

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO
ESPECIALIZAÇÃO EM ANÁLISE INSTRUMENTAL**

ÉDINA LIARA SCHONS

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA IMPUREZAS
ELEMENTARES PARA O COMPRIMIDO REVESTIDO DE
RILUZOL 50 MG**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO

**TOLEDO
2019**

ÉDINA LIARA SCHONS

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA IMPUREZAS
ELEMENTARES PARA O COMPRIMIDO REVESTIDO DE
RILUZOL 50 MG**

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao curso de Especialização em Análise Instrumental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de “Especialista em Análise Instrumental”.

Orientador: Prof. Me. Guilherme Felipe Lenz

**TOLEDO
2019**

TERMO DE APROVAÇÃO

VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA IMPUREZAS ELEMENTARES PARA O COMPRIMIDO REVESTIDO DE RILUZOL 50 MG

Por

ÉDINA LIARA SCHONS

Este trabalho de conclusão de curso foi apresentado no dia 07 de junho de dois mil e dezenove, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Análise Instrumental, no Curso de Especialização em Análise Instrumental, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Toledo. A candidata foi arguida pela banca examinadora composta pelos professores abaixo relacionados.

Após a deliberação, a banca examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Me. Guilherme Felipe Lenz (Orientador)

Prof. Dr. Clayton Antunes Martins (Membro – UTFPR Toledo)

Prof. Dr. Ricardo Zara (Membro – UTFPR Toledo)

****A versão assinada encontra-se arquivada na Coordenação da
Especialização***

RESUMO

Durante vários anos o controle de impurezas elementares preconizado nas farmacopeias foi o método colorimétrico de metais pesados. Devido à falta de seletividade, baixa e variada recuperação, dentre outros problemas apresentados no método, viu-se a necessidade da utilização de técnicas mais robustas e sensíveis, capazes de quantificar cada impureza individualmente. Sendo assim, desde janeiro de 2018, as farmacopeias têm substituído a técnica colorimétrica pelas técnicas instrumental de espectrometria de emissão ótica e de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES e ICP-MS). Métodos analíticos não-compêndiais requerem a realização de uma validação analítica conforme exigido pela RDC Nº 166/2017. Portanto o trabalho tem como objetivo a validação de uma metodologia analítica para a quantificação de cádmio, chumbo, arsênio, mercúrio, cobalto, vanádio e níquel em comprimidos revestidos de riluzol 50 mg utilizando a técnica de ICP-OES. As amostras foram preparadas utilizando a técnica de decomposição assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado. O método analítico demonstrou ser capaz de identificar e quantificar os analitos de interesse sem interferências espectrais, diluentes e componentes da matriz, apresentou respostas analíticas diretamente proporcionais a concentração e demonstrou ser preciso e exato nas condições experimentais estabelecidas.

Palavras-chave: Cádmio. Chumbo. Arsênio. Mercúrio. Cobalto. Vanádio. Níquel. Espectrometria de Emissão Ótica por Plasma Indutivamente Acoplado. Figuras de mérito.

ABSTRACT

For several years the control of elemental impurities recommended in the pharmacopoeia was the colorimetric method of heavy metals. Due to the lack of selectivity, low and varied recovery, among others problems, it was necessary to use more robust and sensitive techniques, capable of quantifying each impurity individually. Thus, since January 2018, the pharmacopoeias have replaced the colorimetric technique with the instrumental techniques of Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-OES and ICP-MS). Non-compendial analytical methods require analytical validation as required by RDC n° 166/2017. Therefore, the objective of this work is to validate an analytical methodology for the quantification of cadmium, lead, arsenic, mercury, cobalt, vanadium and nickel in coated tablets of riluzole 50 mg using the ICP-OES technique. The samples were prepared using microwave-assisted decomposition technique. The analytical method was able to identify and quantify the analytes of interest without spectral interferences, diluents and matrix components, presented analytical responses directly proportional to the concentration and proved to be accurate and accurate under the established experimental conditions.

Key-words: Cadmium. Lead. Arsenic. Mercury. Cobalt. Vanadium. Nickel. Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. Riluzole. Figure of merit.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PARÂMETROS DO EQUIPAMENTO DE ICP- OES PARA A QUANTIFICAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES EM COMPRIMIDOS REVESTIDOS DE RILUZOL 50 MG	15
TABELA 2 – PROGRAMA DE AQUECIMENTO DO FORNO DIGESTOR PARA O PREPARO DAS AMOSTRAS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES EM COMPRIMIDOS REVESTIDOS DE RILUZOL 50 MG.....	17
TABELA 3 – VOLUMES UTILIZADOS DA SOLUÇÃO PADRÃO ESTOQUE PARA O PREPARO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO	17
TABELA 4 – CONCENTRAÇÕES PARA PREPARAÇÃO DA CURVA DE LINEARIDADE, EM $\mu\text{g L}^{-1}$	18
TABELA 5 – CONCENTRAÇÃO DAS IMPUREZAS FORTIFICADAS EM $\mu\text{g L}^{-1}$ PARA AVALIAÇÃO DA PRECISÃO	19
TABELA 6 – LIMITE MÁXIMO DE EXPOSIÇÃO DIÁRIA DE CADA IMPUREZA EM $\mu\text{g/g}$	21
TABELA 7 – COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON	24
TABELA 8 – RESULTADOS DA SEMELHANÇA ENTRE A INTENSIDADE DOS SINAIS.....	25
TABELA 9 – RESULTADOS DA REGRESSÃO LINEAR E ANOVA OBTIDOS PARA ANÁLISE DE LINEARIDADE	26
TABELA 10 – VALORES CALCULADOS DE GRUBBS PARA ANÁLISE DE LINEARIDADE	29
TABELA 11 – RESULTADOS DA ANÁLISE DE PRECISÃO	29
TABELA 12 – RESULTADOS DA ANÁLISE DE EXATIDÃO	30
TABELA 13 – RESULTADOS DE RECUPERAÇÃO PARA ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS.....	31

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – PRINCIPAIS FONTES DE CONTAMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES EM PRODUTOS FARMACÊUTICOS	11
FIGURA 2 – ESPECTRO DE EMISSÃO DE CÁDMIO (a) (214,440), CHUMBO (b) (220,353), ARSÊNIO (c) (193,696), MERCÚRIO (d) (194,168), COBALTO (e) (228,616), VANÁDIO (f) (290,880) E NÍQUEL (231,604) (g)	22
FIGURA 3 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE CÁDMIO (a), CHUMBO (b), ARSÊNIO (c), MERCÚRIO (d), COBALTO (e), VANÁDIO (f) E NÍQUEL (g)	27
FIGURA 4 – GRÁFICO DE RESÍDUOS DE CÁDMIO (a), CHUMBO (b), ARSÊNIO (c), MERCÚRIO (d), COBALTO (e), VANÁDIO (f) E NÍQUEL (g)	28

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVO GERAL.....	9
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
3.1 HISTÓRICO	10
3.2 IMPUREZAS ELEMENTARES.....	11
3.3 TÉCNICA DE DETECÇÃO	12
3.4 VALIDAÇÃO	13
4 METODOLOGIA.....	15
4.1 AMOSTRA.....	15
4.2 DETERMINAÇÃO DE Cd, Pb, As, Hg, Co, V E Ni POR ICP-OES.....	15
4.2.1 Condições do equipamento.....	15
4.2.2 Preparo das soluções analíticas.....	16
4.2.3 Validação.....	18
4.2.3 Análise estatística.....	19
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
5.1 ESPECIFICAÇÕES	21
5.2 SELETIVIDADE.....	21
5.3 LINEARIDADE	25
5.4 PRECISÃO	29
5.5 EXATIDÃO	30
5.6 INTERVALO	30
5.7 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	30
5.8 ROBUSTEZ.....	31
6 CONCLUSÃO.....	32

1 INTRODUÇÃO

Impurezas inorgânicas elementares são um dos três tipos de impurezas (orgânicas, inorgânicas e solventes residuais) que devem ser controlados em medicamentos e em suas matérias-primas (1). Dentre as impurezas elementares eventualmente presentes em produtos e insumos farmacêuticos estão resíduos de catalisadores, adicionados intencionalmente no processo de síntese, e contaminantes ambientais (devido a interação com equipamentos no processo de produção, por exemplo) que podem estar presentes em insumos farmacêuticos ativo, excipientes e no produto final (1,2,3).

Devido ao fato de impurezas elementares não providenciarem nenhum benefício terapêutico para o paciente, serem tóxicas, causarem efeitos adversos, poderem catalisar a decomposição e dessa forma afetar a estabilidade do produto, a quantidade destas impurezas deve ser controlada no produto farmacêutico (1,4,5).

A partir de janeiro de 2018, a Farmacopeia Americana (do inglês *The United States Pharmacopoeia*, USP), substituiu o capítulo <231> pelos capítulos “<232> *Elemental Impurities - Limits* (Impurezas Elementares - Limites, na tradução livre)” e “<233> *Elemental Impurities - Procedures* (Impurezas Elementares - Procedimentos, na tradução livre)”, os quais utilizam técnicas instrumentais seletivas e sensíveis capazes de detectar quantidades de impurezas a níveis de traço (3,6,7), como a Espectrometria de Emissão Ótica por Plasma Acoplado Indutivamente (do inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*, ICP-OES) e a Espectrometria de Massas por Plasma Indutivamente Acoplado (do inglês *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, ICP-MS).

Devido a nova exigência de algumas farmacopeias para a determinação de impurezas elementares e a falta de métodos compendiais utilizando as técnicas preconizadas, deve-se desenvolver métodos analíticos para os produtos que serão analisados. Métodos analíticos não-compendiais requerem a realização de uma validação analítica conforme parâmetros estabelecidos na Resolução da Diretoria Colegiada, RDC Nº 166, de 24 de Julho de 2017 (8). O método analítico deve demonstrar sua capacidade de identificar e quantificar o analito de interesse na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz (seletividade); deve demonstrar a capacidade de

obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito na amostra (linearidade); deve-se demonstrar preciso e exato por toda a faixa de trabalho estabelecida no método (precisão e exatidão), deve resistir a pequenas e deliberadas alterações das condições analíticas (robustez) e demonstrar a menor quantidade de analito que o método pode detectar (limite de detecção) e quantificar com precisão e exatidão (limite de quantificação) (8).

2 OBJETIVO GERAL

Validar metodologia analítica para quantificação das impurezas elementares cádmio, chumbo, arsênio, mercúrio, cobalto, vanádio e níquel em comprimidos revestidos de riluzol 50 mg utilizando a técnica de ICP-OES.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparo das amostras
- Preparo dos padrões
- Determinação da seletividade, linearidade, precisão e exatidão
- Determinação da faixa de trabalho
- Definição do limite de quantificação
- Análise estatística

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 HISTÓRICO

Durante mais de 100 anos, a metodologia utilizada para o controle de impurezas elementares era o ensaio limite de metais pesados apresentado no capítulo <231> *Heavy Metals* (Metais Pesados, na tradução livre) da USP, o qual passou por diversas revisões durante os anos visando melhorar a performance do teste. O método consiste na precipitação de potenciais impurezas elementares como sulfetos, utilizando uma solução de tiocetamida seguido de uma comparação visual da coloração a um padrão de referência de chumbo preparado da mesma maneira (5,6,9,10).

O método geral de metais pesados <231> apresenta diversos problemas, tais como baixa e variada recuperação, falta de seletividade e perda de elementos voláteis (11). Além da comparação visual ser subjetiva, o teste é baseado na soma de dez elementos (Ag, As, Bi, Cd, Cu, Hg, Mo, Pb, Sb e Sn) e, desta forma, não é possível a identificação e quantificação individual. Ainda, o teste não pode ser utilizado para a determinação de diversos elementos de interesse, como o cromo e os elementos do grupo de platina, que são comumente utilizados como catalisadores (4,6).

Em 2008, a Agência Europeia de Medicamentos (do inglês *European Medicines Agency*, EMA) (2) publicou o Guia de Limites de Especificação para Resíduos de Catalisadores Metálicos e Reagentes Metálicos, cujo objetivo era estabelecer concentrações máximas aceitáveis para resíduos metálicos originados da síntese de princípios ativo e excipientes.

Em 2015, o Conselho Internacional de Harmonização (do inglês *International Conference on Harmonisation*, ICH), implementou o Guia de Impurezas Elementares (Q3D) que estabeleceu a exposição diária permitida (do inglês *Permitted Daily Exposure*, PDE) para medicamentos administrados de forma parenteral, oral e inalatória. O guia descreve a avaliação da toxicidade de potenciais impurezas elementares, estabelece o PDE para cada elemento de risco toxicológico e a aplicação de uma avaliação de risco para controlar impurezas elementares em produtos farmacêuticos (1).

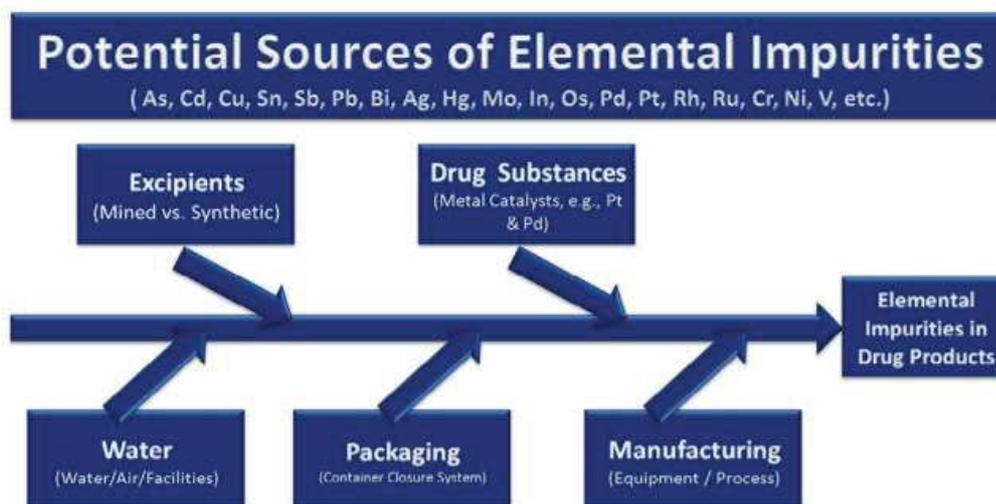
A partir de janeiro de 2018, a Farmacopeia Americana substituiu o capítulo <231> pelos novos capítulos <232> Impurezas elementares - limites e <233> Impurezas elementares - procedimentos, os quais foram desenvolvidos em paralelo com o Guia Q3D (3,5).

3.2 IMPUREZAS ELEMENTARES

O capítulo <232> da USP estabelece os limites de impurezas elementares nos produtos farmacêuticos. A realização de uma avaliação de risco se faz necessária para determinar quais são as potenciais impurezas elementares que podem estar presentes no produto em análise e que deverão ser controlados. Os metais arsênio, cádmio, chumbo e mercúrio devem ser considerados na avaliação de risco devido a sua natureza onipresente (3).

A Figura 1 apresenta as principais fontes de contaminação de impurezas elementares em produtos farmacêuticos.

FIGURA 1 – PRINCIPAIS FONTES DE CONTAMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES EM PRODUTOS FARMACÊUTICOS



Os elementos incluídos no capítulo foram divididos em três classes baseados em sua toxicidade ou exposição diária máxima permitida (PDE) e a probabilidade de estarem presentes no medicamento. As classificações são (1,3):

- Classe 1: elementos tóxicos que não tem uso ou seu uso é limitado na manufatura de produtos farmacêuticos. A sua presença no medicamento se deve principalmente ao uso de insumos comumente utilizados.

- Classe 2: elementos tóxicos dependentes da rota. Esta classe é subdividida em duas subclasses:
 - Classe 2 A: elementos que possuem alta probabilidade de estarem presentes no produto final.
 - Classe 2 B: elementos com menor probabilidade de ocorrência devido a sua baixa abundância e baixo potencial de estar em outros materiais.
- Classe 3: elementos com baixa toxicidade para produtos administrados via oral, entretanto devem ser levados em consideração para produtos administrados via parenteral ou inalatório.

O controle de impurezas elementares pode ser realizado no produto acabado ou em cada componente do medicamento individualmente. Neste último caso, deve-se somar a quantidade de cada impureza em todos os insumos da formulação para então determinar o total de impurezas elementares no produto final. No caso de medicamentos cuja dose diária é menor que 10 g, o capítulo apresenta uma tabela com especificações menores que podem ser utilizadas. Se o insumo atender a essas especificações, não há necessidade de cálculos adicionais, podendo o mesmo ser utilizado em qualquer proporção na manufatura do medicamento (3).

3.3 TÉCNICA DE DETECÇÃO

O capítulo <233> Impurezas elementares – procedimentos, traz dois procedimentos instrumentais para a análise de impurezas elementares. O procedimento 1 pode ser utilizado para elementos passíveis de detecção utilizando a técnica de Espectrometria de Emissão Ótica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES) e o procedimento 2 pode ser utilizado para elementos que podem ser detectados por Espectroscopia de Massa por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-MS) (7).

Entre as vantagens da utilização das técnicas de ICP estão a sua capacidade de analisar dezenas de elementos simultaneamente, baixa susceptibilidade a interferências químicas e determinação de baixas concentrações de elementos que tendem a formar compostos refratários (12).

A técnica de plasma indutivamente acoplado (ICP) utiliza o plasma, comumente de argônio, como fonte de excitação de alta temperatura (6.000 – 10.000 K) que

dessolvata, vaporiza e atomiza as amostras que são introduzidas em forma de aerossol e ioniza os átomos resultantes. Os átomos e íons excitados podem então ser detectados utilizando a técnica de ICP-OES, através das linhas de emissão dos analitos, ou pela técnica de ICP-MS separando os íons carregados positivamente pela sua razão massa-carga (13, 14).

Apesar da técnica possuir diversas vantagens, a determinação de impurezas elementares por ICP-OES sofre interferências espectrais e não-espectrais, relacionadas a proximidade de linhas espectrais ou interferências relacionadas a composição da solução amostra, respectivamente. Devido a isso, deve-se levar em consideração a composição do produto que será analisado, assim como os reagentes que serão utilizados para o preparo da amostra (15).

3.4 VALIDAÇÃO

Métodos analíticos que não estão presentes em farmacopeias ou compêndios oficiais devidamente reconhecidos pela ANVISA, devem apresentar uma validação analítica conforme parâmetros estabelecidos na Resolução da Diretoria Colegiada, RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. Segundo esta Resolução, métodos quantitativos de impurezas exigem a avaliação dos parâmetros seletividade, linearidade, intervalo, precisão (repetibilidade e intermediária), exatidão, limite de quantificação e robustez (8).

A seletividade de um método analítico é definida como a sua capacidade em identificar ou quantificar o analito de interesse, sem interferências de componentes que possam estar presentes, tais como impurezas, diluentes e componentes da matriz. Para que o método seja considerado linear o mesmo deve demonstrar sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração do analito. A precisão do método é determinada analisando-se amostras preparadas conforme o método analítico e avaliando-se a proximidade entre os resultados obtidos. A exatidão é avaliada pela capacidade do método em obter resultados individuais em concordância em relação a um valor aceito como verdadeiro. O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (8).

Para a comprovação da linearidade, segundo a RDC N° 166 de 24 de Julho de 2017, deve-se apresentar os seguintes dados:

- Representação gráfica das respostas em função da concentração do analito;
- Gráfico de dispersão dos resíduos, acompanhado de sua avaliação estatística;
- Equação da reta de regressão de y em x , estimada pelo método dos mínimos quadrados;
- Avaliação da associação linear entre as variáveis por meio dos coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2);
- Avaliação da significância do coeficiente angular;

4 METODOLOGIA

4.1 AMOSTRA

Estabeleceu-se a validação do método para determinação das impurezas elementares cádmio, chumbo, arsênio, mercúrio, cobalto, vanádio e níquel por Espectrometria de Emissão Ótica por Plasma Acoplado Indutivamente em comprimidos revestidos de riluzol 50 mg. Riluzol é um medicamento que inibe a liberação e a ação pós-sináptica do glutamato retardando a deterioração de pacientes com esclerose lateral amiotrófica (16).

4.2 DETERMINAÇÃO DE Cd, Pb, As, Hg, Co, V E Ni POR ICP-OES

4.2.1 Condições do equipamento

A determinação dos elementos Cd, Pb, As, Hg, Co, V e Ni foi realizada por Espectrometria de Emissão Ótica por Plasma Indutivamente Acoplado (Perkin Elmer, Optima 8000), utilizando nebulizador tipo Meinhard em conjunto com câmara de nebulização ciclônica de vidro. Os parâmetros utilizados para a quantificação são descritos na Tabela 1.

TABELA 1 – PARÂMETROS DO EQUIPAMENTO DE ICP- OES PARA A QUANTIFICAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES EM COMPRIMIDOS REVESTIDOS DE RILUZOL 50 MG

Parâmetros do equipamento	
Comprimento de onda (nm)	Cd (214,440), Pb (220,353), As (193,696), Hg (194,168), Co (228,616), V (290,880) e Ni (231,604)
Visão do plasma	Axial
Profundidade da tocha (mm)	-1
Vazão do gás plasma (L min ⁻¹)	15
Vazão do gás nebulização (L min ⁻¹)	0,45
Potência RF (watts)	1400
Fluxo da amostra	1,00

Fonte: o autor.

4.2.2 Preparo das soluções analíticas

- **Solução padrão estoque:** foi transferido 10 mL de água ultrapura tipo 1 produzida por equipamento de osmose reversa e 1,2 mL de ácido clorídrico (37% m/m) para um balão volumétrico de 20 mL. Em seguida foi adicionado 90 μL de solução padrão estoque de cádmio 1000 mg L^{-1} , 90 μL de solução padrão estoque de chumbo 1000 mg L^{-1} , 270 μL de solução padrão estoque de arsênio 1000 mg L^{-1} , 540 μL de solução padrão estoque de mercúrio 1000 mg L^{-1} , 900 μL de solução padrão estoque de cobalto 1000 mg L^{-1} , 1800 μL de solução padrão estoque de vanádio 1000 mg L^{-1} , 3600 μL de solução padrão estoque de níquel 1000 mg L^{-1} . Completou-se o volume com água ultrapura. Concentração dos elementos nesta solução: *Cádmio: $4,5 \text{ mg L}^{-1}$; chumbo: $4,5 \text{ mg L}^{-1}$; arsênio: $13,5 \text{ mg L}^{-1}$; mercúrio: 27 mg L^{-1} ; cobalto: 45 mg L^{-1} ; vanádio: 90 mg L^{-1} ; e níquel: 180 mg L^{-1} .*
- **Solução padrão de cálcio:** foi pesado 2200,8 mg de cloreto de cálcio dihidratado e transferido para um balão volumétrico de 20 mL. Adicionou-se 15 mL de água ultrapura e 0,8 mL de ácido nítrico traço ($> 65\%$ m/m), homogeneizou-se até a completa solubilização do sal. Completou-se o volume com água ultrapura. Concentração do elemento nesta solução: *30000 mg L^{-1} .*
- **Solução padrão de sódio:** foi pesado 508,4 mg de cloreto de sódio e transferido para um balão volumétrico de 20 mL. Adicionou-se 15 mL de água ultrapura e 0,8 mL de ácido nítrico concentrado ($> 65\%$ m/m), homogeneizou-se até a completa solubilização do sal. Completou-se o volume com água ultrapura. Concentração do elemento nesta solução: *10000 mg L^{-1} .*
- **Solução branco:** Em um frasco de politetrafluoretileno (PTFE) (frasco interno de 100 mL do sistema de preparo de amostras por radiação micro-ondas TITAN MPS) adicionou-se 1 mL de ácido nítrico traço concentrado ($> 65\%$ m/m), 2 mL de peróxido de hidrogênio ($> 30\%$ m/m) e 2 mL de água ultrapura. Fechou-se o frasco e o mesmo foi levado para o interior do forno digestor com aquecimento por radiação micro-ondas (Perking Elmer, Titan MPS). Programou-se o forno digestor conforme TABELA 2 e iniciou-se a digestão. Após o término do programa, aguardou-se o resfriamento da solução e transferiu-se o digerido para um tubo de centrífuga graduado de polipropileno de 15 mL lavando o frasco com 2 mL de

água ultrapura pelo menos duas vezes. Adicionou-se 850 µg de solução padrão de cálcio e 165 µg de solução padrão de sódio, completar o volume para 15 mL com água ultrapura.

TABELA 2 – PROGRAMA DE AQUECIMENTO DO FORNO DIGESTOR PARA O PREPARO DAS AMOSTRAS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES EM COMPRIMIDOS REVESTIDOS DE RILUZOL 50 MG

Etapa	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Rampa (min)	Patamar (min)	Potência (%)
1	140	60	10	5	70
2	190	60	7	5	70
3	230	60	5	10	70
4	50	0	0	0	0
5	50	0	0	0	0

Fonte: o autor.

- **Solução amostra:** Macerou-se 20 comprimidos de Riluzol 50 mg até atingir a aparência de pó fino. Pesou-se 180 mg de amostra em um frasco de PTFE (frasco interno de 100 mL do sistema de preparo de amostras por radiação micro-ondas TITAN MPS). Adicionou-se 1 mL de ácido nítrico traço (> 65 % m/m), 2 mL de peróxido de hidrogênio (> 30% m/m) e 2 mL de água ultrapura. Fechou-se o frasco e colocou-se no interior do forno digestor com aquecimento por radiação micro-ondas e iniciou-se a digestão conforme Tabela 2. Após o término do programa e do resfriamento, transferiu-se o digerido para um tubo de centrifuga graduado de polipropileno de 15 mL lavando o frasco com 2 mL de água ultrapura pelo menos duas vezes. Completou-se o volume para 15 mL com água ultrapura. Centrifugou-se a 5000 rpm por 5 minutos.
- **Curva de calibração:** Transferiu-se os volumes da solução padrão estoque, conforme descrito na Tabela 3, para tubos de centrifuga de polipropileno graduados de 15 mL. Adicionou-se 1 mL de ácido nítrico traço (> 65 % m/m), 850 µL de solução padrão de Cálcio e 165 µL de solução padrão de sódio. Completou-se o volume de para 15 mL com água ultrapura.

TABELA 3 – VOLUMES UTILIZADOS DA SOLUÇÃO PADRÃO ESTOQUE PARA O PREPARO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

Solução padrão (SP)	Concentração (%)	Volume solução padrão estoque (µL)
SP0	0	0
SP1	50	250
SP2	75	375
SP3	100	500
SP4	125	652
SP5	150	750

Fonte: o autor.

- **Solução controle:** Transferiu-se respectivamente os volumes de 250 μL e 500 μL da solução padrão estoque para tubos de centrifuga de polipropileno graduados de 15 mL. Adicionou-se 1,0 mL de ácido nítrico traço (> 65 % m/m), 850 μL de solução padrão de Cálcio e 165 μL de solução padrão de sódio. Completou-se o volume para 15 mL com água ultrapura.

4.2.3 Validação

Para avaliação da seletividade do método analítico em questão, preparou-se em triplicata a solução amostra, solução amostra fortificada com todas as impurezas elementares (soluções seletividade), e uma solução para cada impureza individual, preparado com padrão (solução referência), todas a 100 % da especificação da impureza no produto.

Na linearidade preparou-se 5 soluções em quintuplicata de concentrações diferentes, preparadas de maneira independente, compreendendo o intervalo de 50 % a 150 % da concentração da impureza em análise. A TABELA 4 apresenta as concentrações de cada impureza em cada nível avaliado.

TABELA 4 – CONCENTRAÇÕES PARA PREPARAÇÃO DA CURVA DE LINEARIDADE, EM $\mu\text{g L}^{-1}$

Impureza	50%	75%	100%	125%	150%
Cd	75	112,5	150,0	187,5	225,0
Pb	75,0	112,5	150,0	187,5	225,0
As	225,0	337,5	450,0	562,5	675,0
Hg	450,0	675,0	900,0	1125,0	1350,0
Co	750,0	1125,0	1500,0	1875,0	2250,0
V	1500,0	2250,0	3000,0	3750,0	4500,0
Ni	3000,0	4500,0	6000,0	7500,0	9000,0

Fonte: o autor.

Para avaliação da precisão avaliou-se a repetibilidade através da análise de 6 amostras fortificadas a 100 % da especificação das impurezas, preparadas conforme o método analítico, em uma única corrida analítica. Enquanto que a precisão intermediária foi avaliada por uma segunda repetibilidade preparada por um segundo analista em dias distintos. A TABELA 5 apresenta a concentração das impurezas adicionadas na amostra em $\mu\text{g L}^{-1}$ equivalente a especificação de cada impureza.

TABELA 5 – CONCENTRAÇÃO DAS IMPUREZAS FORTIFICADAS EM $\mu\text{g L}^{-1}$ PARA AVALIAÇÃO DA PRECISÃO

Impureza	Limite máximo ($\mu\text{g g}^{-1}$)	[] ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Cádmio	12,5	150,0
Chumbo	12,5	150,0
Arsênio	37,5	450,0
Mercúrio	75,0	900,0
Cobalto	125,0	1500,0
Vanádio	250,0	3000,0
Níquel	500,0	6000,0

Fonte: o autor.

A exatidão foi realizada pelo método de adição de padrão das impurezas em análise na amostra, nas concentrações de 50%, 100% e 150% abrangendo o intervalo linear do método determinado no parâmetro de linearidade. Amostras sem adição de padrão foram preparadas em triplicatas e o valor obtido para cada impureza, descontado no cálculo da recuperação.

4.2.3 Análise estatística

Para determinação da seletividade avaliou-se o coeficiente de correlação de Pearson pela equação 1.

$$\rho = \frac{\sum(x_i - x_m)(y_i - y_m)}{\sqrt{\sum(x_i - x_m)^2} \cdot \sqrt{\sum(y_i - y_m)^2}}$$

Equação 1

A regressão linear e ANOVA foi realizada utilizando o microsoft excel® e o teste de Cochran pelas equações 2 e 3, enquanto que o teste de Grubbs foi realizado pela equação 4.

$$C = \frac{S_{\max}^2}{\sum_{i=1}^l S_i^2}$$

Equação 2

$$S_i^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$$

Equação 3

$$G = \frac{y_n - \bar{y}}{s}$$

Equação 4

E para a determinação da recuperação para a exatidão, utilizou-se a equação

5.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Teor prático}}{\text{Teor teórico}} \times 100$$

Equação 5

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliou-se os parâmetros de seletividade, linearidade, intervalo, precisão (repetibilidade e intermediária), exatidão, limite de quantificação e robustez (8).

5.1 ESPECIFICAÇÕES

O controle de impurezas elementares pode ser realizado no produto acabado ou em cada componente do medicamento individualmente. No caso de produto acabado, o valor de cada impureza encontrado, corrigido para a dose máxima permitida do medicamento, não deve ser superior ao PDE apresentado no capítulo <232> da USP (3).

Para o medicamento riluzol 50 mg comprimido revestido, a posologia segundo a bula dos medicamentos registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é de 50 mg a cada 12 horas, ou seja, 100 mg ao dia (17). Para a determinação da concentração limite de cada impureza em $\mu\text{g/g}$ (ppm) deve-se dividir o valor de PDE de cada impureza ($\mu\text{g}/\text{dia}$) pela dose máxima de administração (g/dia).

A TABELA 6 apresenta os valores dos limites máximos de exposição diária permitido em $\mu\text{g/g}$. Para facilitar os cálculos, utilizou-se um valor de peso médio de 200 mg, totalizando 400 mg de administração permitida ao dia (0,4 g/dia).

TABELA 6 – LIMITE MÁXIMO DE EXPOSIÇÃO DIÁRIA DE CADA IMPUREZA EM $\mu\text{g/g}$

Impureza	PDE ($\mu\text{g}/\text{dia}$)	Limite máximo ($\mu\text{g/g}$)
Cádmio	5	12,5
Chumbo	5	12,5
Arsênio	15	37,5
Mercúrio	30	75,0
Cobalto	50	125,0
Vanádio	100	250,0
Níquel	200	500,0

Fonte: (3).

5.2 SELETIVIDADE

A Figura 1 apresenta o espectro de emissão das soluções referência sobreposto ao espectro da solução utilizada para avaliar a seletividade de cada impureza elementar. Através de avaliação visual é possível observar que a solução seletividade se sobrepõe ao espectro da solução referência, demonstrando que não

há interferência de componentes da matriz, diluentes e das outras impurezas elementares presentes na solução seletividade. No espectro de arsênio uma linha de emissão de vanádio encontra-se próximo a linha de emissão selecionada para a quantificação de arsênio, entretanto a linha não afeta a seletividade do método, como demonstrado nos testes descritos abaixo.

Para demonstrar a ausência de interferências, avaliou-se a correlação (grau de associação linear) dos espectros através do Coeficiente de Correlação de Pearson (p) apresentado na TABELA 7. Dessa forma, para valores de $p \geq 0,95$ os espectros da solução seletividade e solução referência foram considerados com correlação adequada e assim, considerado que interferências espectrais não são importantes.

FIGURA 2 – ESPECTRO DE EMISSÃO DE CÁDMIO (a) (214,440), CHUMBO (b) (220,353), ARSÊNIO (c) (193,696), MERCÚRIO (d) (194,168), COBALTO (e) (228,616), VANÁDIO (f) (290,880) E NÍQUEL (231,604) (g)

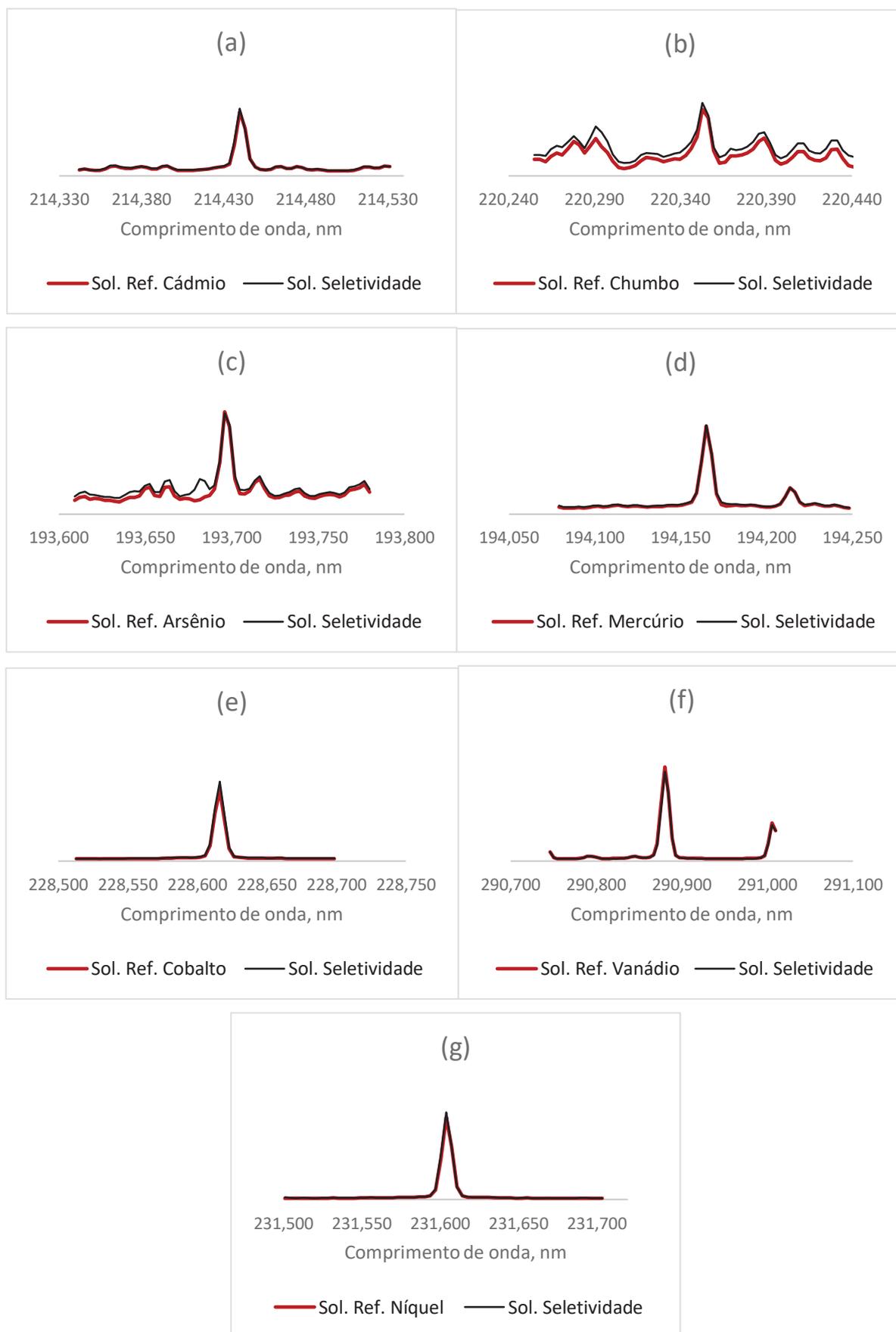


TABELA 7 – COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON

Impureza	(p)
Cádmio	0,9963
Chumbo	0,9601
Arsênio	0,9935
Mercúrio	0,9991
Cobalto	0,9998
Vanádio	0,9986
Níquel	0,9983

Fonte: o autor.

Os valores obtidos dos Coeficiente de Correlação de Pearson ficaram entre 0,9601 e 0,9998, demonstrando a similaridade entre os espectros da solução referência (sem interferentes) e solução seletividade (com presença de interferente), ou seja, a matriz, o diluente e as demais impurezas não apresentam interferências espectrais significativas nos comprimentos de onda avaliados.

Ainda, para complementar a seletividade do método, avaliou-se a semelhança (S) entre os sinais obtidos das soluções seletividade frente a solução referência. Para isso, a intensidade do sinal obtido para a solução branco foi subtraída do sinal obtido da solução referência de cada impureza, resultando na intensidade do analito da solução referência (I_R). A intensidade média do sinal obtido da solução amostra, preparada em triplicata conforme o método analítico, foi subtraída da intensidade média do sinal obtido da solução seletividade, também preparado em triplicata, resultando na intensidade do analito na presença da matriz (I_M). Em seguida, obteve-se a razão entre I_R e I_M , cujo resultado deve estar entre 0,85 a 1,15, representando uma semelhança de 85 a 115% das soluções na presença e na ausência da matriz e demais interferentes.

A TABELA 8 apresenta os resultados obtidos da avaliação da semelhança entre os sinais de cada analito de interesse.

TABELA 8 – RESULTADOS DA SEMELHANÇA ENTRE A INTENSIDADE DOS SINAIS

Identificação	Cd	Pb	As	Hg	Co	V	Ni
Branco	2008,0	798,5	93,0	297,6	-181,3	57646,2	53,1
Referência	31334,2	3147,8	2016,0	11085,5	219922,4	2048291,0	677090,0
Amostra 1	1980,0	666,7	99,6	232,6	882,9	62526,0	1364,5
Amostra 2	1757,7	682,0	97,3	293,4	904,7	61999,9	1100,4
Amostra 3	1764,3	686,9	104,9	266,8	670,2	62169,5	563,6
Média	1834,0	678,5	100,6	297,6	819,3	62231,8	1009,5
Seletividade 1	32349,1	3061,7	1980,3	11008,5	249668,2	1956822,1	717380,4
Seletividade 2	32532,8	3048,4	2009,9	11178,8	251984,0	1951833,6	711593,1
Seletividade 3	32902,1	3054,2	2003,5	11071,9	247389,1	1973012,2	719925,2
Média	32594,7	3054,8	1997,9	11086,4	249680,4	1960556,0	716299,6
I _R	29326,2	2349,3	1923,0	10787,9	220103,7	1990644,8	677036,9
I _M	30760,7	2376,2	1897,3	10788,8	248861,2	1898324,2	715290,1
S	1,05	1,01	0,99	1,00	1,13	0,95	1,06

Fonte: o autor.

Como pode ser observado na tabela acima, os valores obtidos para a semelhança entre os sinais obtidos do analito contendo os interferentes e sem os mesmos ficou entre 0,95 a 1,05, demonstrando que não há interferências significativas da matriz, diluente e demais impurezas.

Sendo assim, avaliando os resultados obtidos para o parâmetro de seletividade, podemos considerar que o método nas condições propostas é seletivo para quantificação de cádmio, chumbo, arsênio, mercúrio, cobalto, vanádio e níquel em riluzol 50 mg, comprimido revestido.

5.3 LINEARIDADE

O Guia nº 10/2017 - Guia Para Tratamento Estatístico Da Validação Analítica, da ANVISA (18), foi utilizado como base para a avaliação dos resultados obtidos na análise do parâmetro em questão.

Após análise das soluções linearidade, plotou-se os resultados, resposta analítica (y) versus concentração (x), sendo possível observar visualmente uma relação linear aparente para todos os metais em análise, Figura 2.

Em seguida, definiu-se o método adequado para a estimativa da equação, avaliando-se a variância dos valores de y para cada valor de x e determinou-se a homocedasticidade dos dados utilizando o teste de Cochran.

Os valores calculados ($C_{\text{calculado}}$) para o teste de Cochran variaram entre 0,0555 e 0,3309 para cádmio; 0,0831 a 0,5394 para chumbo; 0,0302 a 0,3892 para arsênio; 0,0373 a 0,3219 para mercúrio; 0,0168 a 0,4538 para cobalto; 0,0074 a 0,5150 para

vanádio e 0,0239 a 0,3100 para níquel. Uma vez que os valores de $C_{\text{calculado}}$ para todos os analitos de interesse são menores que o $C_{\text{crítico}}$, ao nível de significância de 5% ($C_{\text{crítico}} = 0,544$), podemos considerar que os dados apresentam variação constante (homocedástico) e dessa forma podemos utilizar o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) para estimativa da equação.

Os parâmetros foram então estimados por MMQO e avaliou-se a significância da relação linear, do coeficiente linear e do coeficiente angular. A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos. Pode-se observar que a relação linear e o coeficiente angular são significativos (p -valor $< 0,05$) para todos os metais avaliados, e que o coeficiente linear é significativamente diferente de zero, exceto para mercúrio. Visto que o intercepto não é estatisticamente diferente de zero, deve-se utilizar curva de calibração para quantificação dos metais em questão.

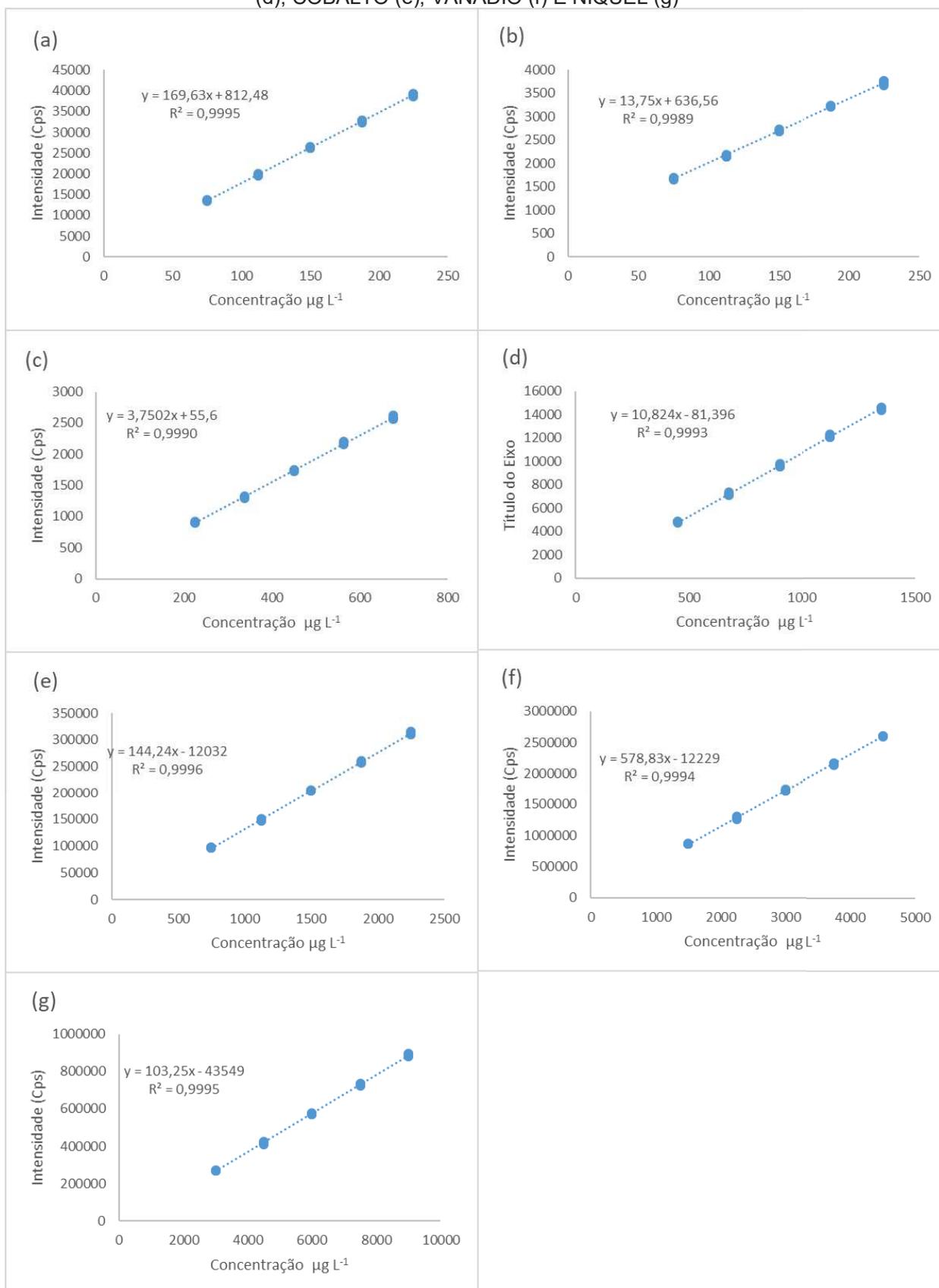
Os coeficientes de correlação de Pearson (r) variaram entre 0,999 e 1,000 estando dentro do exigido pela RDC 166/2017 (0,990) e dentro do estabelecido na USP (0,995).

TABELA 9 – RESULTADOS DA REGRESSÃO LINEAR E ANOVA OBTIDOS PARA ANÁLISE DE LINEARIDADE

Impureza	Regressão (p -valor)	Interseção	Coefficiente angular	r
Cádmio	1,78117E-39	1,37E-06	1,78E-39	0,9998
Chumbo	1,66777E-35	3,13E-23	1,67E-35	0,9994
Arsênio	3,24499E-36	7,54522E-05	3,24499E-36	0,9995
Mercúrio	1,68355E-37	0,178898872	1,68355E-37	0,9996
Cobalto	1,92786E-40	1,16661E-11	1,92786E-40	0,9998
Vanádio	6,75717E-37	0,209628432	6,75717E-37	0,9997
Níquel	4,93319E-39	1,74825E-12	4,93319E-39	0,9997

Fonte: o autor.

FIGURA 3 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE CÁDMIO (a), CHUMBO (b), ARSÊNIO (c), MERCÚRIO (d), COBALTO (e), VANÁDIO (f) E NÍQUEL (g)



Em seguida, avaliou-se a presença de valores anômalos (outliers) avaliando-se o gráfico de resíduos apresentados Figura 4 e teste de Grubbs, Tabela 10. Observa-se nos gráficos que os resíduos estão dispersos aleatoriamente em torno de zero, e que os valores calculados no teste de Grubbs apresentam-se dentro do valor tabelado de 2,66 ao nível de significância de 5%.

FIGURA 4 – GRÁFICO DE RESÍDUOS DE CÁDMIO (a), CHUMBO (b), ARSÊNIO (c), MERCÚRIO (d), COBALTO (e), VANÁDIO (f) E NÍQUEL (g)

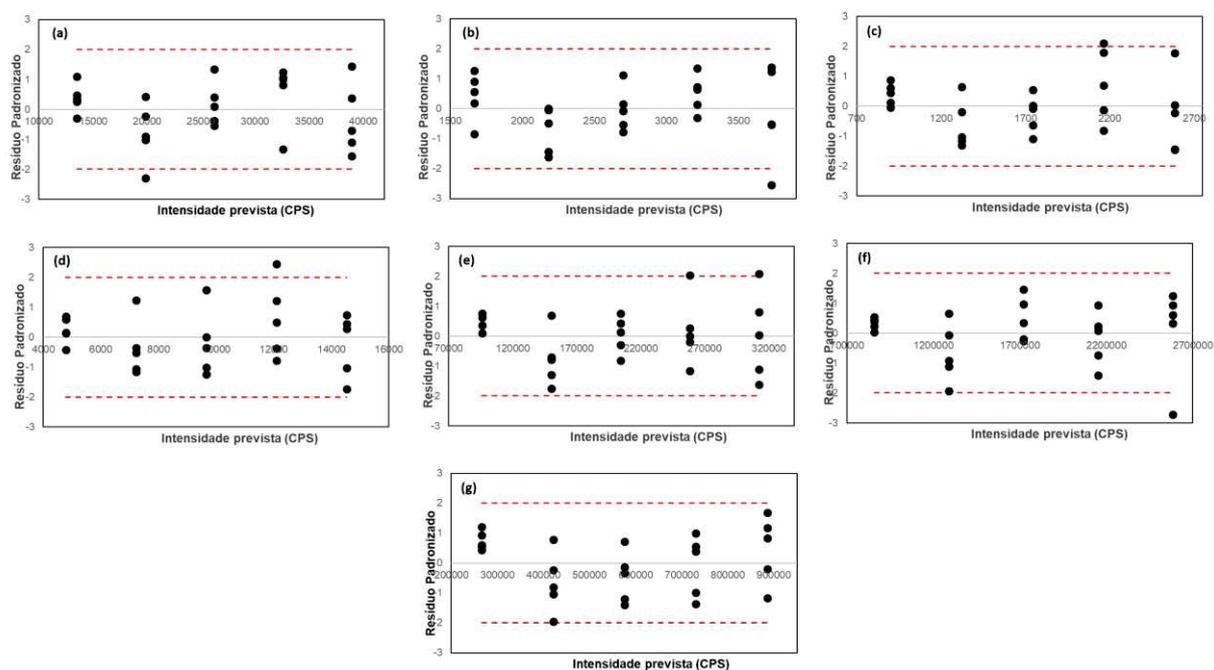


TABELA 10 – VALORES CALCULADOS DE GRUBBS PARA ANÁLISE DE LINEARIDADE

Replica	Cd	Pb	As	Hg	Co	V	Ni
1	1,09486	0,56874	-0,04747	0,13534	0,08894	0,03911	0,54759
2	0,33833	0,18118	0,44526	0,15727	0,61937	0,23578	1,21158
3	-,29447	0,91593	0,61481	-0,41693	0,75146	0,38993	0,43653
4	0,26526	1,26716	0,12207	0,68971	0,74774	0,53312	0,92179
5	0,46645	-0,84827	0,86912	0,58635	0,35596	0,42376	0,60007
6	-,01512	-1,61224	-0,18512	-0,35446	-1,29645	-1,94051	-0,23411
7	-2,30117	-1,43865	-1,16000	-1,05707	-0,78678	-0,91336	-1,95250
8	-0,91087	-0,04586	-1,02754	-1,15416	-1,75096	-1,12219	-1,03916
9	-0,22692	-0,47783	-1,31365	-0,52358	-0,71149	-0,06253	-0,80330
10	0,42098	0,01066	0,63611	1,23137	0,68878	0,65489	0,77847
11	0,08858	0,15906	-1,10161	-0,35880	0,12526	0,33899	-1,19830
12	-0,55055	1,12392	0,02162	-1,00608	-0,29644	-0,20151	-1,39588
13	-0,37859	-0,78561	-0,64066	-1,24307	-0,82409	-0,26585	0,72085
14	1,33664	-0,53532	-0,07375	-0,00071	0,42850	1,45332	-0,14121
15	0,39889	-0,06702	0,55144	1,58303	0,75849	0,95856	-0,32667
16	0,82157	0,65465	1,79134	1,21642	-0,00009	0,22760	0,54903
17	-1,32332	-0,31021	-0,82070	-0,37358	-1,16218	-1,40555	-0,98419
18	1,01934	0,72328	-0,13193	-0,77657	0,26396	-0,74569	-1,37399
19	1,06075	0,14194	0,68400	0,50129	2,03524	0,94105	0,37862
20	1,24928	1,35306	2,09864	2,45043	-0,20356	0,07989	0,99448
21	1,44056	1,23906	1,76495	0,74855	0,79734	1,23852	1,68861
22	-0,70530	-2,55175	0,03243	0,45309	2,08262	0,60423	-1,17061
23	-1,10135	1,37632	-1,44049	-1,73825	-1,11342	0,93331	1,17183
24	0,37225	-0,50899	-0,22719	0,28083	0,03044	0,32979	0,82274
25	-1,56608	-0,53322	-1,46168	-1,03042	-1,62864	-2,72465	-0,20227

Fonte: o autor.

5.4 PRECISÃO

Para comprovação da precisão do método analítico avalia-se o desvio padrão relativo (DPR) entre os preparos para cada impureza. O critério de aceitação é baseado no capítulo geral <233> da USP, cujo DPR para precisão (repetibilidade) deve ser inferior a 20% e para precisão intermediária inferior a 25%. A Tabela apresenta os resultados obtidos no teste.

TABELA 11 – RESULTADOS DA ANÁLISE DE PRECISÃO

Impureza	Repetibilidade 1	Repetibilidade 2	Intermediária
Cádmio	0,75	1,68	1,25
Chumbo	1,14	1,86	1,53
Arsênio	0,59	1,58	1,23
Mercúrio	0,95	2,08	1,69
Cobalto	0,98	2,01	1,52
Vanádio	0,77	1,97	1,45
Níquel	0,68	2,11	1,51

Fonte: o autor.

De acordo com os resultados apresentados nas tabelas acima, o método analítico em questão pode ser considerado preciso para a quantificação de cádmio, chumbo, arsênio, mercúrio, cobalto, vanádio e níquel.

5.5 EXATIDÃO

Para comprovação da exatidão do método analítico avaliou-se a recuperação dos resultados obtidos frente ao valor aceito como verdadeiro. O critério de aceitação é baseado no capítulo geral <233> da USP, cuja recuperação dos resultados obtidos deve estar entre 70 e 150%. A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos no teste.

TABELA 12 – RESULTADOS DA ANÁLISE DE EXATIDÃO

Impureza	Exatidão 50%	Exatidão 100%	Exatidão 150%
Cádmio	109,7	110,7	113,5
Chumbo	101,9	102,1	105,2
Arsênio	102,0	102,7	104,5
Mercúrio	102,3	103,4	104,9
Cobalto	113,3	112,1	113,8
Vanádio	105,7	105,0	106,7
Níquel	115,4	114,1	116,2

Fonte: o autor.

De acordo com os resultados apresentados nas tabelas acima, o método analítico em questão pode ser considerado exato para a quantificação de cádmio, chumbo, arsênio, mercúrio, cobalto, vanádio e níquel.

5.6 INTERVALO

O intervalo do método analítico foi estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequados dentro da faixa de 50 % a 150 % da concentração de especificação da impureza elementar.

5.7 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Em caso de métodos instrumentais, o limite de quantificação pode ser determinado juntamente aos parâmetros de linearidade, precisão e exatidão, garantindo dessa forma que o limite de quantificação possui linearidade, precisão e exatidão adequados.

Dessa forma, o limite de quantificação para cada impureza foi avaliado para linearidade, precisão e exatidão na concentração equivalente a 50% da especificação, sendo determinado as concentrações de 75,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ para cádmio, 75,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ para chumbo, 225,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ para arsênio, 450 $\mu\text{g g}^{-1}$ para mercúrio, 750 $\mu\text{g g}^{-1}$ para cobalto, 1500 $\mu\text{g g}^{-1}$ para vanádio e 3000 $\mu\text{g g}^{-1}$ para níquel, atendendo a legislação vigente.

5.8 ROBUSTEZ

A robustez indica a capacidade do método analítico em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições experimentais. Avaliou-se a estabilidade das soluções analíticas, as outras condições exigidas pela legislação vigente (tempo de extração de amostra, compatibilidade de filtros, pH, temperatura) não se aplicam para método em questão.

Para tanto, as amostras preparadas para exatidão 100% foram lidas 24 horas após o seu preparo utilizando uma nova curva de calibração. A TABELA 13 apresenta os resultados de recuperação e DPR entre as replicatas obtidos no teste para cada metal analisado.

TABELA 13 – RESULTADOS DE RECUPERAÇÃO PARA ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS

Tempo	Réplicas	Cd	Pb	As	Hg	Co	V	Ni
0 horas	Amostra 1	110,0%	100,5%	101,7%	101,8%	111,0%	104,2%	113,2%
	Amostra 2	111,7%	103,3%	103,7%	105,0%	113,4%	104,9%	114,4%
	Amostra 3	110,4%	102,6%	102,5%	103,5%	111,9%	105,8%	114,6%
24 horas	Amostra 1	118,1%	109,7%	110,7%	111,3%	120,9%	114,6%	121,0%
	Amostra 2	116,9%	108,7%	109,3%	112,1%	120,7%	114,8%	122,2%
	Amostra 3	115,3%	108,3%	109,8%	111,1%	121,0%	110,2%	122,1%
DPR 0 horas(%)		0,8	1,4	1,0	1,5	1,1	0,7	0,6
DPR 24 horas(%)		1,2	0,7	0,6	0,5	0,1	2,3	0,5

Fonte: o autor.

Observando os resultados da tabela acima, podemos concluir que a amostra possui estabilidade de 24 horas.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos o método analítico para quantificação de cádmio, chumbo, arsênio, mercúrio, cobalto, vanádio e níquel em riluzol 50 mg comprimido revestido demonstrou ser seletivo, linear, preciso, exato e robusto atendendo a legislação vigente.

REFERÊNCIAS

1. Internacional Conference on Harmonization. Q3 quality guidelines, 2015. Disponível em: <<http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>> Acesso em 01 set. 2018.
2. European Medicines Agency (EMA). Guideline on the specification limits for residues of metal catalysts or metal reagents, 2008. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003586.pdf> Acesso em 08 set. 2018.
3. General chapter <232> Elemental Impurities – Limits. Pharmacopoeia of the United States of America, USP 41, Rockville, 2018.
4. LIBA, A.; McCURDY, E.; ASHDOWN, R. Proposed new ICH and USP methods for elemental impurities: The application of ICP-MS and ICP-OES for pharmaceutical analysis. **Agilent Technologies**, 2014.
5. STOVING, C.; JENSEN, H.; GAMMELGAARD, B.; STURUP, S. Development and validation of na ICP-OES method for quantitation of elemental impurities in tablets according to coming US pharmacopoeia chapters. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 84, p. 209-214, 2013.
6. General chapter <231> Heavy metals. Pharmacopoeia of the United States of America, USP 40, Rockville, 2017.
7. General chapter <233> Elemental Impurities – Procedures. Pharmacopoeia of the United States of America, USP 41, Rockville, 2018.
8. Brasil. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da União, 25 jul. 2017.
9. PerkinElmer. Implementation of USP new Chapters <232> and <233> on Elemental Impurities in pharmaceutical products. PerkinElmer, Inc., Waltham,
10. LEWEN, N. The use of atomic spectroscopy in the pharmaceutical industry for the determination of trace elements in pharmaceuticals. **Jornal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, p. 653-661, 2011.
11. LI, G.; SCHONEKER, D.; ULMAN, K. L.; STURM J.J.; THACKERY, L. M.; KAUFFMAN, J.J. Elemental impurities in pharmaceutical excipients. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, p. 4197-4206, 2015.
12. HOLLER, F. James; SKOOG, Douglas A.; CROUCH, Stanley R.. Princípios de análise instrumental. 6ª Edição, tradução: Celio Pasquini, Porto Alegre: Bookman, 2009.

13. General chapter <730> Plasma spectrochemistry. Pharmacopoeia of the United States of America, USP 41, Rockville, 2018.
14. BALARAM, V. Recent advances in the determination of elemental impurities in pharmaceuticals – status, challenges and moving frontiers. **Trends in analytical chemistry**, v. 80, p. 83-95, 2016.
15. BARIN, J.S.; MELLO, P.A.; MESKO, M.F.; DUARTE, F.A. Determination of elemental impurities in pharmaceutical products and related matrices by ICP-based methods: a review. **Bioanal Chem** v 408, p. 4547-4566, 2016.
16. RANG, H.P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. Rang and Dale's Pharmacology. Elsevier, 7^a Edição, 2012.
17. Brasil. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portal ANVISA. Disponível em:
<<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/q/?nomeProduto=Riluzol>> Acesso em: 04 maio 2019.
18. Brasil. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia Para Tratamento Estatístico da Validação Analítica. Guia nº 10/2017.

ANEXOS

TABELA 14 – REGRESSÃO LINEAR E ANOVA CÁDMIO

Identificação	GI	SQ	MQ	F	p-valor
Regressão	1	2023264900	2023264900	46013	1,78117E-39
Resíduo	23	1011346,596	43971,5911 2		
Total	24	2024276247			
	Coeficientes	Erro padrão	Stat t	p-valor	
Interseção	812,48	125,816425	6,457662423	1,37E-06	
Variável X 1	169,6329067	0,790805754	214,5064143	1,78E-39	
r	r ²		Erro padrão		
0,999	0,999		209,694		

Fonte: o autor.

TABELA 15 – REGRESSÃO LINEAR E ANOVA CHUMBO

Identificação	GI	SQ	MQ	F	p-valor
Regressão	1	13293405	13293405	20762,78	1,66777E-35
Resíduo	23	14725,79	640,2518		
Total	24	13308131			
	Coeficientes	Erro padrão	Stat t	p-valor	
Interseção	636,564	15,18192	41,92909	3,13E-23	
Variável X 1	13,74997333	0,095424	144,0929	1,67E-35	
r	r ²		Erro padrão		
0,999	0,999		25,303		

Fonte: o autor.

TABELA 16 – REGRESSÃO LINEAR E ANOVA ARSÊNIO

Identificação	GI	SQ	MQ	F	p-valor
Regressão	1	8899896,12	8899896,12	23942,31017	3,24499E-36
Resíduo	23	8549,6182	371,7225304		
Total	24	8908445,738			
	Coeficientes	Erro padrão	Stat t	p-valor	
Interseção	55,6	11,56806427	4,806335676	7,54522E-05	
Variável X 1	3,750204444	0,024236612	154,7330287	3,24499E-36	
r	r ²		Erro padrão		
0,999	0,999		19,280		

Fonte: o autor.

TABELA 17 – REGRESSÃO LINEAR E ANOVA MERCÚRIO

Identificação	GI	SQ	MQ	F	p-valor
Regressão	1	296538201	296538201	30973,82745	1,68355E-37
Resíduo	23	220198,1216	9573,831374		
Total	24	296758399,1			
	Coeficientes	Erro padrão	Stat t	p-valor	
Interseção	-81,396	58,70757442	-1,386465048	0,178898872	
Variável X 1	10,82362667	0,061500036	175,9938279	1,68355E-37	
r	r ²		Erro padrão		
1,000	0,999		97,846		

Fonte: o autor.

TABELA 18 – REGRESSÃO LINEAR E ANOVA COBALTO

Identificação	GI	SQ	MQ	F	p-valor
Regressão	1	1,4628E+11	1,4628E+11	55832,2240 2	1,92786E-40
Resíduo	23	60259846,75	2619993,337		
Total	24	1,4634E+11			
	Coefficientes	Erro padrão	Stat t	p-valor	
Interseção	-12031,784	971,1836084	-12,38878405	1,16661E-11	
Variável X 1	144,2368693	0,610427125	236,2884339	1,92786E-40	
	r	r²	Erro padrão		
	1,000	1,000	1618,639		

Fonte: o autor.

TABELA 19 – REGRESSÃO LINEAR E ANOVA VANÁDIO

Identificação	GI	SQ	MQ	F	p-valor
Regressão	1	9,32463E+12	9,32463E+12	26572,84109	9,79585E-37
Resíduo	23	8070893303	350908404,5		
Total	24	9,3327E+12			
	Coefficientes	Erro padrão	Stat t	p-valor	
Interseção	-5415,992	11239,5296	-0,481869989	0,634451892	
Variável X 1	575,7972875	3,532243377	163,0117821	9,79585E-37	
	r	r²	Erro padrão		
	1,000	0,999	18732,549		

Fonte: o autor.

TABELA 20 – REGRESSÃO LINEAR E ANOVA NÍQUEL

Identificação	GI	SQ	MQ	F	p-valor
Regressão	1	1,19937E+12	1,19937E+12	42110,42865	4,93319E-39
Resíduo	23	655073719,6	28481466,07		
Total	24	1,20002E+12			
	Coefficientes	Erro padrão	Stat t	p-valor	
Interseção	-43549,144	3202,081789	-13,60025973	1,74825E-12	
Variável X 1	103,2523013	0,50315861	205,2082568	4,93319E-39	
	r	r²	Erro padrão		
	1,000	0,999	5336,803		

Fonte: o autor.

TABELA 21 – RESULTADOS PRECISÃO CÁDMIO

Identificação	Replicatas	[] µg/L	Teor (µg/g)	Intermediária (DPR%)	
				µg/L	µg/g
Precisão 1	Amostra 1	165,1	13,73		
	Amostra 2	166,1	13,84		
	Amostra 3	168,1	13,94		
	Amostra 4	167,9	13,97		
	Amostra 5	166,1	13,75		
	Amostra 6	168,2	13,94		
	DPR (%)	0,79	0,75		
Precisão 2	Amostra 1	166,3	13,75	1,07	1,25
	Amostra 2	168,0	13,97		
	Amostra 3	166,6	13,80		
	Amostra 4	167,3	13,74		
	Amostra 5	172,2	14,31		
	Amostra 6	167,4	13,70		
	DPR (%)	1,3	1,68		
Especificação		Repetibilidade:		≤20%	
		Intermediária:		≤25%	

Fonte: o autor.

TABELA 22 – RESULTADOS PRECISÃO CHUMBO

Identificação	Replicatas	[] µg/L	Teor (µg/g)	Intermediária (DPR%)	
				µg/L	µg/g
Precisão 1	Amostra 1	153,3	12,74	1,20	1,53
	Amostra 2	152,5	12,71		
	Amostra 3	152,8	12,67		
	Amostra 4	156,4	13,01		
	Amostra 5	154,3	12,78		
	Amostra 6	156,7	12,98		
	DPR (%)	1,18	1,14		
Precisão 2	Amostra 1	151,9	12,56	1,20	1,53
	Amostra 2	155,4	12,92		
	Amostra 3	154,8	12,82		
	Amostra 4	151,6	12,45		
	Amostra 5	156,4	13,00		
	Amostra 6	152,6	12,49		
	DPR (%)	1,31	1,86		
Especificação	Repetibilidade:			≤20%	
	Intermediária:			≤25%	

Fonte: o autor.

TABELA 23 – RESULTADOS PRECISÃO ARSÊNIO

Identificação	Replicatas	[] µg/L	Teor (µg/g)	Intermediária (DPR%)	
				µg/L	µg/g
Precisão 1	Amostra 1	454,2	37,76	1,13	1,23
	Amostra 2	461,4	38,45		
	Amostra 3	459,9	38,13		
	Amostra 4	457,7	38,08		
	Amostra 5	461,9	38,24		
	Amostra 6	460,5	38,15		
	DPR (%)	0,63	0,59		
Precisão 2	Amostra 1	461,4	38,16	1,13	1,23
	Amostra 2	467,8	38,89		
	Amostra 3	464,2	38,45		
	Amostra 4	460,4	37,82		
	Amostra 5	474,8	39,47		
	Amostra 6	465,5	38,08		
	DPR (%)	1,12	1,58		
Especificação	Repetibilidade:			≤20%	
	Intermediária:			≤25%	

Fonte: o autor.

TABELA 24 – RESULTADOS PRECISÃO MERCÚRIO

Identificação	Replicatas	[] µg/L	Teor (µg/g)	Intermediária (DPR%)	
				µg/L	µg/g
Precisão 1	Amostra 1	922,8	76,78	1,60	1,69
	Amostra 2	937,4	77,61		
	Amostra 3	928,2	76,90		
	Amostra 4	933,2	77,64		
	Amostra 5	930,6	77,05		
	Amostra 6	950,8	78,77		
	DPR (%)	1,03	0,95		
Precisão 2	Amostra 1	932,1	77,08	1,60	1,69
	Amostra 2	955,9	79,46		
	Amostra 3	946,0	78,36		
	Amostra 4	933,1	76,64		
	Amostra 5	975,6	81,09		
	Amostra 6	953,5	78,01		
	DPR (%)	1,71	2,08		
Especificação	Repetibilidade:			≤20%	
	Intermediária:			≤25%	

Fonte: o autor.

TABELA 25 – RESULTADOS PRECISÃO COBALTO

Identificação	Replicatas	[] µg/L	Teor (µg/g)	Intermediária (DPR%)	
				µg/L	µg/g
Precisão 1	Amostra 1	1706,0	141,83	1,13	1,52
	Amostra 2	1722,0	143,48		
	Amostra 3	1691,0	140,19		
	Amostra 4	1710,0	142,27		
	Amostra 5	1688,0	139,76		
	Amostra 6	1715,0	142,09		
	DPR (%)	0,79	0,98		
Precisão 2	Amostra 1	1692,0	139,92	1,13	1,52
	Amostra 2	1719,0	142,89		
	Amostra 3	1703,0	141,07		
	Amostra 4	1673,0	137,42		
	Amostra 5	1747,0	145,21		
	Amostra 6	1697,0	138,84		
	DPR (%)	1,49	2,01		
Especificação	Repetibilidade:			≤20%	
	Intermediária:			≤25%	

Fonte: o autor.

TABELA 26 – RESULTADOS PRECISÃO VANÁDIO

Identificação	Replicatas	[] µg/L	Teor (µg/g)	Intermediária (DPR%)	
				µg/L	µg/g
Precisão 1	Amostra 1	3151,0	261,96	1,28	1,45
	Amostra 2	3143,0	261,89		
	Amostra 3	3178,0	263,47		
	Amostra 4	3127,0	260,16		
	Amostra 5	3139,0	259,89		
	Amostra 6	3201,0	265,20		
	DPR (%)	0,88	0,77		
Precisão 2	Amostra 1	3161,0	261,40	1,28	1,45
	Amostra 2	3166,0	263,18		
	Amostra 3	3203,0	265,32		
	Amostra 4	3145,0	258,32		
	Amostra 5	3276,0	272,30		
	Amostra 6	3162,0	258,70		
	DPR (%)	1,52	1,97		
Especificação	Repetibilidade:			≤20%	
	Intermediária:			≤25%	

Fonte: o autor.

TABELA 27 - RESULTADOS PRECISÃO NÍQUEL

Identificação	Replicatas	[] µg/L	Teor (µg/g)	Intermediária (DPR%)	
				µg/L	µg/g
Precisão 1	Amostra 1	6966,0	579,12	1,34	1,51
	Amostra 2	6911,0	575,85		
	Amostra 3	6991,0	579,59		
	Amostra 4	7049,0	586,47		
	Amostra 5	7060,0	584,53		
	Amostra 6	7036,0	582,93		
	DPR (%)	0,82	0,68		
Precisão 2	Amostra 1	6917,0	572,00	1,34	1,51
	Amostra 2	6949,0	577,64		
	Amostra 3	6987,0	578,78		
	Amostra 4	6871,0	564,37		
	Amostra 5	7228,0	600,80		
	Amostra 6	7048,0	576,63		
	DPR (%)	1,81	2,11		
Especificação	Repetibilidade:			≤20%	
	Intermediária:			≤25%	

Fonte: o autor.

TABELA 28 – RESULTADOS DA EXATIDÃO DE CÁDMIO

Identificação	[] Teórica (µg/g)	[] µg/L	Teor (µg/g)	Recuperação (%)	Média	DPR (%)
Amostra 1	-	0	-	-	0	0
Amostra 2	-	0	-	-		
Amostra 3	-	0	-	-		
Exatidão 50% 1	6,25	81,8	6,78	108,5	109,7	1,5
Exatidão 50% 2	6,25	84,1	6,97	111,5		
Exatidão 50% 3	6,25	82,2	6,82	109,0		
Exatidão 100% 1	12,5	166,3	13,75	110,0	110,7	0,8
Exatidão 100% 2	12,5	168,0	13,97	111,7		
Exatidão 100% 3	12,5	166,6	13,80	110,4		
Exatidão 150% 1	18,75	258,6	21,46	114,5	113,5	0,7
Exatidão 150% 2	18,75	256,7	21,18	113,0		
Exatidão 150% 3	18,75	256,0	21,23	113,2		
Especificação				70% – 150%		

Fonte: o autor.

TABELA 29 – RESULTADOS DA EXATIDÃO DE CHUMBO

Identificação	[] Teórica (µg/g)	[] µg/L	Teor (µg/g)	Recuperação (%)	Média	DPR (%)
Amostra 1	-	0	-	-		
Amostra 2	-	0	-	-	0	0
Amostra 3	-	0	-	-		
Exatidão 50% 1	6,25	74,8	6,20	99,2		
Exatidão 50% 2	6,25	77,9	6,45	103,3	101,9	2,3
Exatidão 50% 3	6,25	77,8	6,45	103,2		
Exatidão 100% 1	12,5	151,9	12,56	100,5		
Exatidão 100% 2	12,5	155,4	12,92	103,3	102,1	1,4
Exatidão 100% 3	12,5	154,8	12,82	102,6		
Exatidão 150% 1	18,75	238,1	19,76	105,4		
Exatidão 150% 2	18,75	241,2	19,90	106,1	105,2	1,0
Exatidão 150% 3	18,75	235,2	19,50	104,0		
Especificação				70% – 150%		

Fonte: o autor.

TABELA 30– RESULTADOS DA EXATIDÃO DE ARSÊNIO

Identificação	[] Teórica (µg/g)	[] µg/L	Teor (µg/g)	Recuperação (%)	Média	DPR (%)
Amostra 1	-	0	-	-		
Amostra 2	-	0	-	-	0	0
Amostra 3	-	0	-	-		
Exatidão 50% 1	18,75	231,1	19,16	102,2		
Exatidão 50% 2	18,75	231,9	19,21	102,5	102,0	0,6
Exatidão 50% 3	18,75	228,9	18,98	101,2		
Exatidão 100% 1	37,50	461,4	38,16	101,7		
Exatidão 100% 2	37,50	467,8	38,89	103,7	102,7	1,0
Exatidão 100% 3	37,50	464,2	38,45	102,5		
Exatidão 150% 1	56,25	705,7	58,57	104,1		
Exatidão 150% 2	56,25	712,5	58,78	104,5	104,5	0,3
Exatidão 150% 3	56,25	710,8	58,94	104,8		
Especificação				70% – 150%		

Fonte: o autor.

TABELA 31 – RESULTADOS DA EXATIDÃO DE MERCÚRIO

Identificação	[] Teórica (µg/g)	[] µg/L	Teor (µg/g)	Recuperação (%)	Média	DPR (%)
Amostra 1	-	0	-	-		
Amostra 2	-	0	-	-	0	0
Amostra 3	-	0	-	-		
Exatidão 50% 1	37,50	465,5	37,85	100,9		
Exatidão 50% 2	37,50	478,1	38,87	103,6	102,3	1,3
Exatidão 50% 3	37,50	471,9	38,39	102,4		
Exatidão 100% 1	75,00	932,1	76,34	101,8		
Exatidão 100% 2	75,00	955,9	78,72	105,0	103,4	1,5
Exatidão 100% 3	75,00	946,0	77,63	103,5		
Exatidão 150% 1	112,50	1434,0	118,28	105,1		
Exatidão 150% 2	112,5	1427,0	117,00	104,0	104,9	0,8
Exatidão 150% 3	112,50	1443,0	118,91	105,7		
Especificação				70% – 150%		

Fonte: o autor.

TABELA 32 - RESULTADOS DA EXATIDÃO DE COBALTO

Identificação	[] Teórica (µg/g)	[] µg/L	Teor (µg/g)	Recuperação (%)	Média	DPR (%)
Amostra 1	-	14,5	-	-		
Amostra 2	-	13,9	-	-	13,90	4,8
Amostra 3	-	13,2	-	-		
Exatidão 50% 1	62,50	858,1	69,98	112,0		
Exatidão 50% 2	62,50	881,4	71,86	115,0	113,3	1,4
Exatidão 50% 3	62,50	864,7	70,55	112,9		
Exatidão 100% 1	125,00	1692,0	138,77	111,0		
Exatidão 100% 2	125,00	1719,0	141,14	113,4	112,1	1,1
Exatidão 100% 3	125,00	17,03	139,92	111,9		
Exatidão 150% 1	187,50	2599,0	214,56	114,4		
Exatidão 150% 2	187,50	2593,0	212,79	113,5	113,8	0,5
Exatidão 150% 3	187,50	2580,0	212,77	113,5		
Especificação				70% – 150%		

Fonte: o autor.

TABELA 33 – RESULTADOS DA EXATIDÃO DE VANÁDIO

Identificação	[] Teórica (µg/g)	[] µg/L	Teor (µg/g)	Recuperação (%)	Média	DPR (%)
Amostra 1	-	10,9	-	-		
Amostra 2	-	11,4	-	-	11,04	3,2
Amostra 3	-	10,8	-	-		
Exatidão 50% 1	125,00	1597,0	131,48	105,2		
Exatidão 50% 2	125,00	1617,0	133,03	106,4	105,7	0,6
Exatidão 50% 3	125,00	1600,0	131,75	105,4		
Exatidão 100% 1	250,00	3161,0	260,49	104,2		
Exatidão 100% 2	250,00	3166,0	262,26	104,9	105,0	0,7
Exatidão 100% 3	250,00	3203,0	264,41	105,8		
Exatidão 150% 1	375,00	4863,0	402,70	107,4		
Exatidão 150% 2	375,00	4824,0	397,09	105,9	106,7	0,7
Exatidão 150% 3	375,00	4837,0	400,14	106,7		
Especificação				70% – 150%		

Fonte: o autor.

TABELA 34 – RESULTADOS DA EXATIDÃO DE NÍQUEL

Identificação	[] Teórica (µg/g)	[] µg/L	Teor (µg/g)	Recuperação (%)	Média	DPR (%)
Amostra 1	-	69,4	-	-		
Amostra 2	-	74,9	-	-	69,80	7,0
Amostra 3	-	65,1	-	-		
Exatidão 50% 1	250,0	3488,0	283,37	113,3		
Exatidão 50% 2	250,0	3595,0	292,01	116,8	115,4	1,6
Exatidão 50% 3	250,0	3565,0	289,82	115,9		
Exatidão 100% 1	500,0	6917,0	566,23	113,2		
Exatidão 100% 2	500,0	6949,0	571,84	114,4	114,1	0,6
Exatidão 100% 3	500,0	6987,0	573,00	114,6		
Exatidão 150% 1	750,0	10770,0	888,08	118,4		
Exatidão 150% 2	750,0	10480,0	858,88	114,5	116,2	1,7
Exatidão 150% 3	750,0	10520,0	866,47	115,5		
Especificação				70% – 150%		

Fonte: o autor.