), sendo somente a apresentação de 25 mg disponível no Sistema Único de Saúde. Este medicamento tem indicação de uso no caso de hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva, infarto do miocárdio e nefropatia diabética (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

1.3 OS ELEMENTOS INORGÂNICOS

Impurezas são quaisquer substâncias presente em um medicamento ou no IFA que não são o IFA e os excipientes (ANVISA, 2015). As impurezas não trazem benefícios e podem até trazer

malefícios ao usuário de um medicamento, por isso devem ser controladas. As existências das impurezas podem influenciar diretamente a qualidade do produto, o medicamento, por promover reações que geram produtos de degradação e podem ser tóxicos aos pacientes (ICH, 2006b).

As possíveis impurezas presentes no medicamento devem ser avaliadas quanto aos seus aspectos químicos e de segurança. Devem ser identificadas, classificadas e quantificadas de forma a verificar se a concentração presente no produto final oferece algum risco para o paciente.

As impurezas são classificadas, segundo a Comissão Internacional Harmonizada (ICH) em três categorias: orgânicas, inorgânicas e de resíduos de solventes (ICH, 2006a). As impurezas são oriundas dos processos de fabricação ou de armazenamento dos medicamentos e podem ser provenientes de matérias-primas, reagentes, catalisadores, subprodutos, produtos intermediários ou de produtos de degradação (ICH, 2006a). Os solventes residuais podem ser orgânicos ou inorgânicos e são usados como veículos para as preparações medicamentosas: estes têm suas toxicidades conhecidas e podem ser facilmente controlados durante o processo de fabricação. As impurezas inorgânicas (elementares) aparecem devido ao processo de produção, normalmente são conhecidas e identificadas dentro do processo (ICH, 2006a).

As impurezas elementares em um medicamento podem aparecer por diversas fontes, como resíduo de reagentes adicionados para promoção de reações, impurezas de matérias-primas utilizadas no processo de fabricação, por meio de interações em recipientes utilizados na fabricação entre outros (ICH, 2015). As impurezas elementares são classificadas com base na sua toxicidade, limite de exposição diária – PDE, e probabilidade de ocorrência no medicamento. A probabilidade de ocorrência dos elementos no medicamento depende de vários fatores incluindo: a probabilidade de utilização em processos farmacêuticos, a abundância natural e a distribuição ambiental do elemento. A PDE varia de acordo com a via de administração do medicamento, visto que determinados elementos são mais biodisponíveis por determinadas vias de administrações, expondo mais ou menos o paciente usuário do medicamento (ICH, 2015). Segue a classificação das impurezas elementares segundo a Diretriz Q3D da Comissão Internacional Harmonizada (ICH) de 2015:

Classe 1: Arsênio (As), Cádmio (Cd), Chumbo (Pb) e Mercúrio (Hg). Estes são elementos tóxicos para humanos, devendo ser monitorados em todas as fontes de impurezas.

Classe 2: São elementos que tem sua toxicidade dependente da via de administração. São divididos em duas subclasses (2A e 2B) com base na probabilidade relativa de ocorrência no

medicamento.

Classe 2A: Cobalto (CO), Níquel (Ni), Vanádio (V). São os elementos com alta probabilidade de ocorrência. Obrigatória a avaliação de risco de todas as fontes potenciais de impurezas elementares e vias de administração.

Classe 2B: Prata (Ag), Ouro (Au), Irídio (Ir), Ósmio (Os), Paládio (Pd), Platina (Pt), Ródio (Rh), Rutênio (Ru), Selênio (Se) e Tálcio (Tl). Elementos com baixa probabilidade de ocorrência no medicamento. Estes podem ser excluídos da avaliação de risco, a menos que sejam intencionalmente adicionados durante a fabricação do medicamento.

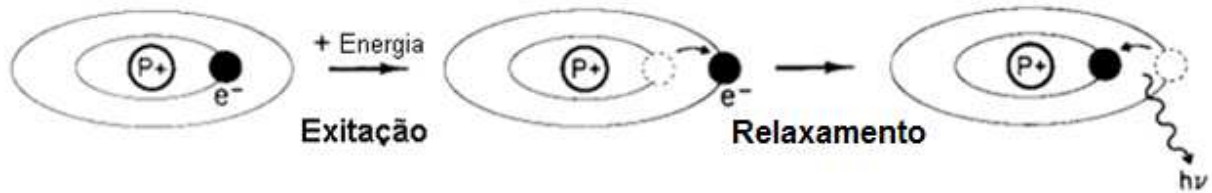
Classe 3: Bário (Ba), Cromo (Cr), Cobre (Cu), Lítio (Li), Molibdênio (Mo), Estanho (Sn), Antimônio (Sb). Elementos com baixa toxicidade por via de administração oral, mas podem apresentar riscos quando administrados pela via inalatória e pela via parenteral, exigindo estudos de avaliação.

Outros elementos: Alumínio (Al), Boro (B), Cálcio (Ca), Ferro (Fe), Potássio (K), Magnésio (Mg), Manganês (Mn), Sódio (Na), Zinco (Zn) e Tungstênio (W). Estes são alguns dos elementos para os quais a PDE não foi estabelecida devido à baixa toxicidade. Porém se adicionados durante o processo produtivo devem ser avaliados segundo legislações próprias de cada País.

1.4 ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO

A espectrometria atômica é uma técnica com alta sensibilidade, muito utilizada na química analítica, capaz de fornecer informações qualitativas, em relação às quais elementos estão presentes na amostra, e quantitativas, informando a concentração dos elementos identificados (BOSS, 2004). O princípio da espectrometria atômica está associado à capacidade de um átomo ou íon absorver e/ou emitir radiação eletromagnética (luz) sendo assim, característica para cada elemento. (BOSS, 2004) (Figura 4).

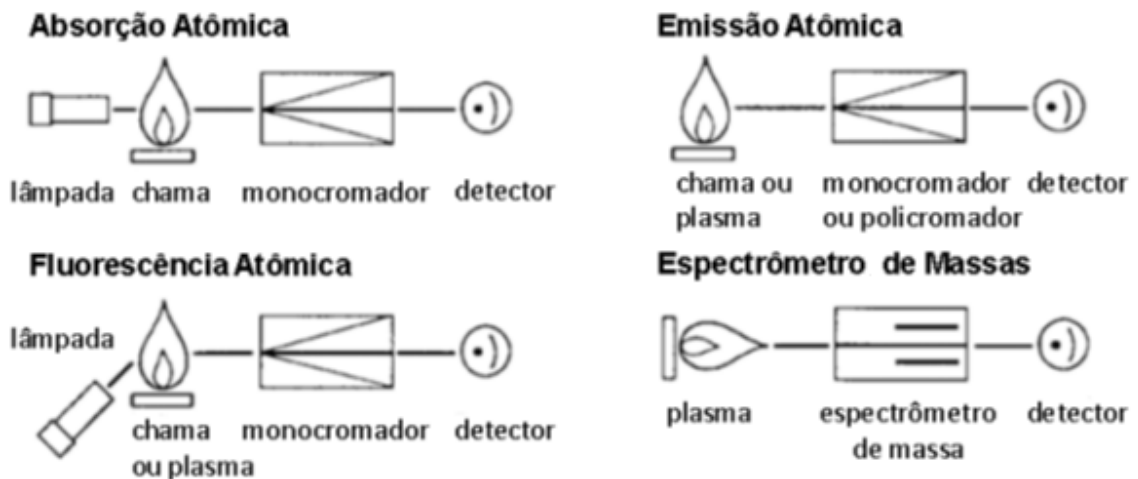
Figura 4 - Representação do princípio da espectrometria atômica.



Fonte: BOSS, 2004 adaptada

Existem quatro diferentes técnicas baseadas na espectrometria atômica: absorção atômica, fluorescência atômica, emissão atômica e espectrometria de massa atômica (Figura 5).

Figura 5 - Representação das 4 diferentes técnicas espectrométricas.



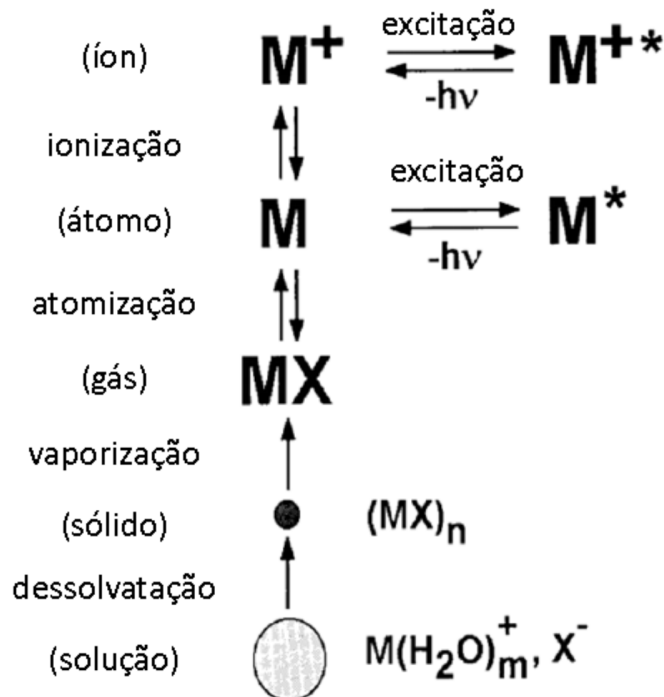
Fonte: BOSS, 2004 adaptada

A espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) é uma técnica muito utilizada para determinações multi-elementares em diferentes matrizes analíticas (PETRY, 2005). No ICP OES as amostras são submetidas a altas temperaturas de um plasma de argônio indutivamente acoplado. O plasma indutivamente acoplado nada mais é que um sistema constituído de um gás inerte, no caso o argônio, que depois de uma descarga elétrica tem seus átomos e íons em estado excitado, para através de colisões com os átomos e íons da amostra excitá-

los (BOSS, 2004).

A alta temperatura do plasma promove a separação dos átomos e/ou íons presentes na amostra e faz com que eles se choquem, adquirindo energia suficiente para que os elétrons sejam levados para um estado excitado, instável e com alto nível energético. Após chegarem ao estado excitado, os elétrons dos átomos e/ou íons tendem a voltar para um estado mais estável, com nível energético menor, emitindo fótons de luz (Figura 6). A intensidade da luz emitida é proporcional a população atômica resultante de uma solução, permitindo assim a quantificação dos elementos presentes na amostra. Cada elemento tem características próprias de energia, com informações únicas de absorção e/ou emissão de luz (comprimento de onda), permitindo ser a técnica específica para cada elemento (BOSS, 2004). Na figura 6 estão apresentados os fenômenos físico-químicos que ocorrem quando uma solução amostra é introduzida no plasma de argônio.

Figura 6 - Etapas do processo que uma amostra passa ao ser introduzida no ICP OES.



Fonte: BOSS, 2004 adaptada

Uma das principais vantagens da ICP OES é a capacidade de excitar um grande número de átomos e íons diferentes ao mesmo tempo, permitindo a técnica realizar análises multi-elementares com a seleção dos comprimentos de onda. Em contrapartida, à medida que se aumenta o número de elementos, aumenta-se a possibilidade de interferência entre elementos que possuem comprimentos de onda próximos (BOSS, 2004).

1.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

O processo de validação de uma metodologia analítica tem como objetivo garantir que os resultados obtidos a partir de uma análise produzam resultados confiáveis, precisos, exatos e com padrão de qualidade pretendido pelo laboratório. É necessário validar metodologias que sejam desenvolvidas pelo laboratório, metodologias não normatizadas, metodologias normatizadas usadas com um objetivo diferente daquele para o qual foi concebida e metodologias normatizadas que tenham sofrido alguma alteração (INMETRO, 2016).

Com a validação de uma metodologia é possível demonstrar sua seletividade, linearidade, seu limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) adequados, faixa de trabalho linear, recuperação e precisão necessárias para o propósito de seu uso.

A seletividade de um método demonstra que ele é capaz de analisar um determinado elemento de forma específica, sem que interferentes influenciem na quantificação do analito. A interferência em uma amostra pode ser proveniente da matriz analisada ou mesmo de outro analito presente na amostra (INMETRO, 2016).

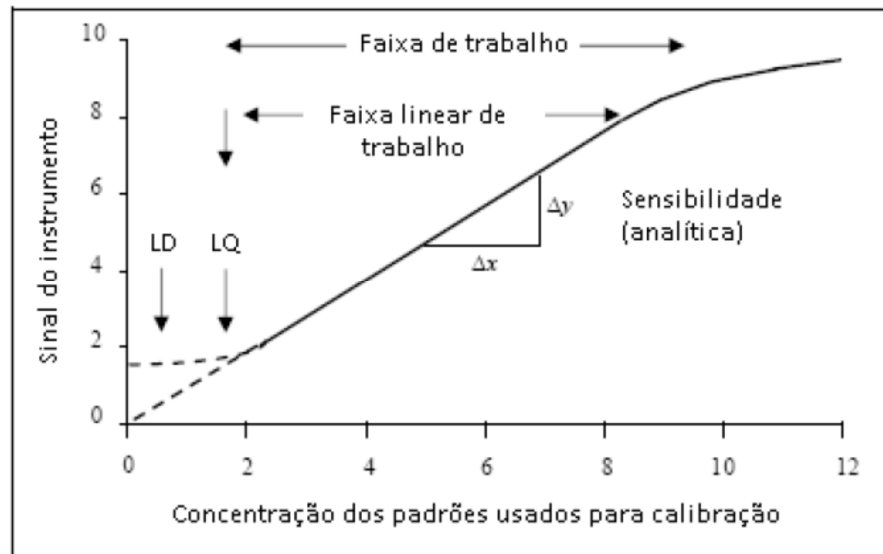
O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) de uma técnica são de extrema importância, visto que um determina a menor concentração em que o equipamento consegue detectar (LD), e a menor concentração em que o equipamento consegue quantificar (LQ), dizer exatamente quanto se tem do analito na amostra. Define-se como LD a menor concentração, que o equipamento consegue detectar sem quantificar e como LQ a menor quantidade que o equipamento consegue quantificar com precisão e exatidão (INMETRO, 2016).

A faixa de trabalho é o intervalo de concentração mínima e máxima que o método possui para ser adequado aos limites mínimos que se deseja atingir, e para os valores que se espera ou que são possíveis de se encontrar como resultado.

Dentro da faixa de trabalho deve-se selecionar uma faixa que seja linear, ou seja, um intervalo de concentrações onde os resultados que o equipamento produz são diretamente

proporcionais às concentrações estabelecidas (INMETRO, 2016). A faixa linear possui um limite mínimo expresso no LQ da técnica (Figura 7).

Figura 7 - Exemplo de curva analítica com identificação dos parâmetros: Faixa de Trabalho, Faixa Linear de Trabalho, Limite de Detecção, Limite de Quantificação, e Sensibilidade.



Fonte: EURACHEM, 2014.

A exatidão de um método analítico é representada pelo grau de concordância entre o valor da concentração da substância de interesse determinado pelo método e o valor verdadeiro da substância na amostra analisada. Para avaliar a exatidão do método foi utilizado o ensaio de recuperação (INMETRO, 2016).

A precisão de uma metodologia representa a variabilidade entre os resultados obtidos de uma análise, quando uma mesma amostra homogênea é analisada diversas vezes pelo método em estudo, sob idênticas condições de análise. A precisão pode ser avaliada por três formas: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetibilidade avalia a variabilidade de amostras feitas em curto período de tempo sob as mesmas condições de análise, instrumentos de medição, mesmo local e mesmas condições operacionais em amostras iguais ou similares. A precisão intermediária avalia a variabilidade das análises das amostras em um mesmo laboratório, onde se tem as mesmas condições de análise e mesmo local, mas se altera o operador, o instrumento de medição ou o tempo, podendo alterar uma ou mais dessas condições. Reprodutibilidade está

relacionada à participação do laboratório em estudos interlaboratoriais em relação a análise estudada, por isso entende-se que nem sempre em uma validação será possível realizar a reprodutibilidade (INMETRO, 2016).

Em paralelo na validação, também, é importante avaliar a incerteza de um método analítico. A incerteza é inerente ao método e reflete a dispersão, ou seja, o intervalo de valores do valor final determinado pelo método. Dessa forma, ela nos indica o intervalo em que o valor determinado está contido (INCQS, 2017a).

1.6 JUSTIFICATIVA

Considerando-se que no Brasil um dos medicamentos mais consumidos é o Captopril e que não se tem conhecimento de estudos sobre a presença de impurezas elementares nesses produtos, pretende-se avaliar se a ICP OES é um método analítico adequado para identificar e quantificar impurezas elementares nesse medicamento de modo a atender às atuais diretrizes da USP e da EMA, levando em consideração ingestão, via de administração e a toxicidade de cada elemento.

O trabalho é de grande relevância para a vigilância sanitária uma vez que o Captopril é um dos medicamentos mais consumido no Brasil, é de uso contínuo (crônico), é um medicamento disponibilizado no Sistema Único de Saúde (SUS) e está contemplado no Programa Nacional de Verificação da Qualidade de Medicamentos (PROVEME) - do Ministério da Saúde.

2 OBJETIVO

Avaliar a incidência de impurezas elementares em medicamentos Captopril comercializados no Rio de Janeiro usando o ICP OES.

- Desenvolver e validar a metodologia utilizando a ICP OES para avaliar impurezas elementares no medicamento captopril;
- Analisar amostra de um insumo farmacêutico ativo (IFA) do medicamento captopril;
- Analisar diferentes fabricantes do medicamento captopril de 25mg.
- Avaliar a qualidade dos medicamentos estudados considerando ingesta, via de administração e a toxicidade de cada elemento segundo os limites de exposição diário (PDE) nas novas diretrizes da farmacopeia.

3 METODOLOGIA

3.1 MATERIAIS E REAGENTES

3.1.1 Vidrarias e materiais utilizados na análise

- Balões volumétricos 50/25 mL
- Tubo tipo falcon de 15 mL
- Pipetas volumétricas

3.1.2 Reagentes

- Ácido nítrico 65% Vetec® - ref. 1565
- Peróxido de hidrogênio 30% Merck® - ref. 1.07210.1000
- Multi-Element Calibration Standard 3 PerkinElmer® - ref. N9300233

3.1.3 Equipamento

- Balança marca Mettler Toledo AG204, com leitura com 4 casas decimais
- Microwave SpeedWave marca Berghof®
- ICP OES 8300 marcas PerkinElmer® com amostrador automático

O equipamento possui um nebulizador concêntrico (Meinhard), câmara de nebulização ciclônica de vidro e funciona com gás argônio com pureza mínima de 99,996%, White Martins®, São Paulo.

3.2 AMOSTRA

O medicamento captopril de 25mg foi escolhido por ser um dos medicamentos mais usados no Brasil e estar contemplado na lista do PROVEME para o ano de 2016.

Seis diferentes fabricantes de amostras foram adquiridas em farmácias comerciais da cidade de Niterói, Rio de Janeiro, sendo que 3 fabricantes de medicamentos genéricos (A, B e C) e 3 fabricantes de medicamentos similares (D, E e F). Dentre os 6 fabricantes selecionados, foram escolhidas 2 fabricantes (A e B) das quais foram comprados 3 diferentes lotes para fazer uma avaliação entre lotes.

Além dos medicamentos selecionados para análise, também foi analisado o IFA lote C3F01,

obtido no Setor de Substâncias Químicas de Referência (SSQR) do INCQS.

3.3 METODOLOGIA ANALÍTICA

Todo o procedimento analítico foi realizado no Setor de Elementos Inorgânicos do Laboratório de Alimentos do DQ, INCQS.

3.3.1 Preparo e análises das amostras

Aproximadamente 0,30g de amostra foi exatamente pesada em recipiente apropriado, à qual foi adicionado 5 mL de ácido nítrico 65% (p/v) e 3 mL de peróxido de hidrogênio 35% (Figura 8). Após a adição dos reagentes as amostras foram digeridas por sistema fechado empregando energia de micro-ondas como fonte de aquecimento e com controle de temperatura e pressão. Um programa específico de temperatura, pressão e potência foi selecionado conforme descrito no POP n° 65.3120.159 revisão 01 do Setor de Elementos Inorgânicos do INCQS (INCQS, 2017b) e está apresentado na Tabela 3.

Figura 8 - Processo de digestão da amostra.



Fonte: o próprio autor

Tabela 3 - Condições do programa do micro-ondas.

Etapas	1	2	3	4	5
Temperatura °C	170	190	210	50	50
Pressão	50	50	50	0	0
Rampa (minutos)	2	2	2	1	1
Tempo (minutos)	5	10	15	10	1

Após a digestão, a solução com a amostra digerida foi transferida para tubo falcon, com capacidade de 15 mL, e o volume completado com água deionizada. Todas as amostras foram feitas em duplicata e o resultado final foi calculado pela média das duplicatas.

O primeiro teste realizado nas amostras foi em relação à homogeneidade de conteúdo dos comprimidos das amostras. Foram feitos dois grupos com 5 alíquotas cada, no primeiro grupo foram pesadas aproximadamente 0,3 g diretamente dos comprimidos, sendo pesado de 2 a 3 (peso médio de 100 – 150mg) comprimidos, no segundo grupo 15 comprimidos foram triturados até formar um pó homogêneo, e deste foi pesado 0,3g. A comparação dos resultados do teste de homogeneidade dos dois grupos de amostras foi feita aplicando-se o teste *T-Student*.

Após a escolha de como proceder para a tomada das alíquotas, as seis amostras foram digeridas em duplicata a fim de quantificar os oito elementos em estudo.

Com os resultados obtidos dos teores de cada um dos elementos determinados nas amostras, foi realizada uma avaliação da PDE utilizando a expressão 1.

$$\text{Dose diária PDE} \geq \text{valor medido} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right) \times \text{máximo dose diária} \left(\frac{\text{g}}{\text{dia}} \right) \quad (1)$$

3.3.2 Escolha dos analitos

A técnica analítica escolhida para o estudo, ICP OES, possibilitou análise multi-elementar na ordem de grandeza de $\mu\text{g/g}$ (ppm).

Dentre os vinte e sete elementos contemplados nos compêndios (USP 39, 2016a; EMA, 2008) foram escolhidos aqueles com a sensibilidade teórica adequada. Dentre os oito elementos escolhidos sete estão contemplados na USP <232> (USP 39, 2016a), um elemento no EMA (EMA, 2008). A escolha dos comprimentos de onda utilizados foi feita baseada em linhas espectrais descritas em outros trabalhos como Tavares (2013) e Stoving et al (2013), e na tabela de comprimento de ondas do manual do ICP OES (PERKIN ELMER CORPORATION, 1998), tendo ao final escolhido os comprimentos de ondas listados na tabela 4. As condições operacionais no espectrômetro estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 4 - Elementos selecionados para o estudo e os seus respectivos comprimentos de onda selecionados.

Elementos	Comprimento de Onda (λ)
Bário	233,527 nm
Cobalto	228,616 nm
Cobre	327,393 nm
Cromo	267,716 nm
Ferro	238,204 nm
Lítio	670,784 nm
Níquel	231,604 nm
Vanádio	292,402 nm

Tabela 5 - Parâmetros operacionais usados no ICP OES.

ICP OES	Condição Operacional
Potência de radiofrequência	1300 W
Fluxo no nebulizador	0,55 L/min
Fluxo do gás auxiliar	0,2 L/min
Fluxo de argônio (plasma)	15,0 L/min
Signal measurement	área
Leitura por replicata	3
Retardamento da leitura	45 s
Vazão da bomba peristáltica	1,5 mL/min
Pressão do gás de argônio	100 psi
Plano de visão	Axial

3.3.3 Validação

A metodologia analítica proposta foi validada de acordo com os documentos DOQ-CGCRE-008 revisão 5 do INMETRO, o capítulo 233 da USP 39 (2016) e a Norma ABNT 17025 da Organização Internacional para Padronização (ABNT, 2005). Os parâmetros de validação estudados estão descritos a seguir.

3.3.3.1 Seletividade

O teste foi realizado com um ensaio comparativo entre as intensidades de duas curvas de calibração com concentrações de 0,03 mg/L, 0,05 mg/L, 0,10 mg/L e 0,15 mg/L. Uma curva foi confeccionada a partir dos padrões de calibração preparados em água deionizada e outra a partir de adição de padrões sobre a matriz do medicamento após amostra digerida. As determinações foram feitas no ICP OES usando os comprimentos de onda selecionados para cada elemento, tabela 5. Os resultados foram tratados no software Excel® e o teste estatístico *T-Student* aplicado.

3.3.3.2 Limite de quantificação e limite de detecção

O LD e o LQ da curva foram determinados a partir da leitura de nove amostras branco, água deionizada com ácido nítrico 1%. Após o preparo, as amostras foram analisadas no ICP OES para os elementos da validação. O cálculo do LD e LQ foram feitos através das equações 2 e 3, de acordo com o documento orientativo do INMETRO (2016).

$$LD = DES. PAD \times 3/b \quad (2)$$

$$LQ = DES. PAD \times 10/b \quad (3)$$

Onde:

LD = Limite de detecção

LQ = Limite de quantificação

DES.PAD = Desvio padrão

b = coeficiente angular

Para os elementos que não foi possível calcular o LD e o LQ através de amostras branco, os mesmos foram calculados experimentalmente com sucessivas diluições até se encontrar a menor concentração/menor valor de propriedade possível de ser quantificado com confiança.

3.3.3.3 Linearidade

Para o teste de linearidade foi construída uma curva analítica com duas variáveis, utilizando a equação da reta, equação 4. Essa equação permitiu a quantificação dos analitos dentro da faixa linear correlacionando as duas variáveis em questão, a intensidade do analito e a concentração.

$$y = a + bx \quad (4)$$

Onde:

y = variável dependente, resposta medida no equipamento, no caso intensidade

x = variável independente, concentração

a = coeficiente linear (intercessão com o eixo x, quando x = 0)

b = coeficiente angular (inclinação da curva analítica, sensibilidade)

A linearidade das curvas de calibração foi avaliada por meio da construção de padrões múltiplos contendo todos os elementos em estudo. Foram preparados padrões de calibração nas concentrações de 0,03 mg/L, 0,05 mg/L, 0,07 mg/L, 0,10 mg/L e 0,15 mg/L. Estes padrões foram preparados em triplicata resultando em três curvas analíticas para cada elemento. As três curvas foram analisadas em sequência no equipamento ICP OES, tendo sido realizadas três leituras para cada ponto.

Os resultados obtidos foram transferidos para software Excel® e trabalhados na Planilha para Avaliação de Premissas (BAZILIO et al, 2012). Através da planilha foram realizados os testes de verificação da existência de valores extremos (outliers) através do teste de Jackknife, teste de normalidade dos resíduos através do teste de Ryan-Joiner, avaliação da autocorrelação dos resíduos (teste de independência) pelo teste de Durbin-Watson, avaliação da homogeneidade das variâncias dos resíduos, onde o p calculado deve ser maior que 0,05, (teste de homoscedasticidade) pelo teste de Brown-Forsythe e por último teste de significância da regressão e do desvio da linearidade (análise da variância - ANOVA) através dos parâmetros dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) para um nível de significância de 0,05 (BAZILIO et al, 2012). Caso algum elemento apresentasse desvio de linearidade seria utilizado o teste de linearidade de Mendel (FUNK, 2007).

3.3.3.4 Exatidão (ensaio de recuperação)

No ensaio de recuperação pode-se estimar a recuperação do analito pela análise de uma amostra fortificada com quantidade conhecida do mesmo, utilizando a equação (5) abaixo:

$$R(\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (5)$$

Onde:

R(%) = recuperação em porcentagem

C1 = concentração do analito na amostra fortificada

C2 = Concentração do analito na amostra não fortificada

C3 = Concentração do analito adicionado à amostra fortificada

Para o ensaio de recuperação foram utilizadas três diferentes concentrações para a fortificação das amostras, tendo sido preparado duas amostras para cada concentração, totalizando 6 amostras fortificadas. As amostras foram fortificadas com a concentração mais baixa (0,03 mg/L), a concentração intermediária (0,07 mg/L) e a concentração mais alta (0,15 mg/L) da curva de calibração. As amostras foram fortificadas para os oito elementos da análise.

A recuperação obtida foi analisada com auxílio do software Excel® levando em consideração os parâmetros do capítulo <233> da USP, de 70 a 150% (2016).

3.3.3.5 Precisão (repetibilidade e precisão intermediária)

A repetibilidade foi avaliada através do cálculo do Desvio Padrão Relativo (DPR) em porcentagem (INMETRO, 2016). O cálculo do DPR é mostrado na expressão 6.

$$\text{DPR} = \left(\frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \right) \times 100 \quad (6)$$

Onde:

DRP = Desvio padrão relativo

DP = Desvio padrão

CMD = Concentração média determinada

A precisão intermediária foi calculada com do desvio padrão da precisão intermediária através da expressão 7 (INMETRO, 2016).

$$S_{i,j,k} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (y_k - y_{\text{médio}})^2} \quad (7)$$

Onde:

$S_{i,j,k}$ = Desvio padrão da precisão intermediária

n = nº de ensaios efetuados por amostra

k = número da amostra

Y_k = resultado obtido para a amostra

$Y_{\text{médio}}$ = média aritmética dos resultados obtidos

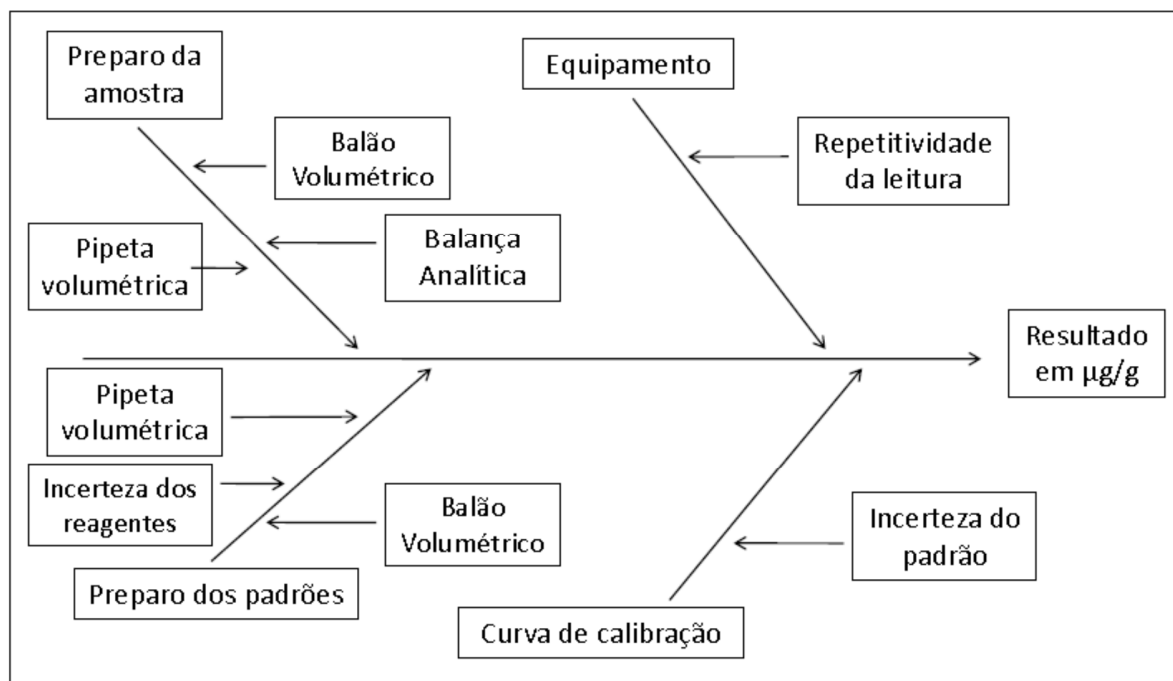
No presente estudo a precisão intermediária foi avaliada através da repetitividade e da precisão intermediária. A repetitividade foi estudada com o preparo, sob as mesmas condições, de 7 alíquotas com concentração de 0,07 mg/L. Com os resultados obtidos utilizando o software Excel® através da expressão 6, foi avaliado o DRP. A precisão intermediária foi avaliada através do preparo de 14 alíquotas de concentração 0,07 mg/L, sob as mesmas condições, mudando somente o analista, (7 alíquotas do analista A e 7 alíquotas do analista B). Com os dados em mãos foi calculado desvio padrão da precisão intermediária utilizando o software Excel® através da expressão 7, e posteriormente transformado em DPR através da expressão 6. A avaliação dos DPR foi feita levando em consideração o limite estabelecido no POP nº 65.3120.170 do Setor de Elementos Inorgânicos do INCQS (INCQS, 2017a).

Por último, a fim de comparar os resultados obtidos no estudo de precisão intermediária para verificar se a variabilidade da análise muda de acordo com o analista, aplicou-se o teste *T-Student*.

3.3.4 Incerteza

Para a realização do cálculo da incerteza levou-se em conta todos os itens que influenciaram na análise (Figura 9). A realização do cálculo da incerteza foi feita com concentrações que variaram de 2,4 µg/g a 3,8 µg/g, dependendo de cada elemento estudado. Para a realização do cálculo de incerteza foi utilizada a planilha de incerteza do POP 65.3120.170 do Setor de Elementos Inorgânicos do INCQS (INCQS, 2017a), onde esta foi calculada para cada um dos elementos analisados.

Figura 9 - Diagrama de causa e efeito (diagrama de espinha de peixe) do método em estudo.



Fonte: Próprio autor.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESTUDO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

4.1.1 Validação

Os resultados dos parâmetros de validação da metodologia analítica proposta neste estudo são apresentados a seguir.

4.1.2 Seletividade

A técnica escolhida mostrou ser seletiva para os oito elementos analisados (bário, cromo, cobalto, cobre, ferro, lítio, níquel e vanádio), a seletividade foi evidenciada utilizando o resultado do teste t , onde a curva de adição padrão, apresentou T calculado menor que o t tabelado (tabela 6), confirmando a similaridade de perfis das duas curvas e comprovando que a matriz não influencia nos resultados.

Tabela 6 - Resultado do Teste *T-Student* entre a curva de adição e a curva aquosa para os oito elementos, bário, cobalto, cobre, cromo, ferro, lítio, níquel e vanádio.

Bário		Cobalto	
Curva aquosa (mg/L)	Intensidade	Curva aquosa (mg/L)	Intensidade
0,03	2468,2	0,03	720,5
0,05	4167,8	0,05	1344,7
0,10	8902,4	0,10	3095,5
0,15	14114,2	0,15	5003,2
Curva adição padrão (mg/L)	Intensidade	Curva adição padrão (mg/L)	Intensidade
0,03	3151,8	0,03	757,4
0,05	4897,1	0,05	1472,4
0,10	9874,1	0,10	3254,8
0,15	14375,0	0,15	5122,8
P(T<=t) bi-caudal	0,783	P(T<=t) bi-caudal	0,589
t crítico bi-caudal	2,446	t crítico bi-caudal	2,570
Cobre		Cromo	

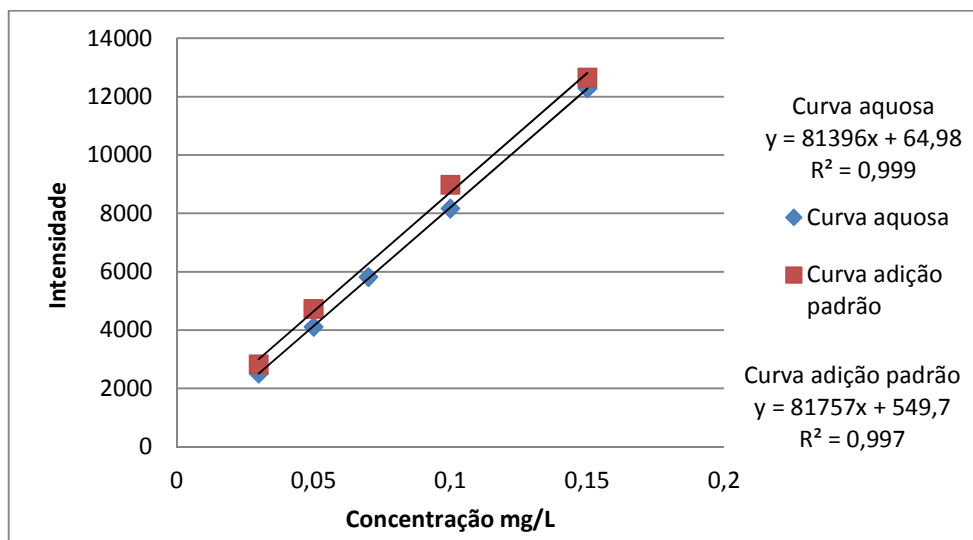
Curva aquosa (mg/L)	Intensidade	Curva aquosa (mg/L)	Intensidade
0,03	943,2	0,03	2414,6
0,05	1963,4	0,05	3875,1
0,10	4481,4	0,10	8010,3
0,15	6989,6	0,15	12591,6
Curva adição padrão (mg/L)	Intensidade	Curva adição padrão (mg/L)	Intensidade
0,03	1781,9	0,03	2747,5
0,05	3032,6	0,05	4493,1
0,10	6065,5	0,10	8894,8
0,15	8657,9	0,15	13427,2
P(T<=t) bi-caudal	0,483	P(T<=t) bi-caudal	0,768
t crítico bi-caudal	2,446	t crítico bi-caudal	2,446
Ferro		Lítio	
Curva aquosa (mg/L)	Intensidade	Curva aquosa (mg/L)	Intensidade
0,03	2795,5	0,03	159074,9
0,05	4254,2	0,05	260195,1
0,10	8702,4	0,10	549820,4
0,15	13090,4	0,15	843325,4
Curva adição padrão (mg/L)	Intensidade	Curva adição padrão (mg/L)	Intensidade
0,03	3169,9	0,03	204379,5
0,05	4684,4	0,05	333104,1
0,10	9061,5	0,10	660499,6
0,15	13054,2	0,15	970766,1
P(T<=t) bi-caudal	0,866	P(T<=t) bi-caudal	0,629
t crítico bi-caudal	2,446	t crítico bi-caudal	2,446
Níquel		Vanádio	
Curva aquosa (mg/L)	Intensidade	Curva aquosa (mg/L)	Intensidade
0,03	577,4	0,03	2511,2
0,05	921,1	0,05	4109,5
0,10	1884,5	0,10	8161,8
0,15	2945,8	0,15	12286,3
Curva adição padrão (mg/L)	Intensidade	Curva adição padrão (mg/L)	Intensidade

0,03	630,4	0,03	2826,5
0,05	1013,3	0,05	4721,9
0,10	2034,1	0,10	8978,8
0,15	2977,3	0,15	12651,4
P(T<=t) bi-caudal	0,844	P(T<=t) bi-caudal	0,805
t crítico bi-caudal	2,446	t crítico bi-caudal	2,446

Pode-se observar na tabela 6, através do T calculado, que a matriz não interfere na análise e que o método é seletivo para cada elemento avaliado. Esse resultado comprovou que o tratamento da amostra foi eficiente e que as linhas espectrais escolhidas para cada elemento (Tabela 5) garantiram a seletividade do método.

Além do teste estatístico a ausência de interferência da matriz pode ser observada de forma visual, pois todas as curvas se apresentaram paralelas entre si, como exemplificado na Figura 10 para o elemento Vanádio.

Figura 10 - Curva de calibração em meio aquoso e adição padrão em solução matriz para o elemento vanádio.



Fonte: o próprio autor

4.1.3 Limite de quantificação e limite de detecção

Foram observadas leituras de intensidades das soluções de amostra branco para os elementos Bário, Ferro e Lítio que permitiu o cálculo dos LD e LQ, (Tabela 7) utilizando os desvios padrão das concentrações relativas às leituras. O mesmo não aconteceu para os elementos Cobalto, Cobre, Cromo, Níquel e Vanádio que tiveram os LDs 0,01 mg/L e LQs 0,03 mg/L determinados de forma experimental.

Tabela 7 - Intensidade do sinal analítico e cálculo de limite de detecção e limite de quantificação para os elementos Bário, Ferro e Lítio.

Elemento	Bário	Ferro	Lítio
Branco 1	59,3	253,7	25080,2
Branco 2	44,4	191,8	24460,3
Branco 3	58,5	153,5	24156,3
Branco 4	88,6	283,8	37488,6
Branco 5	91,9	256,6	42392,6
Branco 6	82,6	268,9	37333,6
Branco 7	95,4	282,4	43250,5
Branco 8	92,5	318,6	40197,7
Branco 9	66,9	291,0	40685,9
Desvio Padrão	18,6	51,7	8068,3
LD (mg/L)	0,0005	0,0013	0,0022
LQ (mg/L)	0,0018	0,0043	0,0073

Uma vez que o menor valor preconizado, dentre os elementos analisados, no capítulo 232 da USP (2016), é para o Cobalto, 5 µg/g (Tabela 1), verificou-se que se a amostra contivesse essa quantidade de cobalto, seria esperado na solução final uma concentração de 0,1µg/mL, que equivale a 3 vezes mais que o limite de quantificação determinado experimentalmente para o método proposto. Sendo assim, o método apresentou sensibilidade adequada para quantificar os oito analitos de interesse (Ba, Cr, Co, Cu, Fe, Ni, Li e V) visto que o limite preconizado dos

elementos estudados é maior que 5 µg/g (Tabela 1).

4.1.4 Linearidade

O intervalo de trabalho usado para a construção das curvas de calibração foram os mesmos para todos os elementos, de 0,03 mg/L, 0,05 mg/L, 0,07 mg/L, 0,10 mg/L, 0,15 mg/L.

O primeiro teste realizado foi a verificação de outliers nas 15 leituras feitas para cada curva, e estes foram retirados não sendo levados em consideração nos testes realizados.

Na avaliação da normalidade dos resíduos através do teste de Ryan-Joiner, todos os oito elementos analisados apresentaram resultados satisfatórios visto que todos apresentaram um R calculado maior do que o R crítico (tabelado). Sendo assim, podem ser aplicados para todos os elementos os testes estatísticos pressupondo-se uma distribuição normal.

Na avaliação de autocorrelação de resíduos através do teste Durbi-Watson, onde o d calculado deve ser maior que o limite superior calculado (dU), $d > dU$, todos os oito elementos apresentaram resultados satisfatórios. Sendo assim, não existe autocorrelação entre os resíduos. Todos os oito elementos apresentaram resíduos independentes entre si.

Para o teste de homogeneidade das variâncias dos resíduos, os resultados para todos os elementos foram satisfatórios ($p > 0,05$), homocedásticos, com resíduos distribuídos de forma aleatória em relação ao zero.

O primeiro resultado da linearidade pode ser observado na tabela 8. Todos os coeficientes de correlação linear (r) das equações de todos os elementos apresentaram valores de r que indicavam a reta como modelo matemático adequado. O teste de significância da regressão e do desvio da linearidade feito pela ANOVA, confirmou linearidade das curvas construídas para sete dos oito elementos estudados. Os elementos Bário, Cobre, Cromo, Ferro, Níquel, Lítio e Vanádio apresentaram um p (regressão) $< 0,001$ o que demonstra que a regressão da curva é significativa e um p (ajuste) $> 0,05$ que demonstra que não existe desvio de linearidade na curva estudada.

A curva do Cobalto apresentou um p (regressão) $< 0,001$, o que evidenciou que a regressão linear também é significativa, porém o p (ajuste) $< 0,05$ evidenciou um desvio de linearidade. Sendo assim utilizou-se o teste de linearidade de Mendel como uma segunda alternativa, visto que haviam indícios através da significância da regressão que a curva era linear. Na realização do teste de Mendel teve-se como resultado que a reta, equação de primeira ordem, é o melhor modelo para a equação da reta estudada, quando comparada a um modelo de equação de segunda ordem ($TV \leq$

F), sendo assim a curva do Cobalto foi considerada linear.

Tabela 8 - Equação da reta e coeficientes de correlação linear obtido para cada um dos oito elementos estudados.

Elemento	Equação da reta ($y=a + bx$) e coeficiente de correlação linear
Ba	$y = -57,82 + 103773,22x$
	$r = 0,9999$
Co	$y = -242,21 + 51359,03x$
	$r = 0,9997$
Cu	$y = 82,07 + 106256,07x$
	$r = 0,9982$
Cr	$y = -225,50 + 68717,26x$
	$r = 0,9999$
Fe	$y = 396,89 + 121401,78x$
	$r = 0,9975$
Ni	$y = -204,28 + 34588,63x$
	$r = 0,9996$
Li	$y = 9621,97 + 11050707,45x$
	$r = 0,9998$
V	$y = 114,22 + 132067,55x$
	$r = 0,9998$

4.1.5 Exatidão (ensaio de recuperação)

Na tabela 9, estão apresentadas as recuperações obtidas em diferentes faixas de concentração para os oito elementos analisados.

Tabela 9 - Resultados para a exatidão relacionados ao ensaio do método analítico estudado para todos os elementos: bário, cobalto, cromo, cobre, ferro, lítio, níquel, vanádio a partir do ensaio de recuperação.

Elemento	Concentração adicionada (mg/L)	Concentração encontrada (mg/L)	Recuperação (%)
Ba	0,03	0,03	101
	0,07	0,06	91
	0,15	0,13	88
Co	0,03	0,03	109
	0,07	0,07	94
	0,15	0,14	90
Cr	0,03	0,03	89
	0,07	0,05	78
	0,15	0,11	74
Cu	0,03	0,03	120
	0,07	0,08	115
	0,15	0,17	117
Fe	0,03	0,05	157
	0,07	0,09	125
	0,15	0,16	106
Li	0,03	0,03	108
	0,07	0,08	110
	0,15	0,16	109
Ni	0,03	0,03	102
	0,07	0,06	90
	0,15	0,13	87
V	0,03	0,03	103
	0,07	0,07	99
	0,15	0,15	99

As recuperações em níveis de concentração na ordem de mg/L (10^{-6}), devem variar de 80-110%, conforme descrito no documento orientativo DOQ-CGCRE-008 revisão 5 do INMETRO,

2016, utilizado neste estudo para a validação da metodologia e, também no capítulo 233 da USP (2016), onde os valores de recuperação aceitos para esta faixa de concentração variam de 70 a 150%. Os resultados obtidos neste estudo foram satisfatórios demonstrando que o método multi-elementar proposto é adequado para avaliar Bário, Cobre, Cromo, Ferro, Níquel, Lítio, Vanádio e Cobalto em amostras do medicamento Captopril.

A alta recuperação da concentração de 0,03 mg/L do ferro (157%) pode estar relacionada as possíveis fontes de contaminação e deverá ser investigado.

4.1.6 Precisão (repetibilidade e precisão intermediária)

O primeiro resultado obtido em relação à precisão foi o DPR de cada elemento, calculado a partir das amostras preparadas para o ensaio de repetibilidade (Tabela 10). Após o teste de repetibilidade foi realizado o teste para avaliação da precisão intermediária, onde se obteve como resultado o desvio padrão da precisão intermediária (Tabela 11). Por último foi obtido o resultado da análise das médias das duas análises da precisão através do teste *T-Student* (Tabela 12).

Tabela 10 - Repetibilidade do método analítico para os elementos bário, cobalto, cromo, cobre, ferro, lítio, níquel e vanádio.

Elemento	Replicata	Intensidade	Concentração (mg/L)	Elemento	Replicata	Intensidade	Concentração (mg/L)		
Bário	1	5777,1	0,055	Ferro	1	8087,1	0,047		
	2	6138,2	0,058		2	7058,7	0,039		
	3	5923,5	0,056		3	7906,7	0,046		
	4	5562,4	0,052		4	6914,2	0,038		
	5	5693,5	0,054		5	7002,6	0,038		
	6	5611,2	0,053		6	7662,4	0,044		
	7	5887,9	0,056		7	8332,8	0,049		
			Média		0,055			Média	0,043
			Desvio Padrão		0,002			Desvio Padrão	0,005
			D.P.R.		3,5 %			D.P.R.	11 %
Cobalto	1	2832,4	0,059	Lítio	1	578527,1	0,056		
	2	2677,2	0,057		2	528274,7	0,047		
	3	2888,9	0,061		3	563718,2	0,050		
	4	2722,5	0,058		4	531021,6	0,047		
	5	2776,8	0,059		5	547033,9	0,049		
	6	2722,7	0,058		6	531527,5	0,047		
	7	2862,4	0,060		7	556375,2	0,049		
			Média		0,059			Média	0,049
			Desvio Padrão		0,002			Desvio Padrão	0,002
			D.P.R.		2,6 %			D.P.R.	3,5 %
Cromo	1	3053,7	0,0477	Níquel	1	1840,4	0,059		
	2	2885,9	0,0453		2	1731,4	0,056		
	3	3161,4	0,0493		3	1839,3	0,059		
	4	2968,6	0,0465		4	1740,1	0,056		
	5	2999,9	0,0469		5	1777,2	0,057		
	6	2948,8	0,0462		6	1748,9	0,057		
	7	3108,1	0,0485		7	1838,6	0,059		
			Média		0,047			Média	0,058
			Desvio Padrão		0,001			Desvio Padrão	0,001
			D.P.R.		3,0 %			D.P.R.	2,5 %

Cobre	1	8546,1	0,074	Vanádio	1	8356,9	0,064
	2	7885,6	0,068		2	7924,7	0,061
	3	8697,1	0,075		3	8582,9	0,066
	4	8099,2	0,069		4	8090,2	0,062
	5	8221,6	0,071		5	8266,9	0,063
	6	8069,9	0,069		6	8055,0	0,062
	7	8613,4	0,074		7	8538,3	0,066
	Média		0,072		Média		0,063
	Desvio Padrão		0,003		Desvio Padrão		0,002
	D.P.R.		4,1 %		D.P.R.		3,0 %

O DPR recomendado para uma determinação na faixa de concentração em nível de ppm (10^{-6}) é de 8 a 11% (INCQS, 2017a). Pode-se observar que os valores de DRP encontraram-se dentro do valor máximo aceitável para todos os os oito elementos.

Tabela 11 - Avaliação da precisão intermediária com seu desvio padrão e DPR respectivo para cada um dos elementos: bário, cobalto, cromo, cobre, ferro, lítio, níquel, vanádio.

Elemento	Analista 1		Analista 2		Desvio Padrão Intermediário (Si)	Si Relativo (%)
	Média das concentrações (mg/L)	Desvio Padrão	Média das concentrações (mg/L)	Desvio Padrão		
Bário	0,0550	0,0019	0,0526	0,0006	0,0019	3,5
Cobalto	0,0589	0,0016	0,0577	0,0007	0,0013	2,3
Cromo	0,0472	0,0014	0,0453	0,0007	0,0014	3,1
Cobre	0,0715	0,0029	0,0701	0,0017	0,0024	3,4
Ferro	0,0430	0,0047	0,0537	0,0093	0,0090	18,5
Lítio	0,0487	0,0017	0,0481	0,0014	0,0016	3,2
Níquel	0,0576	0,0014	0,0553	0,0008	0,0017	2,9
Vanádio	0,0634	0,0019	0,0617	0,0006	0,0016	2,6

Levando em consideração a precisão intermediária descrito pelo POP nº 65.3120.170 para a faixa de concentração de ppm (10^{-6}), Si Relativo de 8 a 11% (INCQS, 2017a) pode-se observar

que o único desvio fora do valor esperado foi o do ferro, 18,5%. Esse valor será investigado e novos estudos serão realizados.

Tabela 12 - Resultado do teste t entre as duas análises feitas para a avaliação da precisão intermediária para cada um dos elementos: bário, cobalto, cromo, cobre, ferro, lítio, níquel, vanádio.

Teste t da Precisão Intermediária		
Bário	P($T \leq t$) bi-caudal	0,0148
	t crítico bi-caudal	2,3646
Cobalto	P($T \leq t$) bi-caudal	0,0895
	t crítico bi-caudal	2,3060
Cromo	P($T \leq t$) bi-caudal	0,0110
	t crítico bi-caudal	2,2622
Cobre	P($T \leq t$) bi-caudal	0,3080
	t crítico bi-caudal	2,2281
Ferro	P($T \leq t$) bi-caudal	0,0244
	t crítico bi-caudal	2,2622
Lítio	P($T \leq t$) bi-caudal	0,4999
	t crítico bi-caudal	2,1788
Níquel	P($T \leq t$) bi-caudal	0,0046
	t crítico bi-caudal	2,2622
Vanádio	P($T \leq t$) bi-caudal	0,0637
	t crítico bi-caudal	2,3646
Zinco	P($T \leq t$) bi-caudal	0,5771
	t crítico bi-caudal	2,3646

Em relação ao resultado do teste t , pode-se observar que os dados para todos os elementos resultaram num valor de T calculado sempre menor ao t crítico (tabelado), confirmando que não há diferença nos resultados quando há mudança de operador para a realização da análise.

4.2 INCERTEZA

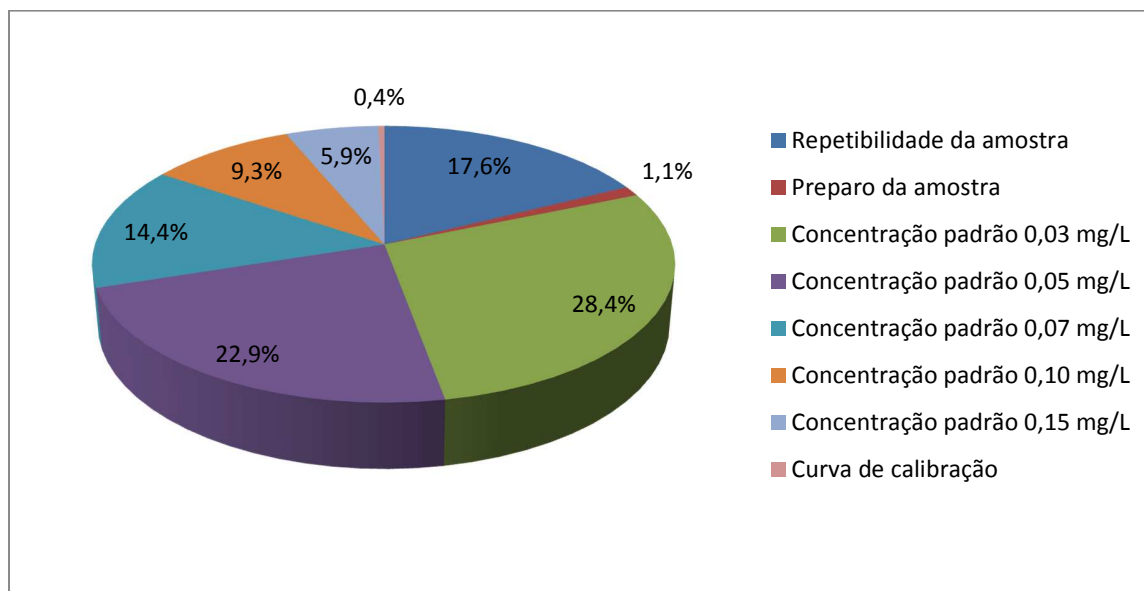
O cálculo da incerteza da metodologia leva em consideração o preparo de curva de calibração, cada um dos padrões da curva, 0,03 mg/L, 0,05 mg/L, 0,07 mg/L, 0,10 mg/L e 0,15 mg/L, o preparo das amostras, a curva de calibração confeccionada e a repetibilidade calculada para a amostra (Figura 9). A partir da incerteza de cada um desses e itens se obtém a incerteza relativa final (Tabela 13).

Tabela 13 - Valores da incerteza relativa de cada um dos elementos avaliados na metodologia: bário, cobalto, cromo, cobre, ferro, lítio, níquel e vanádio.

Elemento	Incerteza Relativa (%)
Ba	46
Co	42,2
Cr	42,2
Cu	46,3
Fe	44,9
Li	45,2
Ni	42,2
V	51,8

Dentre as incertezas apresentadas para a determinação de cada elemento, o item que mais contribuiu para a incerteza relativa da determinação de Bário, Cobalto, Cromo, Cobre, Ferro, Níquel e Lítio foi o preparo do padrão de 0,03 mg/L da curva de calibração. Em relação ao vanádio o preparo do padrão de 0,05 mg/L da curva de calibração foi o item que demonstrou maior contribuição no valor final da incerteza do resultado. Na figura 11 têm-se exemplificada as incertezas individuais que contribuem para o cálculo final da incerteza relativa da metodologia de quantificação do bário.

Figura 11 - Gráfico com as contribuições, em porcentagem, de cada item considerado para o cálculo da incerteza para a determinação de Bário.



Fonte: Próprio autor.

4.3 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

Dentre os testes indicados pela farmacopéia brasileira para serem realizados em comprimidos, pode-se observar que boa parte deles utiliza diretamente o comprimido para a realização das análises. Os resultados encontrados para o teste de homogeneidade da retirada das alíquotas foram estatisticamente comparados aplicando-se o teste *T- student* para os elementos que apresentaram resultados acima do limite de quantificação do método. Na tabela 14 encontram-se os resultados para alíquotas usando comprimidos inteiros e triturados.

Tabela 14 - Comparação dos resultados das concentrações dos elementos bário, cobre, ferro e lítio em alíquotas de um mesmo produto usando comprimidos inteiros e comprimidos triturados e homogeneizados.

Amostra	Ba (mg/L)	Cu (mg/L)	Fe (mg/L)	Li (mg/L)
Comprimido 1	0,0042	0,0197	0,0325	0,0049
Comprimido 2	0,0039	0,0570	0,0501	0,0047
Comprimido 3	0,0042	0,0343	0,0808	0,0047
Comprimido 4	0,0049	0,0097	0,0186	0,0046
Comprimido 5	0,0043	0,0080	0,0288	0,0046
Triturado 1	0,0042	0,0075	0,0373	0,0046
Triturado 2	0,0038	0,0072	-0,0140*	0,0046
Triturado 3	0,0040	0,0088	0,0332	0,0046
Triturado 4	0,0040	0,0081	0,0323	0,0046
Triturado 5	0,0040	0,0079	0,0333	0,0046
P(T≤t) bi-caudal	0,1854	0,1220	0,4997	0,2575
t crítico bi-caudal	2,5706	2,7764	2,7764	2,7764

* considerado aberrante

Como os valores de T calculados obtidos foram menores que os *t* críticos (tabelados) concluiu-se que independentemente de como se tomou as alíquotas, os resultados dos dois grupos foram semelhantes. Este resultado já era esperado uma vez que a homogeneidade de conteúdo de comprimidos é um dos ensaios exigidos para garantir a qualidade de um medicamento. Sendo assim, optou-se por realizar a pesagem das amostras usando comprimidos inteiros, peso aproximado de 0,3g por alíquota, como recomendado pela Farmacopéia Brasileira para outros testes preconizados para este medicamento.

A avaliação intra e entre lotes dos produtos dos fabricantes A e B foi feita para todas as impurezas elementares estudadas. Dentre todos os elementos determinados nas amostras apenas algumas concentrações de ferro foram encontradas acima do limite de quantificação da metodologia analítica usada, tabela 15.

Tabela 15 - Teores de ferro em amostras de diferentes lotes das marcas A e B de captopril 25 mg.

Amostra		Teor de Fe em $\mu\text{g/g}$
A	Lote 1	< 1,29
	Lote 2	< 1,29
	Lote 2	< 1,29
	Lote 3	1,43
	Lote 3	1,70
	Média	1,57
	Desvio Padrão	0,19
	B	Lote 1
Lote 1		NA
Lote 2		1,37
Lote 2		< 1,29
Lote 3		1,59
Lote 3		1,61
Média		1,52
Desvio Padrão		0,13
LQ da metodologia		1,29
Concentração máxima para comprimidos – EMA, 2008		1300,00
NA = não analisado		

O Lote 3 (L3) do fabricante A apresentou teor de ferro maior que os outros dois lotes, L1 e L2 do mesmo fabricante, cujos resultados apresentaram concentrações menores que o LQ da metodologia. A diferença entre os lotes relativa a concentração de ferro encontrada pode ser devido ao uso de diferentes lotes das matérias primas utilizadas na produção de cada lote do medicamento.

Em relação ao produto B observou-se que os teores de ferro nos lotes L2 e L3 são estatisticamente semelhantes, $(1,60 \pm 0,13) \mu\text{g/g}$ e $(1,37 \pm 0,13) \mu\text{g/g}$, respectivamente.

Pode-se observar que as amostras dos produtos das marcas A e B não apresentaram resultados acima dos valores máximos preconizados pelo capítulo 232 da USP (2016) e pela diretriz 5.2 da EMA (2008).

Assim como observado nas amostras A e B, somente o ferro foi possível de ser quantificado nas amostras dos produtos C, D e na amostra de IFA, tabela 16. Nas amostras dos produtos E e F nenhum dos oito elementos estudados apresentaram concentrações acima do LQ da metodologia.

Tabela 16 - Teor de ferro nas diferentes marcas de captopril 25 mg e na amostra do IFA.

Amostras	Teor de Fe em µg/g
Marca C	< 1,29
	1,59
Marca D	1,75
	< 1,29
IFA	2,14
	1,63
LQ da metodologia	1,29
Concentração máxima para comprimidos – EMA, 2008	1300,00

Sobre o ferro observou-se uma variação entre os teores dos produtos das marcas A, B, C e D que puderem ser quantificados tendo a concentração do ferro variado de 1,37 do L2 do produto B até 1,75 do produto D. Um resultado que chama atenção são as concentração de Fe encontradas nas duplicatas do IFA, o teor mais alto encontrado no IFA é de certa forma esperado, visto que é sempre feita uma diluição do IFA para a produção do medicamento, além disto no processo de síntese dos IFA são utilizados muitos reagentes químicos que podem agregar muitos resíduos elementares ao IFA.

Trabalhos realizados nesta área mostram resultados coerentes com os encontrados. Estudo realizado por Muller (2015) mostrou que o único resultado discordante foi para o elemento cobre, que foi reportado 3,41 µg/g, enquanto neste estudo encontrou-se um valor menor que o LQ do método, 1,29 µg/g.

Sobre os resultados encontrados por Wollein (2015) para os elementos V, Co, Ni, Cr, Cu e Fe foram encontradas concentrações abaixo do LQ do método aplicado, que foram 0,05 µg/g para

o V, 0,035 $\mu\text{g/g}$ para o Co, 0,092 $\mu\text{g/g}$ para o Ni, 0,05 $\mu\text{g/g}$ para o Cr, 1,0 $\mu\text{g/g}$ para o Cu e 2,0 $\mu\text{g/g}$ para o Fe. Todos estes elementos, com exceção do ferro, tiveram LQ menores que o da metodologia em estudo. Vale ressaltar que a técnica utilizada para a quantificação do ferro foi a mesma utilizada nos dois estudos, ICP OES, e o método proposto foi mais sensível (LQ= 1,29 $\mu\text{g/g}$) que o reportado por Wollein (2,0 $\mu\text{g/g}$). Este limite de quantificação permitiu que neste estudo fosse encontrado um intervalo de concentrações de Fe de 1,37 $\mu\text{g/g}$ (produto do fabricante B) a 2,14 $\mu\text{g/g}$ no IFA (Tabela 15 e 16).

Além da avaliação em relação ao produto final é necessário avaliar se o uso contínuo do medicamento captopril pode levar a uma ingestão maior que a PDE em relação aos elementos inorgânicos. Sendo assim, diante dos resultados obtidos com as análises para bário, cobre, cobalto, cromo, níquel, lítio, vanádio e ferro, levando em consideração a dose máxima do medicamento por dia, foi possível avaliar se a quantidade de impurezas ingeridas era superior a exposição diária permitida (Tabela 2) ou não. Segundo as bulas dos medicamentos utilizados como amostras, a posologia do captopril pode variar de acordo com a indicação do uso, ou seja, de acordo com a doença que acomete o paciente que fará uso do medicamento. Porém, independentemente da doença do paciente, a dose máxima de captopril que pode ser administrada por dia é de 450 mg. No caso de um comprimido de 25 mg isto significa 18 comprimidos.

Levando em consideração que a dose mínima do captopril de 25 mg seria 0,025 g e a dose máxima de 0,450 g, criou-se um intervalo de concentração mínima e máxima de exposição diária com o uso do captopril de 25 mg. Como o único elemento que apresentou teores acima do LQ foi o ferro, só foi possível calcular a concentração mínima e máxima de exposição diária para o ferro (Tabela 17). Porém, vale ressaltar que se os outros elementos estivessem presentes no medicamento com teor igual ao LQ, 1,29 $\mu\text{g/g}$, a concentração máxima de exposição diária aos elementos seria de 0,58 $\mu\text{g/dia}$ que é inferior ao limite dos outros sete elementos analisados (Tabela 2).

Tabela 17 - Avaliação da exposição diária do ferro com o intervalo de concentração mínima e máxima de exposição diária e seu respectivo valor de exposição diária permitida.

Amostra	Teor de Fe em $\mu\text{g/g}$	Dose mínima g/dia	Dose máxima g/dia	Teor mínimo $\mu\text{g/dia}$	Teor máximo $\mu\text{g/dia}$	Limite de PDE em $\mu\text{g/dia}$ - EMA, 2008
Marca A L3	1,57	0,025	0,450	0,039	0,705	13000
Marca B L2	1,37	0,025	0,450	0,034	0,617	
Marca B L3	1,60	0,025	0,450	0,040	0,721	
Marca C	1,59	0,025	0,450	0,039	0,715	
Marca D	1,75	0,025	0,450	0,044	0,787	

5 CONCLUSÃO

Com os resultados do estudo podemos concluir que o método estudado é simples, rápido e de fácil utilização, sendo capaz de avaliar se um medicamento captopril atende aos requisitos exigidos pela USP (2016) e pela EMA (2008). O método proposto possui sensibilidade, precisão e exatidão adequadas para avaliar impurezas de bário, cobalto, cromo, cobre, ferro, níquel, lítio e vanádio em insumos farmacêuticos; todas as amostras de medicamentos estudadas que usam como princípio ativo o captopril apresentaram resultados satisfatórios quanto à presença das impurezas elementares, Ba, Co, Cr, Cu, Ni, Li, Fe e V. Do mesmo modo a amostra da IFA também apresentou quantidades de impurezas abaixo dos limites recomendados pelas farmacopeias América e Europeia.

Considerando as impurezas elementares avaliadas nos diferentes lotes dos 6 fabricantes do medicamento captopril pode-se considerar este medicamento seguro mesmo para aqueles pacientes que fazem uso da maior dosagem permitida na bula do medicamento, 450 mg, ou seja, 18 comprimidos de 25 mg.

6 PERSPECTIVAS DO TRABALHO

Diante das conclusões obtidas sugere-se:

- Avaliar a possibilidade de usar a ICP OES para analisar os elementos preconizados na USP que não foram incluídos neste estudo.
- Avaliar a possibilidade de quantificar arsênio, cádmio, chumbo e mercúrio, que estão na classe 1 da Diretriz Q3D da Comissão Internacional Harmonizada (ICH) (2015), em medicamento utilizando técnicas espectrométricas, como GF AAS e ICP-MS.

7 REFERÊNCIAS

- 1 - ANVISA. **Conceitos técnicos**. Brasília, 2016. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/conceito.htm>>. Acesso em: 19/07/2016.
- 2 - ANVISA. RDC nº 53, de 4 de dezembro de 2015. Estabelece os parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 08 dez. 2015. Seção 1, p. 53.
- 3 - ABNT NBR ISSO/IEC 17025:2005 **Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibrações**. Rio de Janeiro: ABNT, 2005.
- 4 - BARREIRO, E. J. **Linha do Tempo da Química Medicinal: assim nascem os fármacos (Parte VII)**, 2012. Disponível em: <<http://ejb-eliezer.blogspot.com.br/2012/01/linha-do-tempo-da-quimica-medicinal.html>>. Acesso em: 20/07/16.
- 5 - BAZILIO, F. S.; BOMFIM, V. J.; ALMEIDA R. J. *et al.* Uso de Planilha Eletrônica na Verificação da Adequação de Curva Analítica ao Modelo Linear. **Revista Analytica**, n.59, jul. 2009.
- 6 - BOSS, C. B.; FREDEEN, K. J. *Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*. 3rd Edition, PerkinElmer, 2004. 120p.
- 7 - DELUCIA, R.; OLIVEIRA, R.M.F; PLANETA, C.S. *et al* Farmacologia Integrada, 3 ed, Rio de Janeiro, Livraria e Editora Revinter, p. 396-402, 2007.
- 8 - EMA. Chapter 5.20: **Guideline on the specification limits for residues of metal catalysts or metal reagents**. London, 2008.
- 9 - EURACHEM Guide: **The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**. Magnusson, B. and U. Örnemark (Ed.), 2014.
- 10 - FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010a. 1 v.
- 11 - FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010b. 2v.
- 12 - FUNK, W.; DAMMANN, V.; DONNEVERT, G. *Quality Assurance in Analytical Chemistry : Applications in Environmental, Food, and Materials Analysis, Biotechnology, and Medical Engineering*. 2nd Edition. Weinheim: Wiley-VchVerlag GmbH & Co. KGaA, 2007. 277p. ISBN: 978-3-527-31114-9.
- 13 - INCQS. **POP 65.3120.170: Protocolo de Validação para Determinações de Elementos Inorgânicos por Espectrometria**. Rev. 01. Rio de Janeiro, 2017a. 26p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).
- 14 - INCQS. **POP 65.3120.159: Decomposição de amostras por micro-ondas**. Rev. 01. Rio de Janeiro, 2017b. 4p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).
- 15 - INMETRO. DOQ-CGCRE-008: **Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos**. 2016.
- 16 - ICH. **Q3A (R2): Impurities in New Drug Substances**. 2006a. Disponível em <https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3A_R2/Step4/Q3A_R2_Guideline.pdf>. Acessado em: 21/11/2016.

- 17 - ICH. **Q3B (R2)**: Impurities in New Drug Products. 2006b. Disponível em <https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3B_R2/Step4/Q3B_R2_Guideline.pdf>. Acessado em: 21/11/2016.
- 18 - ICH. **Q3D**: Elemental Impurities. 2015. Disponível em <<https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm371025.pdf>>. Acessado em: 20/07/2016.
- 19 - LI, G.; SCHONEKER D.; ULMAN K. L. *et al.* Elemental Impurities in Pharmaceutical Excipients. **Journal Pharmaceutical Science**, v.104, p.4197-4206, 2015.
- 20 - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Nota Técnica N° 269**: Captopril. Brasília, 2013.
- 21 - MULLER, A. L. H.; OLIVEIRAJ. S. S.; MELLO P. A. *et al.* Study and Determination of Elemental Impurities by ICP-MS in Active Pharmaceutical Ingredients Using Single Reaction Chamber Digestion in Compliance with USP Requirements. **Talanta**, v.136, p.161-169, 2015.
- 22 - OLIVEIRA, A. D.; CLAINA. F. Estudo Comparativo da Espectrometria de Emissão Atômica com Fonte de Plasma Indutivamente Acoplado com a Espectrometria de Emissão Atômica com Fonte de Centelha para Análise Quantitativa de Açúcar. **Revista TECCEN**, v.3, n.1, abr. 2010.
- 23 - PETRY, C. F. **Determinação de Elemento Traço em Amostras Ambientais por ICPOES**. 2005. 90f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- 24 - PERKIN ELMER CORPORATION. ICP Emission Spectroscopy: optima 3000 family wavelength tables. [s.l.], 1998.
- 25 - SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. 7º Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. Rio de Janeiro, 2016. 104p.
- 26 - SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. Rio de Janeiro, 2006. 56p.
- 27 - STOVING, C.; JENSEN, H.; GAMMELGAARD B. *et al.* Development and Validation of an ICP-OES Method for Quantitation of Elemental Impurities in Tablets to Coming US Pharmacopeia Chapters. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Denmark, v.84, p.209-214, 2013.
- 28 - TAVARES, A. T. **Determinação Multielementar de Elementos Traço em Radiofármacos Produzidos na Diretoria de Radiofarmácia por Espectrometria de Emissão por Plasma**. 2013. 101f. Dissertação (Mestrado Ciências na Área de Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2013.
- 29 - THE UNITED STATES PHARMACOPEIA 39. **<232> Elemental Impurities - Limits**, page 268. Rockville:U.S. Pharmacopeia, 2016a.
- 30 - THE UNITED STATES PHARMACOPEIA 38. National Formulary 33: **<233> Elemental Impurities Procedures**. Rockville:U.S. Pharmacopeia, 2016b.
- 31 - WOLLEIN, U.; BAUER B.; HABERNEGG R.; *et al.* Potential metal impurities in active pharmaceutical substances and finished medicinal products – A market surveillance study. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Alemanha, v.77, p.100-105, mai. 2015.