

**UNIVERSIDADE DE SOROCABA**  
**PRÓ REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E INOVAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Thais Hora Paulino

**VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE**  
**FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X POR ENERGIA DISPERSIVA (EDXRF) PARA**  
**ANÁLISES EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Sorocaba/SP**

**2022**

Thais Hora Paulino

**VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE  
FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X POR ENERGIA DISPERSIVA (EDXRF) PARA  
ANÁLISES EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Tese apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. José Martins de Oliveira Junior

**Sorocaba/SP**

**2022**

### Ficha Catalográfica

Paulino, Thais Hora  
P353v      Validação do método para utilização da técnica de fluorescência de raios-X por energia dispersiva (EDXRF) para análises em ciências farmacêuticas / Thais Hora Paulino. – 2022.  
81 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. José Martins de Oliveira Junior.  
Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2022.

1. Raios X. 2. Fluorescência. 3. Estudo de validação. 4. Ciências farmacêuticas. I. Oliveira Junior, José Martins, orient. II. Universidade de Sorocaba. III. Título.

Thais Hora Paulino

**VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE  
FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X POR ENERGIA DISPERSIVA (EDXRF) PARA  
ANÁLISES EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Tese aprovada como requisito parcial  
para obtenção do grau de Doutor no  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Farmacêuticas da  
Universidade de Sorocaba.

Aprovado em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA:**

Prof. Dr. José Martins de Oliveira Junior  
Universidade de Sorocaba

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marta Maria Duarte Carvalho Vila  
Universidade de Sorocaba

Prof. Dr. Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão  
Universidade de Sorocaba

Prof. Dr. Norberto Aranha  
Universidade de Sorocaba

Prof. Dr. Daniel Bertoli Gonçalves  
Universidade de Sorocaba

## **AGRADECIMENTOS**

Em 2016 eu resolvi fazer parte do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UNISO como aluna especial no mestrado.

Realizei a inscrição e iniciei em uma das disciplinas que o programa oferecia. As aulas eram semanais e eu não tinha muita disponibilidade de horário, então saía do serviço no horário do almoço em Tatuí direto para Sorocaba.

Iniciar o mestrado foi uma mistura de admiração e medo de não conseguir, já que faziam 10 anos que eu tinha terminado a graduação, no entanto, continuei pensando se iria conseguir, pois meu tempo era limitado para o mestrado, achei que não daria para continuar, afinal, nem orientador eu tinha, como tentaria uma taxa para estudar? Entrei na sala da professora Dra. Luciane, coordenadora do programa na época e disse que iria parar, e ela como um dos seres humanos mais fantásticos que eu já conheci, me pegou pela mão e disse que ia procurar um orientador para mim.

Visitamos a sala de todos professores que, apesar de muito solícitos, não conseguiam me ajudar devido a minha indisponibilidade de horário. Mas ela não desistiu. Disse que mandaria um e-mail para o professor Martins que era o único que não estava ali, claro, ele é o Pró-reitor. E então, ele me respondeu no mesmo dia, marcou uma reunião para saber sobre minhas ideias e eu fui. Quando eu cheguei lá, na sala da Pró-Reitoria de Pós-graduação, conversei com o professor e ele conseguiu me colocar no seu projeto de pesquisa. A partir daquele dia, não houve uma única vez que eu fui até a UNISO sem agradecer a Deus pelo caminho e assim será para sempre.

Eu naquele momento ainda não sabia que tinha acabado de conhecer um anjo que Deus havia colocado em meu caminho.

Comecei a cumprir as normas para o pré-projeto, fui aprovada com taxa e iniciei o sonho da minha vida que era muito maior que eu mesma havia sonhado.

As disciplinas começaram e eu fui conhecendo os melhores professores que eu já vi, reunidos na mesma instituição.

Hoje, no doutorado, trago um pedacinho de cada um deles, mas me inspiro e agradeço ao meu orientador, Professor Martins, com o desejo que ele continue inspirando alunos como fez comigo e peço a Deus que eu tenha ao menos 1/3 de sua capacidade de ensinar e aprender. Professor, você é responsável por toda essa trajetória e pela realização do meu sonho, Obrigada!

## RESUMO

Impurezas elementares em medicamentos podem surgir de várias fontes. Eles podem ser catalisadores residuais que foram adicionados intencionalmente em síntese ou podem estar presentes como impurezas. Portanto, há necessidade de se investigar a composição química desses medicamentos, uma vez que a presença em concentrações excessivas de alguns elementos, pode levar a uma série de distúrbios metabólicos. Com isso em mente, é necessário não só investigar a composição dos elementos químicos com a finalidade de detectar a presença de contaminantes nocivos à saúde ou acima dos níveis estabelecidos pelos órgãos reguladores, como validar a técnica utilizada para investigação para utilização em ciências farmacêuticas. O objetivo deste trabalho foi validar a Técnica de Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia (EDXRF) para identificação e quantificação da composição química elementar de matérias primas, medicamentos e produtos utilizados pela área das ciências farmacêuticas. A metodologia utilizada foi baseada na seleção de amostras prensadas usando máquina de compressão para formarem pastilhas. Pastilhas com concentrações conhecidas dos elementos químicos de interesse foram usadas para calibrar o sistema de EDXRF. As análises qualitativas e quantitativas foram feitas no Laboratório de Física Nuclear Aplicada da Universidade de Sorocaba – Uniso, com foco nos seguintes elementos químicos pertencentes a classe 1 (As, Pb, Cd, Hg) e a classe 2A (Ni, Co e V) usando o equipamento de fluorescência de Raios-X fabricado pela empresa Malvern Panalytical, modelo Epsilon 1. O estudo mostrou que o processo de validação do método para utilização da técnica de EDXRF para uso em Ciências Farmacêuticas foi eficiente e atendeu a todos os parâmetros exigidos nos compêndios oficiais requeridos para sua validação, conforme mostrados nos testes de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez conduzidas neste estudo. A análise se mostrou além de rápida, precisa e muito versátil podendo ser adotada como técnica recomendada pelas Farmacopeias, quando o problema for a determinação química elementar.

**Palavras-chave:** Fluorescência de Raios-X. EDXRF. Validação. Ciências Farmacêuticas. Metais Pesados.

## **ABSTRACT**

Elemental impurities in drugs can arise from several sources. They may be residual catalysts that were intentionally added in synthesis or they may be present as impurities. Therefore, there is a need to investigate the chemical composition of these drugs, since the presence in excessive concentrations of some elements, as well as the deficiency of others, can lead to a number of metabolic disorders. With this in mind, it is necessary not only to investigate the composition of the chemical elements in order to detect the presence of contaminants harmful to health or above the levels established by regulatory agencies, but also to validate the technique used for investigation for use in pharmaceutical sciences. The objective of this work was to validate the Energy Dispersive X-Ray Fluorescence (EDXRF) technique as a method accepted by the Brazilian Pharmacopeia for the identification and quantification of the elemental chemical composition of raw materials and products used in pharmaceutical sciences. The methodology used is based on the selection of samples pressed using a compression machine to form pellets. Pellets with known concentrations of the chemical elements of interest were used to calibrate the EDXRF system. The qualitative and quantitative analyses were performed in the Applied Nuclear Physics Laboratory of the University of Sorocaba - Uniso, focusing on the following chemical elements belongs to class 1 (As, Pb, Cd, Hg) and class 2A (Ni, Co and V) using X-ray fluorescence equipment manufactured by Malvern Panalytical, model Epsilon 1. The study that shows the method validation process for the use of the EDXRF technique for use in Pharmaceutical Sciences is highly efficient and meets all the parameters required in the mandatory official compendia for its validation, as shown in the tests of selectivity, linearity, precision, limit of detection, limit of detection and robustness in this study. An analysis proved to be fast, accurate and very versatile and can be adjusted as a technique recommended by Pharmacopoeias, when the problem for an elementary determination.

**Keywords:** X-Ray Fluorescence. EDXRF. Validation. Pharmaceutical Sciences. Heavy metals.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                |                                                          |
|----------------|----------------------------------------------------------|
| <b>ANVISA</b>  | Agência Nacional de Vigilância Sanitária                 |
| <b>As</b>      | Arsênio                                                  |
| <b>Ca</b>      | Cálcio                                                   |
| <b>Cd</b>      | Cádmio                                                   |
| <b>Cl</b>      | Cloro                                                    |
| <b>cps</b>     | contagens por segundo                                    |
| <b>DPR</b>     | Desvio Padrão Relativo                                   |
| <b>EDXRF</b>   | Fluorescência de Raios-X por Dispersão em Energia.       |
| <b>Fe</b>      | Ferro                                                    |
| <b>g</b>       | grama                                                    |
| <b>Hg</b>      | Mercúrio                                                 |
| <b>INMETRO</b> | Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia |
| <b>K</b>       | Potássio                                                 |
| <b>LMP</b>     | Limite Máximo Permitido                                  |
| <b>MAPA</b>    | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento      |
| <b>Mg</b>      | Magnésio                                                 |
| <b>Mn</b>      | Manganês                                                 |
| <b>Na</b>      | Sódio                                                    |
| <b>Ni</b>      | Níquel                                                   |
| <b>Pb</b>      | Chumbo                                                   |
| <b>ppm</b>     | Partes por Milhão                                        |
| <b>Si</b>      | Silício                                                  |
| <b>Ti</b>      | Titânio                                                  |
| <b>V</b>       | Vanádio                                                  |
| <b>XRF</b>     | Fluorescência de Raios-X                                 |
| <b>µg</b>      | Micrograma                                               |

## LISTA DE FIGURAS

|                   |                                                                                                                                                                     |    |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 3.1</b> | Ilustração da incidência do feixe de radiação sobre o elétron.                                                                                                      | 26 |
| <b>Figura 3.2</b> | Ilustração dos saltos quânticos realizados pelos elétrons.                                                                                                          | 27 |
| <b>Figura 5.1</b> | Imagem do equipamento de fluorescência de raios-X por energia dispersiva.                                                                                           | 30 |
| <b>Figura 5.2</b> | Desenho esquemático mostrando o efeito do tamanho das partículas na camada analisada.                                                                               | 33 |
| <b>Figura 5.3</b> | Espectro típico de fluorescência de raios-X.                                                                                                                        | 38 |
| <b>Figura 6.1</b> | Relação das concentrações de 70 µg/g, 35 µg/g, 17,5 µg/g, 8 µg/g, 4 µg/g, 2 µg/g e 1 µg/g nominais e as respostas (concentrações medidas) para o elemento Cádmio.   | 50 |
| <b>Figura 6.2</b> | Relação das concentrações de 70 µg/g, 35 µg/g, 17,5 µg/g, 8 µg/g, 4 µg/g, 2 µg/g e 1 µg/g nominais e as respostas (concentrações medidas) para o elemento Chumbo.   | 51 |
| <b>Figura 6.3</b> | Relação das concentrações de 70 µg/g, 35 µg/g, 17,5 µg/g, 8 µg/g, 4 µg/g, 2 µg/g e 1 µg/g nominais e as respostas (concentrações medidas) para o elemento Mercúrio. | 52 |
| <b>Figura 6.4</b> | Relação das concentrações de 70 µg/g, 35 µg/g, 17,5 µg/g, 8 µg/g, 4 µg/g, 2 µg/g e 1 µg/g nominais e as respostas (concentrações medidas) para o elemento Arsênio.  | 53 |
| <b>Figura 6.5</b> | Relação das concentrações de 70 µg/g, 35 µg/g, 17,5 µg/g, 8 µg/g, 4 µg/g, 2 µg/g e 1 µg/g nominais e as respostas (concentrações medidas) para o elemento Cobalto.  | 54 |

|                    |                                                                                                                                                                                           |    |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 6.6</b>  | Relação das concentrações de 70 µg/g, 35 µg/g, 17,5 µg/g, 8 µg/g, 4 µg/g, 2 µg/g e 1 µg/g nominais e as respostas (concentrações medidas) para o elemento Vanádio.                        | 55 |
| <b>Figura 6.7</b>  | Relação das concentrações de 70 µg/g, 35 µg/g, 17,5 µg/g, 8 µg/g, 4 µg/g, 2 µg/g e 1 µg/g nominais e as respostas (concentrações medidas) para o elemento Níquel.                         | 56 |
| <b>Figura 6.8</b>  | Resultados de precisão obtidos pelo desvio padrão relativo (DPR), para os elementos Cádmio, Chumbo, Mercúrio, Arsênio, Cobalto, Vanádio e Níquel na concentração alta (~35µg/g).          | 58 |
| <b>Figura 6.9</b>  | Resultados de precisão obtidos pelo desvio padrão relativo (DPR), para os elementos Cádmio, Chumbo, Mercúrio, Arsênio, Cobalto, Vanádio e Níquel na concentração intermediária (~15µg/g). | 59 |
| <b>Figura 6.10</b> | Resultados de precisão obtidos pelo desvio padrão relativo (DPR), para os elementos Cádmio, Chumbo, Mercúrio, Arsênio, Cobalto, Vanádio e Níquel na concentração baixa (~2 µg/g).         | 61 |
| <b>Figura 6.11</b> | Representação dos valores obtidos a partir da equação de recuperação, medido em triplicata para concentração alta (~35 µg/g).                                                             | 64 |
| <b>Figura 6.12</b> | Representação dos valores obtidos a partir da equação de recuperação, medido em triplicata para concentração intermediária (~15 µg/g).                                                    | 65 |
| <b>Figura 6.13</b> | Representação dos valores obtidos a partir da equação de recuperação, medido em triplicata para concentração baixa (~2 µg/g).                                                             | 66 |

## LISTA DE TABELAS

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.1</b> | Limite máximo permitido (LMP) da concentração de elementos químicos pela Farmacopeia Brasileira 6ª Edição e Farmacopeia Americana (United States Pharmacopoeia – USP 40) quando em uso oral.                                                                                                                                | 16 |
| <b>Tabela 1.2</b> | Elementos a serem considerados em avaliação de risco e o limite permitido de exposição diária (LPED) para impurezas elementares.                                                                                                                                                                                            | 17 |
| <b>Tabela 5.1</b> | Definição dos parâmetros do sistema para as medições realizadas no equipamento Epsilon 1.                                                                                                                                                                                                                                   | 37 |
| <b>Tabela 5.2</b> | Parâmetros de validação considerados do método desenvolvido.                                                                                                                                                                                                                                                                | 39 |
| <b>Tabela 5.3</b> | Exposição Diária Permitida (EDP) e Limite de Quantificação pela Ingestão Diária Máxima (IDM) de medicamentos por via oral para elementos da classe 1 e 2A.                                                                                                                                                                  | 45 |
| <b>Tabela 6.1</b> | Resultados das análises da Matriz I: celulose microcristalina e os elementos contaminantes pertencentes a classe 1 e 2A e resultados da Matriz II: celulose microcristalina, contaminantes pertencentes a classe 1 e 2A e elementos leves (Na, Mg, Si, Cl, K, Ca, Fe e Ti) em concentrações altas, intermediárias e baixas. | 48 |
| <b>Tabela 6.2</b> | Resultados dos coeficientes de correlação (R), Intercepto (b) e Inclinação (a) dos gráficos de linearidade.                                                                                                                                                                                                                 | 49 |
| <b>Tabela 6.3</b> | Precisão demonstrada pelo desvio padrão relativo (DPR) da concentração alta (~35µg/g).                                                                                                                                                                                                                                      | 57 |
| <b>Tabela 6.4</b> | Precisão demonstrada pelo desvio padrão relativo (DPR) da concentração intermediária (~15µg/g).                                                                                                                                                                                                                             | 58 |

|                    |                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 6.5</b>  | Precisão demonstrada pelo desvio padrão relativo (DPR) da concentração baixa (2µg/g).                                                                                                                                             | 60 |
| <b>Tabela 6.6</b>  | Exatidão da concentração alta (~35µg/g) de cada elemento medida pelo desvio padrão relativo e pelo ensaio de recuperação.                                                                                                         | 62 |
| <b>Tabela 6.7</b>  | Exatidão da concentração média (~15 µg/g) de cada elemento medida pelo desvio padrão relativo e pelo ensaio de recuperação.                                                                                                       | 62 |
| <b>Tabela 6.8</b>  | Exatidão da concentração baixa (~2µg/g) de cada elemento medida pelo desvio padrão relativo e pelo ensaio de recuperação.                                                                                                         | 63 |
| <b>Tabela 6.9</b>  | Concentrações individuais e médias dos limites de detecção (LD) realizadas pelo software do equipamento de fluorescência de raios-X.                                                                                              | 67 |
| <b>Tabela 6.10</b> | Concentrações individuais e médias dos limites de quantificação (LQ) realizadas pelo software do equipamento de fluorescência de raios-X.                                                                                         | 67 |
| <b>Tabela 6.11</b> | Resultados do valor médio para o parâmetro de robustez do método para os elementos Cádmio (Cd), Chumbo (Pb), Mercúrio (Hg), Arsênio (As), da classe 1 e Cobalto (Co), Vanádio (V) e Níquel (Ni) da classe 2A, calculados em µg/g. | 68 |
| <b>Tabela 7.1</b>  | Ensaio de recuperação para os comprimidos de Metformina de 500mg medidas em triplicata e calculada a média dos resultados.                                                                                                        | 70 |
| <b>Tabela 7.2</b>  | Ensaio de recuperação para os comprimidos de Sinvastatina de 20mg medidas em triplicata e calculada a média dos resultados.                                                                                                       | 70 |
| <b>Tabela 7.3</b>  | Ensaio de recuperação para os comprimidos de Glibenclamida de 5mg medidas em triplicata e calculada a média dos resultados.                                                                                                       | 71 |

## LISTA DE QUADROS

|                   |                                       |    |
|-------------------|---------------------------------------|----|
| <b>Quadro 3.1</b> | História da Fluorescência de raios-X. | 24 |
|-------------------|---------------------------------------|----|

## SUMÁRIO

|                                                                              |           |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>CAPÍTULO 1.....</b>                                                       | <b>14</b> |
| <b>1.1. Introdução.....</b>                                                  | <b>14</b> |
| <b>CAPÍTULO 2.....</b>                                                       | <b>19</b> |
| <b>2.1. Validação .....</b>                                                  | <b>19</b> |
| 2.1.1. Seletividade .....                                                    | 20        |
| 2.1.2. Linearidade .....                                                     | 20        |
| 2.1.3. Precisão .....                                                        | 21        |
| 2.1.4. Exatidão .....                                                        | 21        |
| 2.1.5. Limite de Detecção .....                                              | 22        |
| 2.1.6. Limite de Quantificação.....                                          | 22        |
| 2.1.7. Robustez .....                                                        | 22        |
| <b>CAPÍTULO 3.....</b>                                                       | <b>24</b> |
| <b>3.1. Fluorescência de raios-X.....</b>                                    | <b>24</b> |
| 3.1.2. Técnica de Fluorescência de raios-X .....                             | 26        |
| <b>CAPÍTULO 4.....</b>                                                       | <b>29</b> |
| <b>4.1. Objetivos.....</b>                                                   | <b>29</b> |
| 4.1.1. Objetivo Geral.....                                                   | 29        |
| 4.1.2. Objetivo Específico .....                                             | 29        |
| <b>CAPÍTULO 5.....</b>                                                       | <b>30</b> |
| <b>5.1. Material e Métodos.....</b>                                          | <b>30</b> |
| <b>5.1.1. Material .....</b>                                                 | <b>30</b> |
| 5.1.1.1. Equipamento de fluorescência de raios-X por energia dispersiva..... | 30        |
| 5.1.1.2. Balança analítica.....                                              | 31        |
| 5.1.1.3. Misturador rotativo elétrico .....                                  | 31        |
| 5.1.1.4. Prensa.....                                                         | 32        |
| <b>5.1.1.5. Paquímetro .....</b>                                             | <b>32</b> |
| <b>5.1.2. Métodos .....</b>                                                  | <b>32</b> |
| 5.1.2.1. Preparo dos Padrões .....                                           | 32        |

|                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.1.2.2. Prensagem das substâncias para obtenção de pastilhas padrões ..... | 34        |
| 5.1.2.3. Calibração do sistema.....                                         | 34        |
| 5.1.2.3.1. Primeira calibração .....                                        | 35        |
| 5.1.2.3.2. Segunda calibração .....                                         | 36        |
| 5.1.2.4. Setup do sistema .....                                             | 36        |
| 5.1.2.5. Obtenção dos dados .....                                           | 37        |
| 5.1.2.6. Validação .....                                                    | 38        |
| 5.1.2.6.1. Seletividade.....                                                | 39        |
| 5.1.2.6.2. Linearidade .....                                                | 40        |
| 5.1.2.6.3. Precisão .....                                                   | 40        |
| 5.1.2.6.4. Exatidão .....                                                   | 41        |
| 5.1.2.6.4.1. Ensaios de recuperação .....                                   | 41        |
| 5.1.2.6.5. Limite de detecção .....                                         | 41        |
| 5.1.2.6.6. Limite de quantificação .....                                    | 43        |
| 5.1.2.6.7. Robustez .....                                                   | 45        |
| 5.1.2.6.8. Intervalo/Faixa de Trabalho.....                                 | 45        |
| 5.1.2.7. Amostras reais (comprimidos).....                                  | 46        |
| <b>CAPÍTULO 6.....</b>                                                      | <b>47</b> |
| <b>6.1. Resultados e Discussão.....</b>                                     | <b>47</b> |
| 6.1.1. Resultados dos parâmetros da validação do método .....               | 47        |
| 6.1.2. Seletividade .....                                                   | 47        |
| 6.1.3. Linearidade .....                                                    | 49        |
| 6.1.3.1. Cádmio (Cd).....                                                   | 50        |
| 6.1.3.2. Chumbo (Pb).....                                                   | 51        |
| 6.1.3.3. Mercúrio (Hg) .....                                                | 52        |
| 6.1.3.4. Arsênio (As) .....                                                 | 52        |
| 6.1.3.5. Cobalto (Co).....                                                  | 53        |
| 6.1.3.6. Vanádio (V) .....                                                  | 54        |
| 6.1.3.7. Níquel (Ni).....                                                   | 55        |
| 6.1.4. Precisão .....                                                       | 56        |
| 6.1.5. Exatidão .....                                                       | 61        |
| 6.1.5.1. Ensaios de recuperação .....                                       | 63        |
| 6.1.6. Limite de Detecção .....                                             | 66        |

|                                                                                                                           |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 6.1.7. Limite de Quantificação.....                                                                                       | 67        |
| 6.1.8. Robustez.....                                                                                                      | 68        |
| <b>CAPÍTULO 7.....</b>                                                                                                    | <b>70</b> |
| <b>7.1. Estudo de caso de recuperação a partir de comprimidos, fabricados pela indústria farmacêutica do Brasil .....</b> | <b>70</b> |
| <b>CAPÍTULO 8.....</b>                                                                                                    | <b>72</b> |
| <b>8.1. Considerações Finais .....</b>                                                                                    | <b>72</b> |
| <b>CAPÍTULO 9.....</b>                                                                                                    | <b>74</b> |
| <b>9.1. Referências.....</b>                                                                                              | <b>74</b> |
| <b>CAPÍTULO 10.....</b>                                                                                                   | <b>79</b> |
| <b>10.1. Anexos .....</b>                                                                                                 | <b>79</b> |
| <b>10.1.1. Apresentação no evento: V International Workshop on Rational Use of Medicines .....</b>                        | <b>79</b> |
| <b>10.1.2. Publicação nos anais do evento: V International Workshop on Rational Use of Medicines.....</b>                 | <b>80</b> |
| <b>10.1.3. Apresentação no evento (modalidade oral): II Congresso Brasileiro de Ciências Farmacêuticas on-line. ....</b>  | <b>81</b> |
| <b>10.1.4. Palestra ministrada no evento: XXII Jornada Farmacêutica 2021 UNISO.....</b>                                   | <b>81</b> |

## **CAPÍTULO 1**

### **1.1. Introdução**

Impurezas elementares em medicamentos podem surgir de várias fontes. Eles podem ser catalisadores residuais que foram adicionados intencionalmente em síntese ou podem estar presentes como impurezas (por exemplo, através de interações com o equipamento ou recipiente ou por estar presente em componentes do fármaco). Devido às impurezas elementares não proporcionarem qualquer benefício terapêutico para o paciente, os seus níveis no produto farmacêutico devem ser controlados dentro de limites aceitáveis (ICH, 2019).

Controle de metais pesados em medicamentos e produtos farmacêuticos intermediários e finais é um passo essencial no processo de fabricação. Não só por causa de sua capacidade de catalisar a decomposição, mas também devido ao seu potencial de toxicidade e sérios riscos à saúde (KUSHWAHA, 2020).

Alguns elementos químicos identificados são de vital importância para o metabolismo humano (OBIAJUNWA; ADEBAJO; OMOBUWAJO, 2002) e outros, como os metais pesados Arsênio (As), Cádmio (Cd), Chumbo (Pb) e Mercúrio (Hg) (elementos pertencentes a classe 1 na classificação de toxicidade e probabilidade de ocorrer em produtos farmacêuticos) são considerados tóxicos, podendo trazer sérios riscos à saúde quando absorvidos acima de certos limites.

O Arsênio é proeminentemente tóxico e cancerígeno e é extensamente disponível sob a forma de óxidos ou sulfuretos. Mesmo em níveis baixos a exposição ao Arsênio pode causar náusea, vômitos, redução da produção de eritrócitos e leucócitos, batimento cardíaco anormal, sensação de picada nas mãos e pernas e danos aos vasos sanguíneos. A exposição em longo prazo pode levar à formação de lesões cutâneas internas, cânceres, problemas neurológicos, doença pulmonar, doença vascular periférica, hipertensão, doenças cardiovasculares e diabetes mellitus (JAISHANKAR et al., 2014; SINGH; KUMAR; SAHU, 2007; SMITH; LINGAS; RAHMAN, 2000).

O envenenamento por Cádmio está associado a uma série de distúrbios, falhas renais e problemas cardiovasculares. O consumo de Cádmio pode causar mineralização óssea através de lesão óssea ou por disfunção renal. Exposição a baixas concentrações de Cádmio, por longos períodos, ocorre a sua deposição nos

rins levando à doença renal, ossos frágeis e danos aos pulmões (BERNARD, 2008; JAISHANKAR et al., 2014; NKANSAH et al., 2016).

O chumbo é um metal altamente tóxico cuja utilização generalizada causou extensa contaminação ambiental e problemas de saúde em muitas partes do mundo. O Chumbo ingerido além de certo limiar pode aumentar a pressão arterial acompanhada de efeitos debilitantes para órgãos-chave como o rim e o cérebro. A exposição aguda pode causar perda de apetite, dor de cabeça, hipertensão, dor abdominal, disfunção renal, fadiga, insônia, artrite, alucinações e vertigem. A exposição crônica de chumbo pode resultar em retardo mental, defeitos congênitos, psicose, autismo, alergias, dislexia, perda de peso, hiperatividade, paralisia, fraqueza muscular, danos cerebrais, danos nos rins, podendo até causar a morte (JAISHANKAR et al., 2014; MARTINS, 2009; NKANSAH et al., 2016).

A exposição ao elemento Mercúrio orgânico e/ou inorgânico pode danificar o cérebro, rins e o feto em desenvolvimento. Exposição a altas doses de mercúrio pode alterar as funções cerebrais e levar a tremores, problemas de memória, irritabilidade e alterações na visão e audição (ALINA et al., 2012).

No entanto, a implementação de estratégias de triagem contínua deve ser considerada para complementar o resultado teórico da abordagem de avaliação de impurezas elementares e para verificar a conformidade contínua do produto com os limites declarados ao longo de todo o ciclo de vida do produto (SAUER et al., 2020).

A técnica de fluorescência de raios-X por energia dispersiva (EDXRF) para identificação e quantificação de metais e não metais, não é indicada como técnica válida pelas Farmacopeias Brasileira, porém a Farmacopeia Americana já prevê o uso desta técnica indicando que não são necessários a precisão e a confiabilidade para validação desse método, mas deve-se verificar sua adequação nas condições reais de uso (USP42-NF37, 2019). Nesse contexto, quando o procedimento de fluorescência de raios-X (seja por dispersão de energia ou comprimento de onda) é usado para realizar análises, como uma alternativa aos testes indicados em compêndios oficiais a validação é necessária.

De acordo com a Farmacopeia Brasileira 6ª Edição (BRASIL, 2019), as técnicas aprovadas para quantificação dos metais pesados, além de uma gama de outros elementos é o ensaio limite por formação de partículas sólidas de sulfetos ou determinação por espectrometria atômica.

O método por espectrometria atômica possibilita quantificar cada elemento contaminante na amostra, com margem de segurança, levando em consideração os limites impostos pelas Farmacopeias (FRADKIN; DURA; NOORDERMEER, 2010). No entanto, a técnica de absorção atômica requer o uso de equipamentos de alto custo, a preparação das amostras e a calibração do sistema precisam ser feitas por técnicos altamente especializados, inviabilizando seu uso na grande maioria dos laboratórios.

O ensaio limite por formação de partículas de sulfeto trata-se de um método semiquantitativo, e possibilita somente afirmar se a amostra contém ou não determinados elementos, o que torna o método menos sensível e menos seletivo.

Por outro lado, a técnica da EDXRF pode ser usada para quantificar praticamente todos os elementos de interesse da indústria farmacêutica, como os metais pesados, nos limites máximos permitidos (LMP) estabelecidos pelas Farmacopeias. Porém não foi validada para uso em produtos farmacêuticos, pela Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019).

A espectrometria de fluorescência de raios-X (XRF) representa um procedimento analítico adequado para a triagem de impurezas elementares em medicamentos em conformidade com os padrões compendiais, é simples e economicamente viável para uso em larga escala, em comparação com outras metodologias comuns (SAUER et al., 2020).

Normas para ingestão diária de algumas impurezas são estabelecidas através de limites diários de concentrações avaliando a segurança da ingestão de cada um destes elementos. A Tabela 1.1 traz o Limite Máximo Permitido (LMP) da concentração de elementos químicos pela Farmacopeia Brasileira e Americana para ingestão por via oral (BRASIL, 2019; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2017).

**Tabela 1.1 – Limite máximo permitido (LMP) da concentração de elementos químicos pela Farmacopeia Brasileira 6ª Edição e Farmacopeia Americana (United States Pharmacopoeia – USP 40) quando em uso oral.**

| Elemento      | Farmacopeia Brasileira<br>Uso Oral<br>Limite Máximo (µg/g) | Farmacopeia Americana<br>Uso Oral<br>Limite Máximo (µg/g) |
|---------------|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Arsênio (As)  | 1,5                                                        | 1,5                                                       |
| Cádmio (Cd)   | 0,5                                                        | 0,5                                                       |
| Chumbo (Pb)   | 1,0                                                        | 0,5                                                       |
| Cobalto (Co)  | ---                                                        | 5,0                                                       |
| Mercúrio (Hg) | 1,5                                                        | 3,0                                                       |
| Níquel (Ni)   | 25,0                                                       | 20,0                                                      |
| Vanádio (V)   | 25,0                                                       | 10,0                                                      |

Fonte: Adaptado de BRASIL (2019); UNITED STATES PHARMACOPEIA (2017).

A Tabela 1.2 traz os elementos a serem considerados em sua classificação em relação ao risco de toxicidade e probabilidade de ocorrer em produtos farmacêuticos, além de fornecer recomendações para a inclusão de impurezas de elementos na avaliação de risco. Esta tabela pode ser aplicada a todas as fontes de impurezas elementares do medicamento e o limite permitido de exposição diária (LPED) para impurezas elementares (ICH, 2019).

**Tabela 1.2 – Elementos a serem considerados em avaliação de risco e o limite permitido de exposição diária (LPED) para impurezas elementares.**

| Elemento      | Classe | Uso Oral<br>LPED<br>(µg/dia)* |
|---------------|--------|-------------------------------|
| Arsênio (As)  | 1      | 15,0                          |
| Cádmio (Cd)   | 1      | 5,0                           |
| Chumbo (Pb)   | 1      | 5,0                           |
| Mercúrio (Hg) | 1      | 30,0                          |
| Cobalto (Co)  | 2A     | 50,0                          |
| Níquel (Ni)   | 2A     | 200,0                         |
| Vanádio (V)   | 2A     | 100,0                         |

\*Os valores apresentados nesta tabela representam concentrações em microgramas por grama de impurezas elementares em medicamentos, as substâncias de medicamentos e os excipientes permitidos. Estes limites de concentração são destinados para avaliar o teor de impureza elementar em medicamentos com doses diárias de não mais do que 10 gramas por dia (valores calculados expressos na tabela).

Fonte: Adaptado de ICH (2019).

Estudos sobre a validação de métodos empregando a técnica de Fluorescência de raios-X em produtos farmacêuticos são escassos, Sauer et al., (2020) desenvolveram um estudo que demonstra a capacidade da EDXRF no que diz respeito às análises em medicamentos de uso oral. O desenvolvimento e a validação do método enfocaram os elementos da classe 1 (Cd, Pb, As, Hg) e da classe 2A (Co, V, Ni), conforme definido pela diretriz ICH Q3D (ICH, 2019). A fim de limitar os parâmetros de validação, uma abordagem foi aplicada com base nas propriedades da matriz. Isso inclui a caracterização abrangente dos parâmetros de desempenho do método para matrizes farmacêuticas usando um conjunto de amostras limite que representam variações de matriz típicas de produtos farmacêuticos sólidos. Assim pelos fatos expostos, este trabalho demonstrou a validação do método para utilização da técnica de Fluorescência de Raios-X com foco nos elementos das classes 1 e 2A, em matriz de Celulose, cumprindo os parâmetros de validação como: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez,

utilizando o equipamento modelo Epsilon 1, fabricado pela empresa Malvern Panalytical e foi apresentado no V International Workshop on Rational Use of Medicines e II Congresso Brasileiro de Ciências Farmacêuticas on-line com certificações demonstradas na seção 10.

## **CAPÍTULO 2**

### **2.1. Validação**

A validação de determinado procedimento analítico, objetiva demonstrar que o mesmo é adequado aos objetivos propostos, ou seja, que os parâmetros de desempenho avaliados atendem aos critérios de aceitação preconizados. Trata-se de um estudo experimental e integralmente documentado (BRASIL, 2011; WALSH, 1999).

O desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou implementação de método conhecido, envolve processo de avaliação que estime sua eficiência na rotina do laboratório (BRITO et al., 2003).

O conceito “avaliação dos desempenhos e limitações de um método analítico” vem da indústria farmacêutica, a fim de ter uma ferramenta para avaliar as características dos medicamentos, atingindo os requisitos de qualidade exigida pelos órgãos reguladores para registro e comercialização dos medicamentos (PERIS-VICENTE; ESTEVE-ROMERO; CARDA-BROCH, 2015).

O desenvolvimento de métodos analíticos necessita que se estime a eficiência do processo de avaliação na rotina do laboratório. Órgãos reguladores como ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) e INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia) exigem das empresas auditadas a validação de métodos (BRASIL, 2011, 2019; INMETRO, 2020).

O método adequado deve ser selecionado considerando a instrumentação disponível e de preferência seguindo esta ordem de prioridade:

- Um método oficial. A agência credenciadora já avaliou a adequação do método.
- Um método analítico cujos desempenhos foram determinados através de ensaio inter laboratorial, de acordo com as exigências de guia oficial.
- Um método de referência bibliográfica ou um método desenvolvido internamente.
- Desenvolvimento de um novo método (RAMBLA-ALEGRE; ESTEVE-ROMERO; CARDA-BROCH, 2012).

A utilização de método analítico não descrito em compêndio oficial reconhecido requer a realização de uma validação analítica, conforme parâmetros estabelecidos nesta resolução, levando-se em consideração as condições técnico-operacionais (BRASIL, 2017).

Determinado método é considerado validado se suas características estiverem de acordo com os pré-requisitos estabelecidos (BRITO et al., 2003).

Existem 2 tipos de validação: a i) completa e a ii) parcial. A validação completa é quando a metodologia não se apresenta descrita em compêndios oficiais e todos os parâmetros analíticos são relativos ao método e são determinados: a) seletividade, b) linearidade, c) precisão, d) exatidão, e) limite de detecção, f) limite de quantificação e g) robustez. São estes parâmetros que garantem confiabilidade, precisão e reprodutibilidade do método, garantindo que prováveis variabilidades sejam vistas de maneira controlada. A validação parcial deve avaliar, pelo menos, os parâmetros de precisão, exatidão e seletividade (BRASIL, 2017).

#### **2.1.1. Seletividade**

Seletividade é a propriedade de um sistema de medição, utilizado com um procedimento de medição especificado, segundo a qual o sistema fornece valores medidos para um ou vários mensurados, tal que os valores de cada mensurando sejam independentes uns dos outros ou de outras grandezas associadas ao fenômeno, corpo ou substância em estudo (BRASIL, 2011).

A seletividade é definida como o grau em que um método pode quantificar uma substância com precisão na presença de substâncias capazes de influenciar a resposta analítica nas condições indicadas do ensaio para a amostra matriz em estudo. Devido à presença de diversas interferências nas condições de ensaio é impraticável considerar todas as potenciais agentes (GUSTAVO GONZÁLEZ; ÁNGELES HERRADOR, 2007).

#### **2.1.2. Linearidade**

Linearidade é a capacidade de o procedimento produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. A faixa de trabalho linear da curva de calibração deve, necessariamente, contemplar a faixa de concentração esperada para a amostra de ensaio. Sempre que possível, o valor esperado para a amostra

de ensaio deve se situar em torno do centro da curva de calibração (BRASIL, 2011).

A linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra. Além disso, uma relação linear deve ser avaliada em toda a faixa de trabalho estabelecida para o procedimento analítico. Assim, o procedimento experimental deve ser conduzido via a seguinte estratégia:

- Deve-se utilizar, no mínimo, 5 (cinco) concentrações diferentes para as soluções preparadas em, no mínimo, triplicata (BRASIL, 2017).

As análises de linearidade devem demonstrar uma relação linear entre a concentração do analito e a resposta corrigida preparando nada menos do que cinco padrões em concentrações que abrangem a concentração prevista da amostra de teste. A curva padrão deve então ser avaliada usando métodos estatísticos apropriados, como regressão de mínimos quadrados. O coeficiente de correlação, intercepto e a inclinação da linha de regressão devem ser determinados. Um coeficiente de correlação maior que 0,99 é geralmente considerado como evidência de ajuste aceitável dos dados à linha de regressão (CHANDRAN; SINGH, 2007; FURUKAWA et al., 2017).

### **2.1.3. Precisão**

Precisão é a estimativa da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas (BRASIL, 2011).

A precisão deve avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado (BRASIL, 2017).

### **2.1.4. Exatidão**

A exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro (BRASIL, 2017).

Expressa a proximidade de acordo entre o valor, que é aceito tanto como um convencional valor verdadeiro e o valor encontrado. Menor viés significa maior veracidade (CHANDRAN; SINGH, 2007).

É calculada como a porcentagem de recuperação pelo ensaio da quantidade adicionada conhecida de analito na amostra, ou como a diferença entre a média e o valor verdadeiro aceito, juntamente com os intervalos de confiança (USP42-NF37, 2019).

A exatidão é baseada na taxa de recuperação, que é a porcentagem do valor calculado da concentração nominal em comparação com a concentração verdadeira. É possível determinar a exatidão por conduzir estudos de recuperação usando a matriz apropriada enriquecida com concentrações conhecidas de elementos químicos (FURUKAWA et al., 2017).

#### **2.1.5. Limite de Detecção**

Limite de detecção deve ser demonstrado pela obtenção da menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2017).

#### **2.1.6. Limite de Quantificação**

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2017).

#### **2.1.7. Robustez**

O estudo da robustez de um procedimento analítico procura avaliar o quão sensível o resultado analítico é às variações nas condições experimentais do procedimento analítico. Esse estudo deve ser realizado demonstrando a estabilidade do procedimento sob diferentes condições (tempo, temperatura, pH, entre outras), diferentes fabricantes de insumos, colunas cromatográficas entre outras variações. Todas as possíveis variações de condições experimentais, que podem ocorrer durante a rotina analítica, devem estar respaldadas pelos estudos de robustez do procedimento analítico e seus efeitos estimados.

A robustez de um método analítico é a capacidade do método em não sofrer alterações por pequenas variações nos parâmetros de execução do método. A

robustez fornece uma indicação da confiabilidade do método durante uma aplicação rotineira experimental (INMETRO, 2020).

## CAPÍTULO 3

### 3.1. Fluorescência de raios-X

A história da origem dos raios-X é conhecida há séculos como uma descoberta que revolucionou a física e ainda hoje esta história é implementada e renovada a cada descoberta da ciência em suas diferentes aplicabilidades.

O Quadro 3.1 mostra a história dos raios-X desde o século XIX até meados do século passado.

**Quadro 3.1 – História da Fluorescência de raios-X.**

| Ano  | Pesquisador                | História                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|------|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1895 | Wilhelm Conrad Roëntgen    | Ele notou que alguns cristais de platinocianeto de bário, perto de uma descarga de tubo completamente envolto em papel preto, tornou-se luminescente quando a descarga ocorreu. Examinando as sombras lançadas pelos raios Roëntgen traçou a origem dos raios às paredes do tubo de descarga. Por seu trabalho Roëntgen recebeu o primeiro Prêmio Nobel de Física, em 1901. Foi o primeiro de seis a ser concedido no campo de raios-X em 1927. As semelhanças óbvias com a luz levaram aos testes cruciais para estabelecer os princípios da óptica ondulatória, como: polarização, difração, reflexão e refração. |
| 1896 | Campbell-Swinton           | Introduziu um alvo definido (platina) para os raios catódicos atingirem; esse alvo foi chamado de anticátodo.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 1897 | Thomson                    | A designação “ X ” (desconhecido) dos raios, gerados pela paralisação nos alvos anódicos dos raios catódicos, identificados como elétrons. A natureza dos raios-X foi objeto de muita controvérsia.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 1906 | Barkla                     | Encontrou evidências em experimentos de espalhamento de que os raios-X podem ser polarizados e, portanto se comportam como ondas, mas os estudos de W. H. Bragg sobre a ionização indicaram que poderiam ser interpretado como corpúsculos.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 1908 | Barkla e Sadler            | Deduziram, por meio de experimentos de espalhamento, que os raios-X continham componentes característicos do material do alvo; eles chamaram esses componentes de radiações características K e L.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 1912 | Laue, Friedrich e Knipping | A natureza ondulatória essencial dos raios-X foi estabelecida, onde mostraram que os raios-X podem ser difratados por um cristal (sulfato de cobre penta hidratado), o qual atuou como uma rede de difração tridimensional. W. H. Bragg e W. L. Bragg (pai e filho) encontraram a lei para a reflexão seletiva de raios-X.                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 1913 | W. H. Bragg                | Radiações tinham comprimentos de onda bem definidos. Esses experimentos demonstraram claramente a existência de um espectro de linha sobreposto a um espectro contínuo (“ branco ”).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 1913 | Moseley                    | Mostrou que os comprimentos de onda das linhas eram característicos do elemento do qual o alvo foi feito e, ainda, mostrou que eles tinham a mesma sequência que os números atômicos, permitindo assim que os números atômicos sejam determinados inequivocamente pela primeira vez.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 1919 | Stenström                  | Encontrou os desvios da lei de Bragg e os interpretou como o efeito da refração.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

**Quadro 3.1 – História da Fluorescência de raios-X (continuação)**

|                  |                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1920             | Broglie, W. L. Bragg e Siegbahn e Bergengren | A absorção característica K foi observada pela primeira vez por De Broglie e interpretada por W. L. Bragg e Siegbahn. O efeito nos espectros de absorção de raios-X do estado químico do absorvedor foi observado por Bergengren.                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 1924             | Lindh e Lundquist                            | A influência do estado químico do emissor nos espectros de emissão de raios-X foi observada. A teoria dos espectros de raios-X foi elaborada por Sommerfeld e outros.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 1929             | Larsson                                      | A dispersão anômala de raios-X foi descoberta.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 1932             | Kronig                                       | Estrutura fina estendida dos espectros de absorção de raios-X interpretada qualitativamente. Logo após os primeiros espectros primários excitados por feixes de elétrons em um tubo de raios-X foram observados, verificou-se que os raios-X fluorescentes secundários foram excitados em qualquer material irradiado com feixes de raios-X primários e que os espectros desses raios-X fluorescentes eram idênticos em comprimentos de onda e intensidades relativas com aqueles excitados quando o espécime foi bombardeado com elétrons. |
| A partir de 1932 | Hevesy e Coster                              | Detalham as possibilidades da espectroscopia de raios-X fluorescentes como um meio de avaliação qualitativa e análise elementar quantitativa.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |

Fonte: Adaptado de (VANGRIEKEN; MARCOWIWZ, 2001).

Até 1966 a Fluorescência de raios-X era realizada unicamente por espectrômetros por dispersão em comprimento de onda (WDXRF), abreviação de *Wavelength Dispersive X-ray Fluorescence*, baseados na lei de Bragg, os quais necessitam de um movimento sincronizado e preciso entre o cristal difrator e o detector (JENKINS R., 1981).

Com o desenvolvimento do detector semi condutor de Si(Li), capaz de discriminar raios-X de energias próximas, foi possível o surgimento da fluorescência de raios-X por dispersão de energia (EDXRF), abreviação de *Energy Dispersive X-ray Fluorescence*, também conhecida como fluorescência de raios-X por energia dispersiva, com instrumentação menos dispendiosa e emprego mais prático (BERTIN, 1975; IAEA - INTERNACIONAL AGENCY ENERGY ATOMIC, 1970; KATSANOS, 1980; SIEGBAHN, 1965).

Existe uma gama de estudos sobre a fluorescência de raios-X, compreendendo uma infinidade de áreas e aplicações, sendo a técnica utilizada para diversos segmentos como na a) Geologia: análise e caracterização de rochas, minérios e solos; b) Ambiental: estudo da contaminação de solos, águas, ar e estudos de espécimes vegetais; c) Arte e arqueologia: análise de obras de arte, pinturas, etc. Na área da saúde a técnica é menos utilizada se comparada a outras áreas do conhecimento, no entanto, pode ser aplicada em estudos na área médica e farmacêutica.

### 3.1.2. Técnica de Fluorescência de raios-X

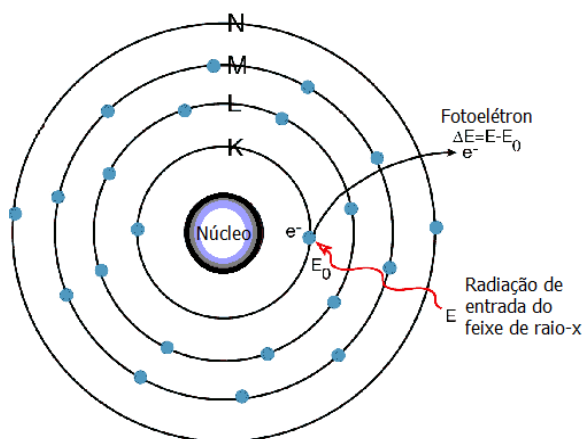
A análise de XRF é uma técnica robusta, que combina alta precisão e exatidão com preparação de amostra simples e rápida. Além disso, a XRF pode fornecer informações qualitativas e quantitativas sobre o objeto em estudo. Na XRF, a irradiação por um feixe de raios-X primário causa a emissão de raios-X fluorescentes, com energias características dos elementos presentes na amostra (VANGRIEKEN; MARCOWIWZ, 2001).

Especialmente notável é a superioridade da XRF quando comparadas a outras técnicas de análise elementar, tais como a determinação por espectrometria de absorção atômica e o ensaio limite para metais pesados por formação de partículas sólidas de sulfeto, quando se considera o esforço requerido na preparação da amostra, na medição não destrutiva, no gasto com consumíveis, além da facilidade de uso dos equipamentos para indivíduos não treinados. (SAUER et al., 2020)

A espectroscopia XRF é uma técnica usada para caracterizar os elementos químicos medindo a radiação fluorescente emitida pelos átomos, quando excitados por uma fonte de raios-X primária (REBIERE et al., 2019).

Para que ocorram as transições eletrônicas que originarão os raios-X característicos é necessário retirar os elétrons das camadas mais internas do átomo, as chamadas camadas K, L, M através da incidência de um feixe de radiação sobre a amostra analisada, conforme mostra a Figura 3.1 (PARREIRA, 2006; SÁNCHEZ et al., 2008).

Figura 3.1 – Ilustração da incidência do feixe de radiação sobre o elétron.

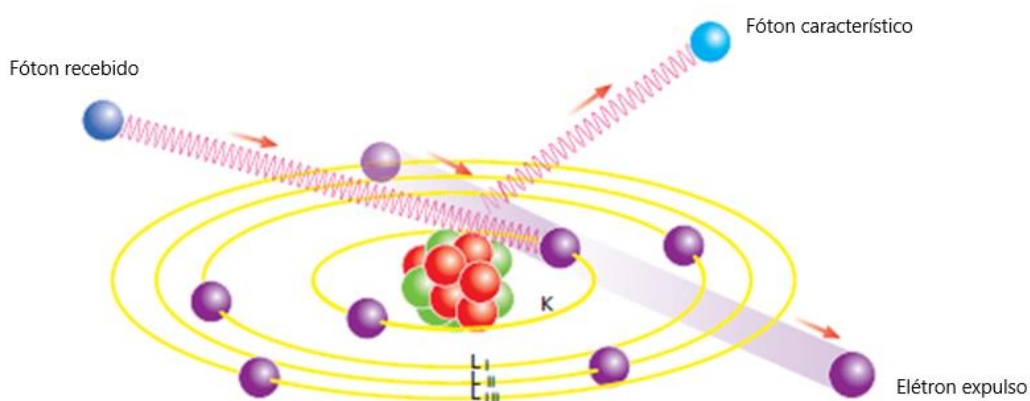


Fonte: Adaptado de AMPTEK (AMPTEK, 2017).

Disponível em: <<http://www.amptek.com/xrf/>>. Acesso em: 11 jan. 2020.

Quando os elétrons das camadas interiores são arrancados, criam-se vacâncias, que serão preenchidas por elétrons das camadas superiores e, portanto, ao realizarem esta transição, o excesso de energia é liberado na forma de um fóton, denominado raio-X característico conforme mostrado na Figura 3.2. O fóton então, que é característico de cada elemento químico que o emitiu é detectado por um detector que possui alta resolução em energia, conseguindo com isso, separar os raios-X característicos dos diferentes elementos emissores, permitindo assim a identificação e quantificação dos elementos químicos presentes na amostra. Esta técnica é denominada Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia (EDXRF) (CLETO, 2013).

**Figura 3.2 – Ilustração dos saltos quânticos realizados pelos elétrons**



Fonte: Adaptado de (BROUWER, 2010).

A XRF é uma técnica não destrutiva, relativamente sensível permitindo que se faça análises simultâneas, qualitativa, semi quantitativa ou quantitativa de amostras nos estados sólido, líquido e gasoso (MARGUÍ; QUERALT; HIDALGO, 2009).

A EDXRF é uma técnica que pode contribuir muito para as ciências farmacêuticas, por permitir a identificação e quantificação simultânea de uma gama enorme de elementos, com diferentes concentrações desde  $\mu\text{g/g}$  (ppm) até 100%, num curto espaço de tempo.

A preparação de amostras apresenta, para qualquer método analítico, um dos mais importantes passos para uma análise confiável. No caso da XRF a preparação das amostras é relativamente simples.

É possível usar a técnica da Fluorescência de raios-X para análises quantitativas sem uma calibração prévia do equipamento, usando neste caso os parâmetros fundamentais que descrevem o sistema e, com isso obter as concentrações dos analitos de interesse presentes na amostra. No entanto, quando se deseja medir baixas concentrações (1 µg/g) de determinados analito, como é o caso neste trabalho, para os elementos da classe 1 e 2A mostrados na Tabela 1.1, a calibração do sistema se faz necessária, usando materiais de referência numa matriz próxima daquela que se deseja trabalhar.

Deve-se destacar que as calibrações feitas para uso em XRF têm a vantagem de serem estáveis por longos períodos de tempo antes de exigir recalibração, ao contrário de outras técnicas de análise elementar (DAVIS; FURUKAWA, 2017).

A Fluorescência de raios-X já é usada na indústria farmacêutica. Algumas aplicações descrevem o controle de qualidade de produtos farmacêuticos, sendo o uso mais frequente focado na detecção de metais residuais em substâncias medicamentosas e medicamentos. Para a análise de metais pesados (provenientes de reagentes, materiais de partida, equipamentos de reação, solventes ou catalisadores), a técnica de Fluorescência de raios-X teve sucesso para detecção de níveis de dose baixa. No entanto, poucos estudos são dedicados à análise do controle de qualidade dos medicamentos (REBIERE et al., 2019).

No que se refere à quantificação, a técnica é precisa e confiável e assim que validada, poderá ser uma técnica que conseqüentemente, pode passar a ser usada nos laboratórios de análise em geral.

A técnica requer apenas alguns cuidados para os elementos cujas concentrações admissíveis estejam abaixo de 1 µg/g, pois nestes casos o desvio na medida poderá ficar da mesma ordem de grandeza do limite admissível. Podemos citar neste caso os limites estabelecidos para os metais pesados Pb e Cd objetos deste estudo.

Apesar de simples e poderosa a técnica de EDXRF ainda não é uma técnica que está oficialmente nos compêndios oficiais para análise da determinação de metais pesados para uso em ciências farmacêuticas, mostrando a importância e originalidade deste estudo.

## **CAPÍTULO 4**

### **4.1. Objetivos**

#### **4.1.1. Objetivo Geral**

Validar método para identificação e quantificação da composição química elementar de matérias primas e produtos farmacêuticos utilizando a técnica de fluorescência de raios-X

#### **4.1.2. Objetivo Específico**

- Preparar dos padrões para calibração do equipamento de Fluorescência de raios-X;
- Calibrar o equipamento de Fluorescência de raios-X;
- Analisar quantitativamente amostras reais;
- Avaliar como a Técnica da Fluorescência de raios-X se comporta em situações próximas a real, usando formulações parecidas as usadas pela indústria farmacêutica, considerando os limites de quantificação indicados pela Farmacopeia Brasileira.

## **CAPÍTULO 5**

### **5.1. Material e Métodos**

#### **5.1.1. Material**

##### **5.1.1.1. Equipamento de fluorescência de raios-X por energia dispersiva**

Utilizou-se neste trabalho um equipamento de fluorescência de raios-X por energia dispersiva comercializado pela empresa Malvern Panalytical, modelo Epsilon 1, conforme mostrado na figura 5.1.

**Figura 5.1 – Imagem do equipamento de fluorescência de raios-X por energia dispersiva**



Fonte: Adaptado de Malvern Panalytical (MALVERN PANALYTICAL, 2019)

O Epsilon 1 é um analisador de fluorescência por energia dispersiva, totalmente integrado, composto por um espectrômetro, computador embutido, tela sensível ao toque e software de análise. O equipamento produz dados rápidos e precisos, com o mínimo de dependência do operador e da preparação de amostras. O custo total de operação é, portanto, muito menor que o de outras técnicas analíticas, como a espectrometria de absorção atômica.

O Epsilon 1 pode ser calibrado com materiais de referência que correspondem à composição das amostras de rotina. Essas calibrações geram dados com alta precisão, podendo ser calibrado para uma grande variedade de aplicações da indústria. É um instrumento de bancada, que pode analisar simultaneamente elementos da tabela periódica, desde o elemento químico Sódio (Na) até o elemento Amerício (Am). O Epsilon 1 utiliza para excitação das amostras uma fonte raios-X com alvo de prata, com energia variável entre 10 kV a 50 kV. Usa detector de Silício (Silicon Drift Diode – SDD) com resolução em energia de 125 eV (medida da largura do pico a meia altura, para raios-X oriundos de uma fonte de  $^{55}\text{Fe}$  na energia de 5.9 keV). As medidas são realizadas na pressão atmosférica, podendo-se usar um conjunto de filtros colocado na frente do detector, sendo possível, o usuário fornece detalhes a respeito da composição química da amostra ou do agente aglutinante usado para fazer as pastilhas, o tempo de medida, o tipo de filme usados na separação da amostra do sistema de detecção, dentre outros (MALVERN PANALYTICAL, 2019).

O equipamento Epsilon 1 está instalado no Laboratório de Física Nuclear Aplicada da UNISO (LAFINAU), localizado na Universidade de Sorocaba (UNISO), sito a Rodovia Raposo Tavares Km 92.5, Cidade Universitária Prof. Aldo Vannucchi, 18023-000, Sorocaba, SP.

#### **5.1.1.2. Balança analítica**

A balança analítica da marca: QUIMIS, modelo: M214Ai foi utilizada para pesagem dos componentes necessários para o preparo dos padrões.

#### **5.1.1.3. Misturador rotativo elétrico**

O misturador rotativo elétrico foi desenvolvido no LAFINAU, portanto, é um equipamento de fabricação própria, que produz movimentos de rotação controlados por computador, no porta amostra, o qual foi preenchido com esferas de aço, cujo objetivo final é misturar, triturar e homogeneizar os elementos químicos com a matriz, antes da confecção das pastilhas.

#### **5.1.1.4. Prensa**

Uma prensa da marca Amef, modelo AP 25 T, foi utilizada para confecção das pastilhas, sendo ajustada para carga de 10 T e tempo de prensagem de 30 s.

#### **5.1.1.5. Paquímetro**

O paquímetro digital da marca Digimess foi utilizado para medir as pastilhas confeccionadas.

### **5.1.2. Métodos**

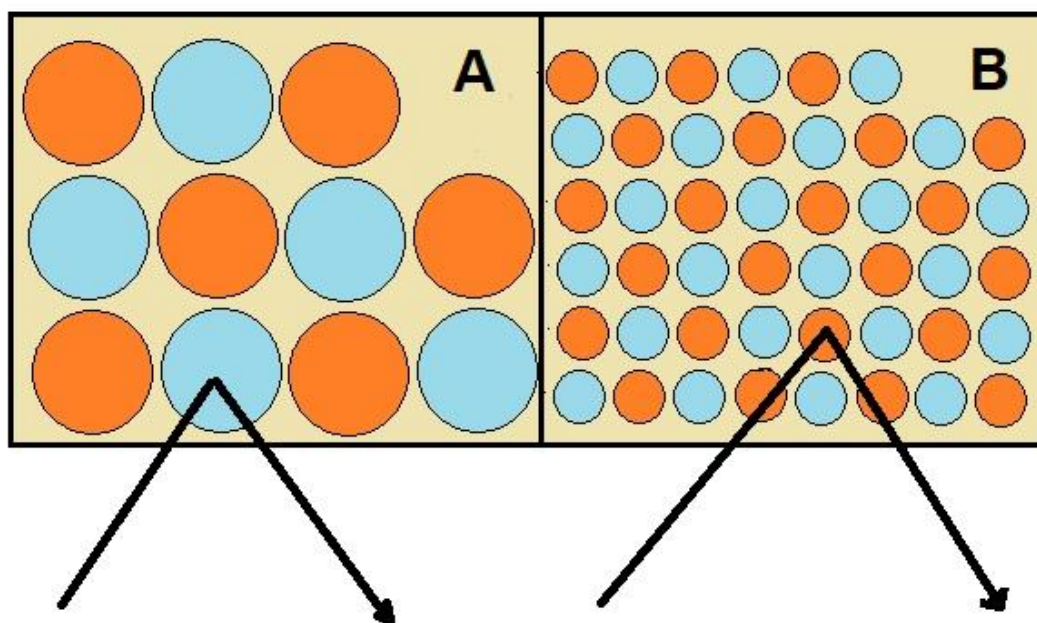
#### **5.1.2.1. Preparo dos Padrões**

A técnica de fluorescência de raios-X permite a análise de quase todos os tipos de materiais (sólidos, líquidos). Neste trabalho foram utilizadas pastilhas sólidas que são denominadas “padrão”, obtidas a partir da prensagem de uma matriz em pó a base de celulose microcristalina, contaminada com os elementos químicos de referência, objetos deste estudo. A homogeneização da matriz com seus contaminantes antes da confecção das pastilhas se mostrou de suma importância para a repetibilidade dos resultados. Por isso, a etapa de preparação dos padrões, no que diz respeito ao tamanho e a homogeneização das partículas, devem ser feita com muito cuidado. Cada pastilha (padrão) usada neste estudo passou por um processo de homogeneização dos seus componentes antes da prensagem, através do uso do misturador rotativo elétrico, no qual foram introduzidas esferas de aço com diâmetro aproximado entre 5–10 mm, sendo configurado para efetuar ciclos de agitação em períodos pré-definidos pelo usuário, que neste trabalho ficaram em torno de 1 hora de agitação, permitindo assim uma perfeita homogeneização das amostras antes do processo de prensagem.

A Figura 5.2 mostra de forma esquemática o efeito do tamanho das partículas no processo de excitação dos elementos químicos presentes no padrão. Lembrando que a fluorescência de raios-X, principalmente no que se refere aos elementos químicos de baixo número atômico, é um processo que ocorre na superfície da amostra. Assim, qualquer rugosidade ou a presença de partículas com granulometria

maiores na superfície poderá interferir no processo de excitação da amostra e, conseqüentemente, na produção dos raios-X característicos que fornecerão a identificação e concentração dos elementos. As partes A e B da Figura 5.2 mostram esquematicamente a diferença no processo de excitação dos átomos de uma substância, em função do tamanho das partículas que a compõe. Na parte B da Figura 5.2 os raios-X conseguem atingir camadas distintas enquanto em na parte A da mesma Figura, os mesmos raios-X atingem apenas uma camada, mostrando assim o efeito que o tamanho das partículas pode produzir no resultado final. Interpretação semelhante pode ser feita se o processo de homogeneização não for bem feito.

**Figura 5.2 – Desenho esquemático mostrando o efeito do tamanho das partículas na camada analisada.**



**A: Partículas de granulometria maior, mostrando que os raios-X de excitação, só atingem a primeira camada de partículas na amostra.**

**B: Partículas de granulometria menor, mostrando uma maior penetração dos raios-X de excitação na amostra.**

Fonte: Elaboração própria.

As pastilhas usadas neste trabalho foram confeccionadas usando-se como matriz celulose microcristalina (marca: Valdequímica e Labsynth), com granulometria 101  $\mu\text{m}$ , as quais foram contaminadas com os elementos químicos de interesse (analito), tais como: As, Pb, Cd, Hg, Co, V, Ni, Na, Mg, Si, Cl, K, Ca, Fe e Ti, nas concentrações necessárias para este estudo. Os analitos usados são materiais de referência fornecidos pela empresa Chemplex Industries Inc. (Spectro Standards XRF reference material preparation kit number 6700). O kit contém 50 compostos

diferentes, sendo que a maioria das substâncias são óxidos. Para se chegar as concentrações necessárias, muitas vezes próximas a 1 µg/g foram necessárias diluições sucessivas do analito na matriz de celulose. As diluições foram feitas usando-se o método de diluição geométrica, sempre partindo de uma concentração mais alta de analito em torno de 70 µg/g, que depois de misturada e homogeneizada passava pelo processo de diluição geométrica. Cada diluição foi intercalada por um processo de homogeneização. Ao atingir a concentração desejada, uma porção de 4 g da mistura era separada para a confecção da pastilha. Foram confeccionadas pastilhas para diferentes concentrações dos diferentes analitos usados neste trabalho.

#### **5.1.2.2. Prensagem das substâncias para obtenção de pastilhas padrões**

As substâncias foram prensadas para se obter pastilhas padrões utilizando máquina de compressão ajustada para carga de 10 toneladas e tempo de prensagem de 30s, usando-se aproximadamente 4 g de material (matriz + analito). Ao final do processo de prensagem os padrões tinham aproximadamente 4 mm de altura por 30 mm de diâmetro e todos foram novamente pesados.

#### **5.1.2.3. Calibração do sistema**

A análise quantitativa dos raios-X característicos provenientes do processo de fluorescência poderia ter sido realizada usando-se a calibração do sistema, que vem calibrado de fábrica e a princípio é independente da matriz utilizada. No entanto, para aumentarmos a precisão da calibração original de fábrica, construiu-se curvas de calibração usando-se os materiais de referência descritos na seção 5.1.1.6.

Neste trabalho optou-se por construir as curvas de calibração usando-se material de referência, pois não encontrou-se material de referência certificado nas concentrações e com o tipo de analito que precisou-se para este estudo. Foram feitas pastilhas em diferentes concentrações para os metais pesados As, Pb, Cd, Hg, Co, V, Ni e também para os elementos leves Na, Mg, Si, Cl, K, Ca, Fe e Ti. A matriz utilizada como base e diluente foi a celulose microcristalina, uma vez que é uma das matrizes mais utilizada pela indústria farmacêutica para a confecção de comprimidos, e por ser formada por átomos de baixo número atômico ( $C_6H_{10}O_5$ ), não produz raios-X

característicos com energia suficiente para chegarem ao sistema de detecção, interferindo pouco no processo de fluorescência.

A calibração foi realizada em duas etapas, a saber: i) calibração usando apenas a matriz de celulose microcristalina e os metais pesados de interesse neste estudo, ou seja, As, Pb, Cd, Hg, Co, V, Ni e ii) calibração usando-se a matriz de celulose microcristalina, com os metais pesados e os elementos leves de interesse, como: Na, Mg, Si, Cl, K, Ca, Fe e Ti. Isso foi necessário porque ao tentar-se usar a calibração feita com os metais pesados na matriz de celulose para o estudo dos elementos leves, percebemos que havia um desvio na quantificação tanto dos elementos leves bem como dos elementos pesados. Isso ocorre devido a interferência que raios-X característicos emitidos por alguns elementos, podem produzir em outros elementos presentes no padrão (o nome usado na maioria dos trabalhos científicos para esta interferência é efeito matriz, mas não estando ligado diretamente a matriz de celulose usada neste estudo, sendo apenas o nome do efeito). Este efeito (matriz) os raios-X característicos emitidos pelos elementos pesados podem, por exemplo, excitar os elementos leves que não haviam sido incluídos no padrão na primeira calibração, gerando assim alterações nas concentrações medidas. A interferência entre os elementos presentes no padrão produz uma diminuição na concentração medida dos elementos pesados, ao mesmo tempo em que aumenta a concentração medida para os elementos leves presentes no padrão. Por causa deste fenômeno tivemos que fazer uma segunda calibração do sistema de fluorescência, usando um padrão com todos os elementos que pretendíamos trabalhar, ou seja, considerando os elementos pesados e os elementos leves, uma vez que a indústria farmacêutica trabalha com estes elementos em seus excipientes farmacêuticos, para a fabricação dos seus produtos.

Este processo de calibração é importante, no entanto, foi trabalhoso e consumiu uma boa parte do tempo dispensado neste trabalho.

#### **5.1.2.3.1. Primeira calibração**

A primeira calibração foi realizada apenas para metais pesados considerando os elementos da classe 1 (Cd, Pb, Hg e As) e da classe 2A (Co, V e Ni), nas concentrações aproximadas de 70 µg/g, 35 µg/g, 17,5 µg/g, 8,75 µg/g, 4,37 µg/g, 2,2 µg/g e 1 µg/g, colocados na matriz de celulose.

Esta calibração foi realizada para verificar se era possível identificar os metais pesados acima listados na matriz de celulose, e também acabou sendo usada na determinação do parâmetro de linearidade, uma vez que ela atendeu os requisitos necessários para cumprir as recomendações para análise deste parâmetro.

#### **5.1.2.3.2. Segunda calibração**

A segunda calibração foi realizada para metais pesados da classe 1 (Cd, Pb, Hg e As) e os elementos leves Na, Mg, Si, Cl, K, Ca, Fe e Ti. As concentrações usadas foram de aproximadamente 35 µg/g, 17,5 µg/g, 8,5 µg/g e 2,5 µg/g para os metais da classe 1 e de aproximadamente 1% (10.000 µg/g), 0,5% (5.000 µg/g), 0,25% (2.500 µg/g) e 0,06% (625 µg/g) para todos os elementos leves.

Esta calibração foi necessária para garantir a qualidade da resposta analítica, considerando amostras reais, uma vez que ela atende todos os requisitos necessários para cumprir as recomendações dos demais parâmetros – Seletividade, Precisão, Faixa de Trabalho, Exatidão, Limite de Detecção, Limite de Quantificação e Robustez.

As pastilhas usadas para calibrar o sistema seguiram as mesmas especificações das pastilhas feitas para amostras.

#### **5.1.2.4. Setup do sistema**

O Epsilon 1 foi ajustado para operar com um conjunto diferente de parâmetros, dependendo do conjunto de elementos químicos a ser analisado. A Tabela 5.1 mostra o conjunto de parâmetros utilizados neste trabalho. Por exemplo, para a obtenção dos raios-X característicos provenientes da linha  $K\alpha$  do elemento Arsênio, utilizou-se a condição Ni-Mo (significa que todos os elementos presentes neste intervalo da tabela periódica, que vai do Níquel até o Molibdênio, serão excitados da mesma forma), cujo tempo de medida foi ajustado para 1500 s, a tensão dos raios-X usados na excitação foi ajustada para 50 kV, a corrente usada foi de 100 µA e o detector ajustado para aquisição no modo normal. Como a potência máxima do Epsilon 1 é de 5 W, procurou-se sempre ajustar a tensão e a corrente de forma a maximizar a potência e, o tempo foi ajustado de forma a obter-se os valores estatísticos para os eventos que se pretendia medir neste estudo.

**Tabela 5.1 – Definição dos parâmetros do sistema para as medições realizadas no equipamento Epsilon 1.**

| Canal dos elementos | Linha      | Nome da condição (linha) | Tempo de Medida (s) | Tensão (kV) | Corrente ( $\mu$ A) | Filtro-Espessura ( $\mu$ m) | Detector       |
|---------------------|------------|--------------------------|---------------------|-------------|---------------------|-----------------------------|----------------|
| As                  | K $\alpha$ | Ni-Mo                    | 1.500               | 50          | 100                 | Ag                          | Normal         |
| Ca                  | K $\alpha$ | K-V                      | 900                 | 12          | 300                 | Al-50                       | Normal         |
| Cd                  | K $\alpha$ | Rh-Sb                    | 1.800               | 50          | 100                 | Cu-500                      | Normal         |
| Cl                  | K $\alpha$ | P-Cl                     | 600                 | 10          | 150                 | Ti                          | Alta resolução |
| Co                  | K $\alpha$ | Cr-Co                    | 600                 | 20          | 200                 | Al-200                      | Normal         |
| Fe                  | K $\alpha$ | Cr-Co                    | 600                 | 20          | 200                 | Al-200                      | Normal         |
| Hg                  | L $\alpha$ | Ni-Mo                    | 1.500               | 50          | 100                 | Ag                          | Normal         |
| K                   | K $\alpha$ | K-V                      | 900                 | 12          | 300                 | Al-50                       | Normal         |
| Mg                  | K $\alpha$ | Na-Si                    | 600                 | 10          | 150                 | NA                          | Alta resolução |
| Na                  | K $\alpha$ | Na-Si                    | 600                 | 10          | 150                 | NA                          | Alta Resolução |
| Ni                  | K $\alpha$ | Ni-Mo                    | 1.500               | 50          | 100                 | Ag                          | Normal         |
| Pb                  | L $\alpha$ | Ni-Mo                    | 1.500               | 50          | 100                 | Ag                          | Normal         |
| Si                  | K $\alpha$ | Na-Si                    | 600                 | 10          | 150                 | NA                          | Alta Resolução |
| Ti                  | K $\alpha$ | K-V                      | 900                 | 12          | 300                 | Al-50                       | Normal         |
| V                   | K $\alpha$ | K-V                      | 900                 | 12          | 300                 | Al-50                       | Normal         |

As: Arsênio; Ca: Cálcio; Cd: Cádmio; Cl: Cloro; Co: Cobalto; Fe: Ferro; Hg: Mercúrio; K: Potássio; Mg: Magnésio; Na: Sódio; Ni: Níquel; Pb: Chumbo; Si: Silício; Ti: Titânio; V: Vanádio.  
K $\alpha$ : K alfa; L $\alpha$ : L alfa.

S: segundos; kV: Kilovolts;  $\mu$ A: micro amperes;  $\mu$ m micrômetro

Fonte: Elaboração própria

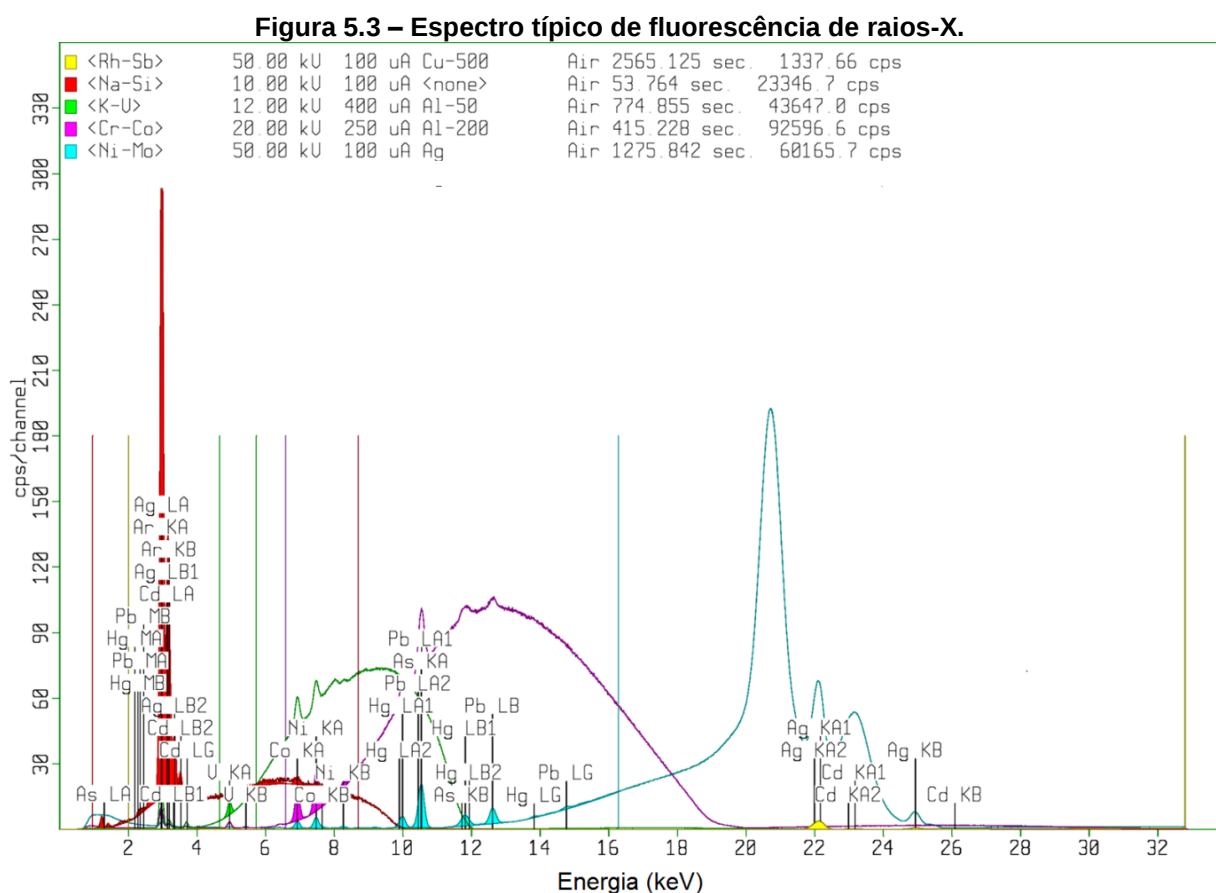
Os resultados qualitativos e quantitativos foram obtidos via software fornecido pela Malvern Panalytical (MALVERN PANALYTICAL, 2019).

#### 5.1.2.5. Obtenção dos dados

As concentrações dos diferentes elementos químicos presentes numa amostra podem ser obtidas após a excitação da amostra por meio de uma fonte de raios-X e a posterior medida dos de raios-X característicos gerados neste processo. Para cada conjunto de raios-X característicos, identificado pela sua energia, podemos associar um elemento químico.

Os dados experimentais contendo informação sobre a energia dos raios-X característicos provenientes da amostra, em função da quantidade de fótons, são adquiridos pelo software e apresentados na forma de espectros, conforme exemplo mostrado na Figura 5.3, onde no eixo das abscissas temos a energia dos raios-X característicos e no eixo das ordenadas a quantidade de eventos em contagens por

segundo (cps). Após a calibração do sistema o eixo das ordenadas pode ser transformado em concentração ( $\mu\text{g/g}$ ). Observe que várias curvas se sobrepõem no espectro da Figura 5.3, indicando que foram usadas diferentes condições de excitação da amostra (energia de excitação, tempo, filtros, etc., conforme mostra a Tabela 5.1), a fim de se maximizar a produção de raios-X característicos para todos os elementos presentes na amostra. As concentrações dos diferentes elementos presentes na amostra são obtidas calculando-se a área abaixo dos picos mostrados na Figura 5.3.



Fonte: Elaboração Própria através do software do equipamento Epsilon 1.

#### 5.1.2.6. Validação

A validação deve demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, de forma documentada e mediante critérios objetivos. Os parâmetros considerados no método desenvolvido, obedeceu as determinações da RDC nº166/2017 (BRASIL, 2017) e estão dispostos na tabela 5.2.

**Tabela 5.2 – Parâmetros de validação considerados do método desenvolvido.**

| Parâmetro Avaliado      | Teste de Impurezas |               |
|-------------------------|--------------------|---------------|
|                         | Quantitativo       | Ensaio Limite |
| Exatidão                | sim                | não           |
| Precisão Repetibilidade | sim                | não           |
| Precisão Intermediária  | sim <sup>(1)</sup> | não           |
| Seletividade            | sim                | sim           |
| Limite de Detecção      | sim                | sim           |
| Limite de Quantificação | sim                | não           |
| Linearidade             | sim                | não           |
| Intervalo               | sim                | não           |

<sup>(1)</sup> Nos casos em que foi conduzida a reprodutibilidade, não é necessário conduzir a precisão intermediária.

Fonte: Adaptado de RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. Diário Oficial Da República Federativa Do Brasil.

#### **5.1.2.6.1. Seletividade**

Para a análise do parâmetro Seletividade, fez-se uma comparação da recuperação dos elementos contaminantes usados neste estudo da classe 1 (Cd, As, Pb, Hg) e 2A (Co, V, Ni), para duas situações distintas: i) usou-se uma matriz contendo apenas celulose microcristalina e os elementos contaminantes da classe 1 e 2A, em três concentrações diferentes (baixa, intermediária e alta). Esta matriz foi analisada via XRF e o valor médio obtido para as concentrações dos contaminantes e seu respectivo desvio padrão foram comparado com o valor nominal das impurezas colocado nas pastilhas, ii) um segundo grupo de pastilhas foi preparado, porém neste grupo além da celulose microcristalina e dos contaminantes pertencentes a classe 1 e 2A, acrescentou-se vários elementos leves, como forma de modificar a matriz original (criar uma perturbação), também em três concentrações distintas (baixa, intermediária e alta), sendo os elementos leves acrescentado e suas respectivas concentrações: Na (0.91; 0.45; 0.072)%, Mg (0.67; 0.33; 0.053)%, Si (0.53; 0.26; 0.041)%, Cl (2.6, 1.3; 0.21)%, K (1.4; 0.7; 0.11)%, Ca (0.82; 0.41; 0.064)%, Fe (0.8; 0.4; 0.063)% e Ti (0.6; 0.3; 0.053)%. Para os dois conjuntos de matrizes, ou seja, a matriz sem os elementos leves e a matriz com os elementos leves, mediu-se via XRF a recuperação dos contaminantes da classe 1 e 2A.

#### **5.1.2.6.2. Linearidade**

A linearidade de um método analítico refere-se à habilidade para obter resultados de teste que são diretamente ou por meio de transformações matemáticas, proporcionais às concentrações de analito presentes na amostra ao longo de toda faixa de interesse (CHANDRAN; SINGH, 2007).

Para cada conjunto de dados (concentração nominal e resposta) foi calculada a equação da reta ( $y = ax + b$ ) que melhor se ajustava aos pontos experimentais e obtido seu respectivo intercepto ( $b$ ), inclinação ( $a$ ) e coeficiente de correlação ( $R$ ), para as impurezas da classe 1 e 2 A. Considera-se que a correspondência é linear para o parâmetro linearidade, quando o coeficiente de correlação for acima de 0,990 (BRASIL, 2017).

#### **5.1.2.6.3. Precisão**

A precisão foi demonstrada pela dispersão dos resultados, calculando-se o Desvio Padrão Relativo (DPR) da série de medições, conforme mostra a equação (1) (BRASIL, 2017).

$$DPR = \frac{DP}{CMD} 100 \quad (1)$$

Onde:

$DP$ : é o desvio padrão;

$CMD$ : é a concentração média determinada.

As amostras foram avaliadas utilizando a resposta do padrão na concentração correspondente ao limite das especificações estabelecidos para cada elemento. A repetibilidade foi utilizada para determinação dos critérios de aceitação para os resultados de precisão. Considerou-se medições no mesmo dia, mesmo equipamento e com o mesmo analista. Neste sentido a precisão foi avaliada em termos de repetibilidade. O desvio padrão relativo (DPR) aceitável neste trabalho foi de 11% para

concentrações de 1 a 10 µg/g e de 7,3% para concentrações entre 11 a 100 µg/g (INMETRO, 2020).

#### **5.1.2.6.4. Exatidão**

A exatidão de um procedimento analítico é a proximidade dos resultados do teste obtidos com o valor verdadeiro. A exatidão pode ser determinada pela aplicação do método analítico para um analito de concentração conhecida. Deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro (BRASIL, 2017; USP42-NF37, 2019).

##### **5.1.2.6.4.1. Ensaio de recuperação**

Neste trabalho utilizou-se a adição do padrão da substância, adicionado à matriz (celulose microcristalina).

A medição da recuperação é calculada pela Equação (2) (BRASIL, 2017).

$$Rec = \frac{C_o}{C_t} 100 \quad (2)$$

Onde:

$R_{ec}$ : é a recuperação em (%);

$C_o$ : é a concentração obtida (média experimental);

$C_t$ : é a concentração teórica.

A recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada e os intervalos aceitáveis de recuperação estão entre 70% e 120%, com precisão de até  $\pm 20\%$  (RIBANI et al., 2004).

##### **5.1.2.6.5. Limite de detecção**

O limite de detecção (LD) é geralmente determinado pela análise de amostras com concentrações conhecidas de analito e estabelecendo o nível mínimo no qual o analito pode ser detectado com segurança e deve ser validado pela análise de um

número adequado de amostras conhecidas por estarem próximas ou preparadas no limite de detecção (USP42-NF37, 2019).

Na determinação baseada em parâmetros da curva analítica, o limite de detecção pode ser calculado como:

$$LD = \frac{3.3 \sigma}{IC} \quad (3)$$

Onde:

$IC$ : é a inclinação da curva de calibração;

$\sigma$ : é o desvio padrão, o qual pode ser obtido de três formas distintas:

- a) o desvio padrão do intercepto com o eixo das ordenadas de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação;
- b) o desvio padrão residual da linha de regressão;
- c) a partir da curva de calibração proveniente da análise de um apropriado número de amostras do branco.

Na análise quantitativa de fluorescência de raios-X o LD é determinado de maneira um pouco diferente. Geralmente é aceito que a intensidade mínima detectável de uma linha espectral deve exceder por um fator 3,3 o desvio padrão do fundo integrado sob a linha espectral (VOGEL-MIKUŠ et al., 2012). De acordo com essa definição a massa mínima detectável em gramas para um dado elemento é expresso como:

$$LD (g) = \frac{3,3(\frac{\sqrt{B}}{t})}{S} \quad (4)$$

Onde:

$S$ : é sensibilidade expressa como a taxa de contagem de sinal por grama de amostra;

$B$ : é o fundo integrado em contagens sob a linha espectral;

$t$ : é o tempo de medição.

É importante enfatizar que a sensibilidade e, portanto, o LD depende muito da absorção na matriz da amostra e a dependência explícita do LD com o tempo de

medição não é muito apropriada segundo Kump (1997) e Nečemer et al. (2011). Portanto, a relação acima pode ser escrita de outra forma um pouco diferente, conforme mostra a Equação 5.

$$LD (g) = 3,3 \left( \frac{I_B}{S} \right) \left( \frac{\sqrt{B}}{B} \right) \quad (5)$$

Onde:

$I_B$ : é intensidade das contagens de fundo (background).

A partir da Equação 5 é evidente que o LD depende do desvio padrão relativo do fundo, representado na Equação 5 pelo termo  $(B^{1/2}/B)$  sob a linha espectral e não apenas do tempo de medição. Mas como a sensibilidade  $S$  também é definida como a taxa de contagem de sinal da linha espectral correspondente à massa da amostra  $m_0(I_0/m_0)$ , o LD a 33,3% de desvio padrão relativo do fundo pode ser expresso como:

$$LD (g) = \left( \frac{I_B}{I_0} \right) m_0 \quad (6)$$

Onde:

$I_B$ : é intensidade das contagens de fundo (background),

$I_0$ : é número de contagens da linha espectral de interesse (contagens no pico),

$m_0$ : é massa inicial em gramas colocada para análise.

Isso mostra que o LD depende apenas da razão entre as taxas de contagem de fundo ( $I_B$ ) e do sinal do elemento de interesse ( $I_0$ ) (KUMP; NEČEMER; VEBER, 1998; NEČEMER; KUMP; VOGEL-MIKUŠ, 2011).

Neste trabalho o limite de detecção foi calculado usando-se a Equação 6, de forma automática pelo software do equipamento Epsilon 1, assim como o limite de quantificação, conforme mostramos a seguir.

#### **5.1.2.6.6. Limite de quantificação**

Para procedimentos não instrumentais, o limite de quantificação (LQ) é geralmente determinado pela análise de amostras com concentrações conhecidas de

analito e estabelecendo o nível mínimo no qual o analito pode ser determinado com exatidão e precisão aceitáveis e deve ser validado pela análise de um número adequado de amostras conhecidas por estarem próximas ou preparadas no limite de quantificação.

O LQ pode ser obtido partir do cálculo do limite de detecção (seção 5.1.2.5.5.), onde se multiplicaria o desvio padrão do intercepto por 10, conforme mostra a Equação (7).

$$LQ = \frac{10 \sigma}{IC} \quad (7)$$

Onde:

IC: é a inclinação da curva de calibração,

$\sigma$ : é o desvio padrão e pode ser obtido de três formas:

- a) o desvio padrão do intercepto com o eixo das ordenadas de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação;
- b) o desvio padrão residual da linha de regressão;
- c) a partir da curva de calibração proveniente da análise de um apropriado número de amostras do branco.

Neste trabalho os limites de quantificação foram calculados pelo software que controla o equipamento Epsilon 1, simplesmente multiplicando o limite de detecção (LD) por um fator 3,03, conforme mostra a Equação 8.

$$LQ (g) = \frac{10}{3.3} LD \quad (8)$$

Os parâmetros para determinação do Limite de Quantificação foram considerados pela a Ingestão Diária Máxima (IDM), calculada pela Exposição Diária Permitida (EDP), de acordo com Tabela 5.3 a seguir:

**Tabela 5.3 – Exposição Diária Permitida (EDP) e Limite de Quantificação pela Ingestão Diária Máxima (IDM) de medicamentos por via oral para elementos da classe 1 e 2A.**

| Classe | Elemento | EDP em µg/d<br>para<br>medicamentos<br>por via oral | Limites de<br>concentração em<br>µg/g<br>Classe: 1<br>(IDM: 10 g/d) | Limites de<br>concentração em<br>µg/g<br>Classe: 2A<br>(IDM: 2,5 g/d) | Limites de<br>Quantificação<br>(µg/g) |
|--------|----------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| 1      | Cd       | 5                                                   | 0,5                                                                 | 2                                                                     | 2                                     |
|        | Pb       | 5                                                   | 0,5                                                                 | 2                                                                     |                                       |
|        | As       | 15                                                  | 1,5                                                                 | 6                                                                     |                                       |
|        | Hg       | 30                                                  | 3                                                                   | 12                                                                    |                                       |
| 2A     | Co       | 50                                                  | 5                                                                   | 20                                                                    | 10                                    |
|        | V        | 100                                                 | 10                                                                  | 40                                                                    |                                       |
|        | Ni       | 200                                                 | 20                                                                  | 80                                                                    |                                       |

**EDP: Exposição Diária Permitida**

**IDM: Ingestão Diária de medicamentos**

**Cd: Cádmio; Pb: Chumbo; Hg: Mercúrio; As: Arsênio; Co: Cobalto; V: Vanádio; Ni: Níquel;**

Fonte: Adaptado de (SAUER et al., 2020)

#### 5.1.2.6.7. Robustez

A robustez é um parâmetro realizado no desenvolvimento do método analítico que indica a sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas. (BRASIL, 2017)

#### 5.1.2.6.8. Intervalo/Faixa de Trabalho

Faixa de trabalho de um procedimento analítico é o intervalo entre a menor concentração e a maior concentração de analito na amostra para o qual se demonstrou que o procedimento analítico tem um nível aceitável de precisão, exatidão e linearidade (INMETRO, 2020).

A faixa de trabalho deve ser estabelecida a partir dos estudos de linearidade, juntamente com os resultados de precisão e exatidão, sendo dependente da aplicação pretendida. Para determinação de impurezas: do limite de quantificação até 120% (cento e vinte por cento) da concentração no limite da especificação de cada impureza individual (BRASIL, 2017).

Neste trabalho, a faixa linear de trabalho estabelecida a partir dos estudos de linearidade, juntamente com os resultados de precisão e exatidão para os valores analisados foi de 2 µg/g até 35 µg/g.

#### **5.1.2.7. Amostras reais (comprimidos)**

Como forma de testar a metodologia com amostras reais, foram realizados, na forma de estudo de caso, testes de recuperação dos elementos químicos em comprimidos reais, justificando possíveis riscos de contaminações dos equipamentos utilizados, oriundos do processo de produção de medicamentos na forma farmacêutica sólida (comprimidos). Os comprimidos usados foram fabricados no Brasil e comercializados na região de Sorocaba e tinham em sua formulação excipientes farmacêuticos de baixo número atômico, uma vez que a matriz usada em nossos testes foi a base de celulose microcristalina. Quando analisou-se a formulação destes comprimidos, percebeu-se a presença de uma série de elementos leves, como por exemplo: Na, Mg, Si, Cl, K, Ca, Fe, Ti, dentre outros, os quais podem interferir na quantificação dos raios-X característicos, devido ao efeito de interferência entre os raios-X característicos produzidos pelos elementos presentes na matriz (efeito matriz). Como já previa-se problemas na quantificação dos raios-X característicos (interferências), decidiu-se fazer novas calibrações do sistema, usando a matriz de celulose contaminada com as substâncias da classe 1, junto com os elementos leves Na, Mg, Si, Cl, K, Ca, Fe e Ti, conforme discutido no item 5.1.2.2.2. Decidiu-se não testar a recuperação para os contaminantes da classe 2A, uma vez que outros problemas poderiam surgir, como por exemplo, raios-X característicos proveniente da linha  $K\beta$  ( $E=4,93$  keV) do elemento Titânio possuem a mesma energia dos raios-X característicos provenientes da linha  $K\alpha$  ( $E=4,95$  keV) do elemento Vanádio. Esse efeito causa um aumento aparente na concentração do Vanádio, pois ocorre uma superposição de picos no espectro de energia, sendo assim, decidimos não usar neste teste de recuperação os elementos da classe 2A.

Os comprimidos utilizados foram os que continham os princípios ativos: Metformina, Sinvastatina e Glibenclamida. A escolha dos comprimidos se deu pela alta produção e consumo destes fármacos no Brasil, sendo que os três pertencem ao programa Farmácia Popular, que atinge uma grande parte da população Brasileira.

Os comprimidos foram triturados, tamisados, homogeneizados em quantidade suficiente para confecção de uma pastilha de 4g e os contaminantes pertencentes a classe 1 (Cd, Pb, Hg, As) foram adicionados na concentração de 35  $\mu\text{g/g}$ . Esta concentração foi escolhida aleatoriamente de acordo com a faixa linear de trabalho.

## **CAPÍTULO 6**

### **6.1. Resultados e Discussão**

A seção 1.1 traz na Tabela 1.1 os elementos que foram considerados em avaliação de risco toxicológico e na Tabela 1.2, os elementos que foram considerados em avaliação de risco e limite permitido de exposição diária (LPED) para impurezas elementares considerando as classes 1 e 2A como sendo as classes de estudo desta validação. Os valores apresentados representam concentrações em  $\mu\text{g/g}$  de impurezas elementares em medicamentos. Estes limites de concentração são destinados para avaliar o teor de impureza elementar em medicamentos com doses diárias de não mais do que 10 g por dia, onde os valores calculados estão expressos na Tabela 1.2.

#### **6.1.1. Resultados dos parâmetros da validação do método**

Os resultados a seguir mostram os valores encontrados para todos os parâmetros da validação do método, considerando as recomendações de compêndios oficiais como as Farmacopeias Brasileira (BRASIL, 2019) e Americana (USP42-NF37, 2019), assim como o *DOQ-CGCRE-008* que trata da orientação sobre validação de métodos analíticos (INMETRO, 2020), o *Guideline for Elemental Impurities Q3D* (ICH, 2019) e as condições do equipamento utilizado.

#### **6.1.2. Seletividade**

A Tabela 6.1 demonstra a comparação da recuperação dos elementos contaminantes da classe 1 (Cd, As, Pb, Hg) e 2A (Co, V, Ni), para duas situações com matrizes distintas, descritas na seção 5.1.2.6.1.

**Tabela 6.1 – Resultados das análises da Matriz I: celulose microcristalina e os elementos contaminantes pertencentes a classe 1 e 2A e resultados da Matriz II: celulose microcristalina, contaminantes pertencentes a classe 1 e 2A e elementos leves (Na, Mg, Si, Cl, K, Ca, Fe e Ti) em concentrações altas, intermediárias e baixas.**

| Matriz I: celulose microcristalina e elementos contaminantes da classe 1 e 2A                                                    |                      |                    |      |      |             |                      |                    |      |      |             |                      |                    |      |      |             |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|--------------------|------|------|-------------|----------------------|--------------------|------|------|-------------|----------------------|--------------------|------|------|-------------|
| ELEMENTOS                                                                                                                        | 35 µg/g              |                    |      |      |             | 17,5 µg/g            |                    |      |      |             | 2 µg/g               |                    |      |      |             |
|                                                                                                                                  | CONCENTRAÇÃO NOMINAL | MÉDIA CONC. MEDIDA | DP   | DPR  | RECUPERAÇÃO | CONCENTRAÇÃO NOMINAL | MÉDIA CONC. MEDIDA | DP   | DPR  | RECUPERAÇÃO | CONCENTRAÇÃO NOMINAL | MÉDIA CONC. MEDIDA | DP   | DPR  | RECUPERAÇÃO |
| <b>Cd</b>                                                                                                                        | 32,58                | 32,63              | 0,25 | 0,77 | 100,15      | 16,29                | 15,90              | 0,35 | 2,22 | 97,59       | 2,04                 | 2,03               | 0,01 | 0,28 | 99,67       |
| <b>Pb</b>                                                                                                                        | 34,77                | 34,81              | 0,65 | 1,87 | 100,12      | 17,39                | 17,36              | 0,11 | 0,62 | 99,85       | 2,17                 | 2,21               | 0,02 | 0,69 | 102,00      |
| <b>Hg</b>                                                                                                                        | 34,97                | 31,69              | 0,24 | 0,75 | 90,63       | 17,49                | 13,87              | 0,37 | 2,67 | 79,32       | 2,19                 | 1,74               | 0,13 | 7,60 | 79,45       |
| <b>As</b>                                                                                                                        | 32,79                | 30,55              | 0,67 | 2,18 | 93,17       | 16,4                 | 14,53              | 0,47 | 3,20 | 88,58       | 2,05                 | 1,92               | 0,03 | 1,56 | 93,66       |
| <b>Co</b>                                                                                                                        | 27,67                | 27,24              | 0,28 | 1,04 | 98,45       | 13,84                | 13,95              | 0,06 | 0,39 | 100,82      | 1,73                 | 1,59               | 0,03 | 2,02 | 92,10       |
| <b>V</b>                                                                                                                         | 22,42                | 22,66              | 0,36 | 1,59 | 101,09      | 11,21                | 11,29              | 0,18 | 1,62 | 100,68      | 1,4                  | 1,36               | 0,09 | 6,74 | 97,14       |
| <b>Ni</b>                                                                                                                        | 29,43                | 29,40              | 0,91 | 3,09 | 99,90       | 14,72                | 14,53              | 0,66 | 4,56 | 98,71       | 1,84                 | 2,00               | 0,10 | 4,92 | 108,70      |
| Matriz II: celulose microcristalina, elementos contaminantes da classe 1 e 2A e elementos leves (Na, Mg, Si, Cl, K, Ca, Fe e Ti) |                      |                    |      |      |             |                      |                    |      |      |             |                      |                    |      |      |             |
| ELEMENTOS                                                                                                                        | 35 µg/g              |                    |      |      |             | 15 µg/g              |                    |      |      |             | 2 µg/g               |                    |      |      |             |
|                                                                                                                                  | CONCENTRAÇÃO NOMINAL | MÉDIA CONC. MEDIDA | DP   | DPR  | RECUPERAÇÃO | CONCENTRAÇÃO NOMINAL | MÉDIA CONC. MEDIDA | DP   | DPR  | RECUPERAÇÃO | CONCENTRAÇÃO NOMINAL | MÉDIA CONC. MEDIDA | DP   | DPR  | RECUPERAÇÃO |
| <b>Cd</b>                                                                                                                        | 31,95                | 30,61              | 0,65 | 2,12 | 95,80       | 14,56                | 15,06              | 0,63 | 4,15 | 103,46      | 2,43                 | 2,63               | 0,09 | 3,45 | 108,37      |
| <b>Pb</b>                                                                                                                        | 34,66                | 34,11              | 0,54 | 1,58 | 98,42       | 15,8                 | 17,07              | 0,24 | 1,42 | 108,06      | 2,64                 | 2,15               | 0,07 | 3,42 | 81,57       |
| <b>Hg</b>                                                                                                                        | 34,44                | 30,46              | 0,16 | 0,54 | 88,44       | 15,7                 | 18,09              | 0,15 | 0,81 | 115,22      | 2,62                 | 2,36               | 0,02 | 0,65 | 90,20       |
| <b>As</b>                                                                                                                        | 29,72                | 25,98              | 0,40 | 1,54 | 87,42       | 13,55                | 15,54              | 0,18 | 1,17 | 114,71      | 2,26                 | 2,51               | 0,08 | 3,19 | 111,21      |
| <b>Co</b>                                                                                                                        | 26,79                | 25,48              | 0,25 | 0,96 | 95,12       | 12,21                | 14,53              | 0,07 | 0,51 | 119,03      | 2,04                 | 1,77               | 0,02 | 1,13 | 86,76       |
| <b>V</b>                                                                                                                         | 21,03                | 16,91              | 0,06 | 0,38 | 80,39       | 9,59                 | 9,88               | 0,22 | 2,19 | 102,99      | 1,6                  | 1,82               | 0,08 | 4,36 | 113,75      |
| <b>Ni</b>                                                                                                                        | 30,66                | 28,83              | 0,34 | 1,17 | 94,02       | 13,98                | 15,57              | 0,37 | 2,38 | 111,37      | 2,33                 | 2,05               | 0,03 | 1,29 | 87,98       |

**Cd: Cádmio; Pb: Chumbo; Hg: Mercúrio; As: Arsênio; Co: Cobalto; V: Vanádio; Ni: Níquel; Na: Sódio; Mg: Magnésio; Si: Silício; Cl: Cloro; K: Potássio; Ca: Cálcio; Fe: Ferro; Ti: Titânio**

**DP: Desvio padrão**

**DPR: Desvio padrão relativo**

Fonte: Elaboração própria

Os resultados mostram que o método de XRF é seletivo, uma vez que a taxa de recuperação para ambas as matrizes ficou dentro do intervalo aceitável (70% até 120%, com desvio de  $\pm 20\%$ ) e avaliando também o parâmetro precisão, através do cálculo do Desvio Padrão Relativo (DPR), verificamos que para todos os elementos contaminantes deste estudo, de ambas as matrizes (com e sem elementos leves) o maior valor encontrado para o DPR foi de 7.6%, dentro da faixa estabelecida para precisão pelos órgãos reguladores (INMETRO, 2020), sendo a regra utilizada pelo

IMETRO para a precisão a seguinte: concentrações entre 1 µg/g e 10 µg/g, o DPR<11% e para concentrações entre 11 µg/g e 100 µg/g, o DPR <7.3%.

### 6.1.3. Linearidade

A faixa de interesse do método utilizado neste estudo envolveu a medida nas seguintes concentrações aproximadas dos diferentes elementos químicos 70 µg/g, 35 µg/g, 17,5 µg/g, 8 µg/g, 4 µg/g, 2 µg/g e 1 µg/g, respeitando o intervalo entre as medidas dos elementos Cd, Pb, Hg, Co, V, As e Ni. Nas Figuras 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6 e 6.7, o eixo das abscissas é a concentração obtida por adição do elemento químico em questão (concentração nominal) e o eixo das ordenadas corresponde as respostas (concentrações medidas obtidas via fluorescência de raios-X).

Conforme descrito na seção 5.1.2.2 os dados para atender os critérios dos parâmetros de linearidade foram os mesmos obtidos da calibração do sistema, já que apresentam resultados que compreendem os critérios e podem ser utilizados no caso deste estudo.

**Tabela 6.2 – Resultados dos coeficientes de correlação (R), Intercepto (b) e Inclinação (a) dos gráficos de linearidade.**

| Parâmetro                 | Cádmio<br>(Cd) | Chumbo<br>(Pb) | Arsênio<br>(As) | Mercúrio<br>(Hg) | Cobalto<br>(Co) | Vanádio<br>(V) | Níquel<br>(Ni) |
|---------------------------|----------------|----------------|-----------------|------------------|-----------------|----------------|----------------|
| <b>R</b>                  | 0,9998         | 0,9998         | 0,9926          | 0,9959           | 0,9997          | 0,9998         | 0,9996         |
| <b>Intercepto<br/>(b)</b> | -0,0863        | -0,1752        | -0,9888         | -1,6567          | 0,3626          | -0,0848        | 0,0738         |
| <b>Inclinação<br/>(a)</b> | 1,0029         | 1,0225         | 1,0450          | 1,0109           | 0,9610          | 1,0152         | 0,9956         |

Fonte: Elaboração própria

Os resultados dos coeficientes de correlação (R) demonstram que a relação entre a variável x (concentração nominal) e a variável y (resposta) e seus resultados estão acima de 0,99 conforme preconiza a RDC 166/2017 (BRASIL, 2017).

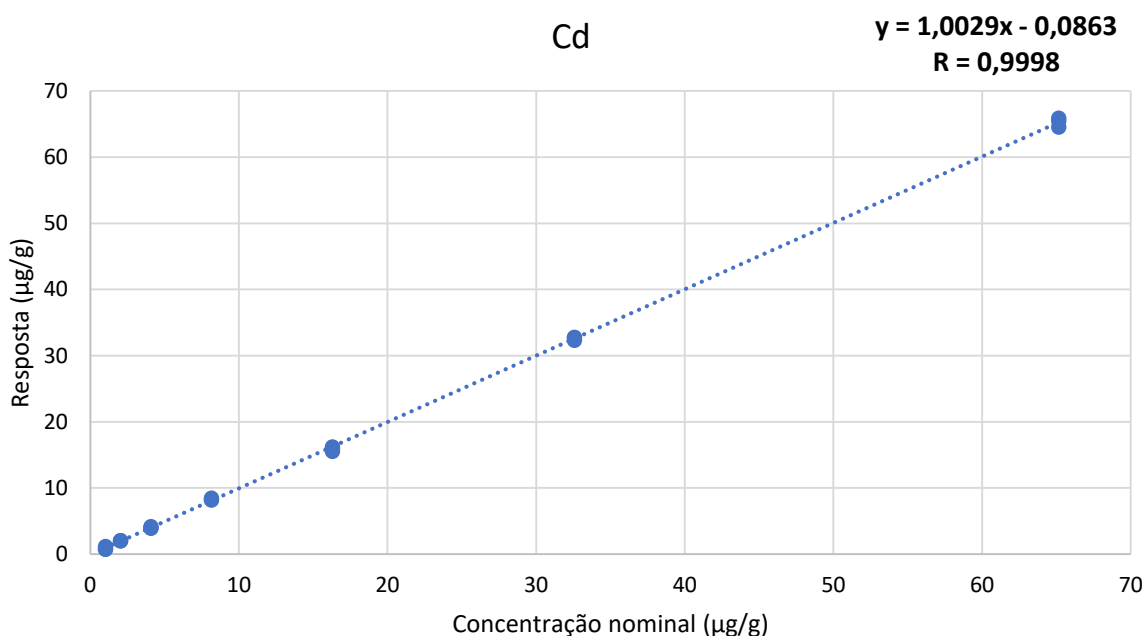
Portanto, quando se observa os resultados do intercepto (b), estes demonstram que os valores estão próximos de 0 (zero) indicando a intersecção entre os eixos das abscissas e o eixo das ordenadas se cruzam, além de ser indicativo de erro sistemático não estatisticamente diferente de zero na ausência de viés. E por fim, os

resultados da inclinação (a) são relacionados a sensibilidade do método, de modo que quanto maior o valor, maior a sensibilidade (resposta do método frente a mudanças de concentração), deve ser diferente de zero e estar próximo de 1 (um) (CUADRADO et al., 2001).

#### 6.1.3.1. Cádmio (Cd)

A Figura 6.1 mostra a relação entre as concentrações nominais, proporcionais às respostas (concentrações medidas), em triplicata, obtidas para o elemento Cádmio para determinação do parâmetro de linearidade do método. As medidas foram feitas para as concentrações de 70 µg/g, 35 µg/g, 17,5 µg/g, 8 µg/g, 4 µg/g, 2 µg/g e 1 µg/g, aproximadamente.

**Figura 6.1 – Relação das concentrações de 70 µg/g, 35 µg/g, 17,5 µg/g, 8 µg/g, 4 µg/g, 2 µg/g e 1 µg/g nominais e as respostas (concentrações medidas) para o elemento Cádmio.**



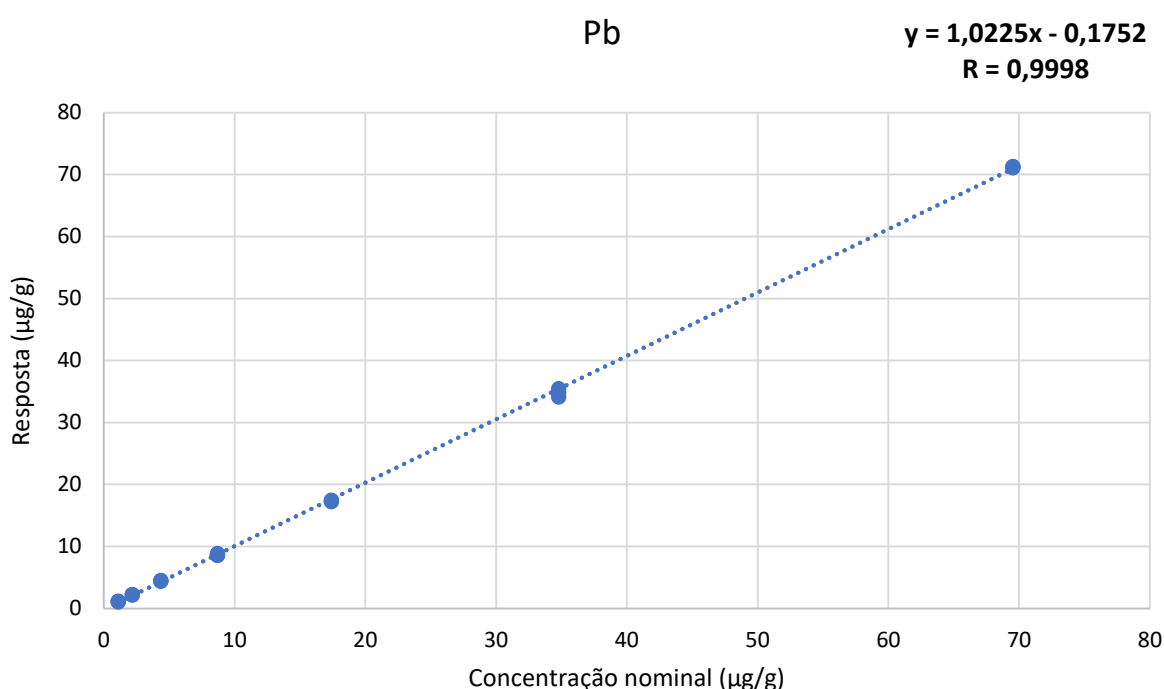
Fonte: Elaboração própria

O coeficiente de correlação do ensaio de linearidade para o elemento Cd utilizando a curva de calibração atende a aceitação do parâmetro de linearidade, pois apresenta coeficiente de correlação (R) de 0,9998, assim como intercepto (b) de -0,0863 e inclinação (a) de 1,0029, demonstrando a sensibilidade do método.

### 6.1.3.2. Chumbo (Pb)

A Figura 6.2 mostra a relação entre as concentrações nominais, proporcionais às respostas (concentrações medidas), em triplicata, obtidas para o elemento Chumbo para determinação do parâmetro de linearidade do método. As medidas foram feitas para as concentrações de 70 µg/g, 35 µg/g, 17,5 µg/g, 8 µg/g, 4 µg/g, 2 µg/g e 1 µg/g, aproximadamente.

**Figura 6.2 – Relação das concentrações de 70 µg/g, 35 µg/g, 17,5 µg/g, 8 µg/g, 4 µg/g, 2 µg/g e 1 µg/g nominais e as respostas (concentrações medidas) para o elemento Chumbo.**



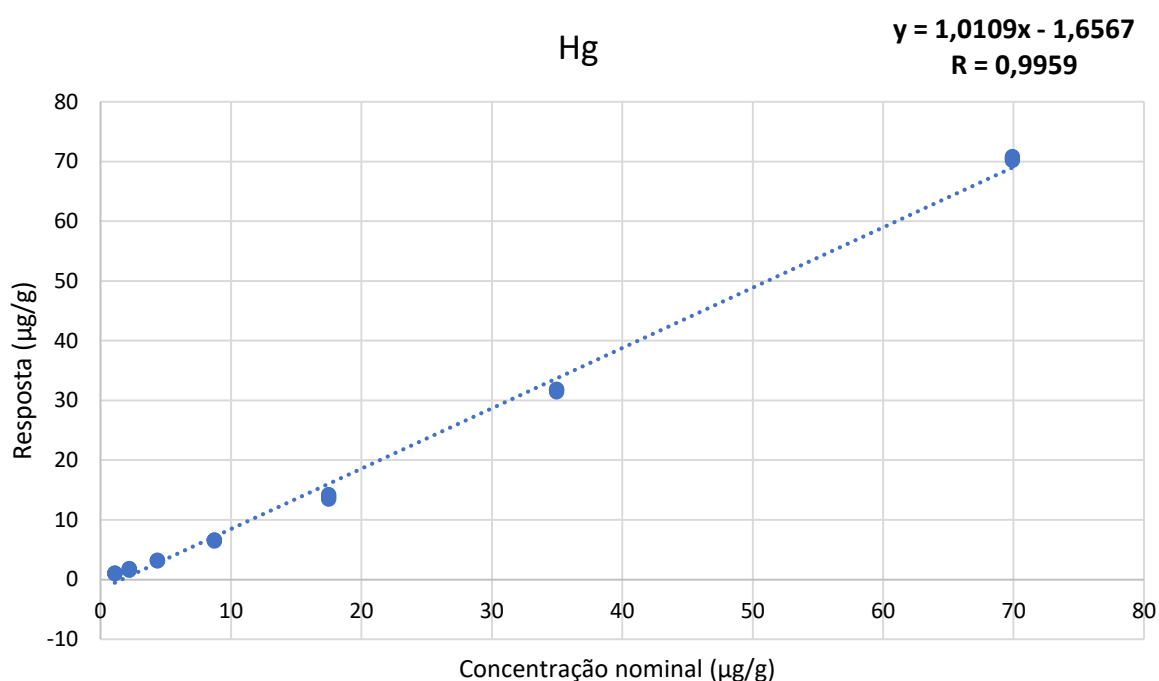
Fonte: Elaboração própria

O coeficiente de correlação do ensaio de linearidade para o elemento Pb utilizando a curva de calibração atende a aceitação do parâmetro de linearidade, pois apresenta coeficiente de correlação (R) de 0,9998, assim como intercepto (b) de -0,1752 e inclinação (a) de 1,0225, demonstrando a sensibilidade do método.

### 6.1.3.3. Mercúrio (Hg)

A Figura 6.3 mostra a relação entre as concentrações nominais, proporcionais às respostas (concentrações medidas), em triplicata, obtidas para o elemento Mercúrio para determinação do parâmetro de linearidade do método. As medidas foram feitas para as concentrações de 70 µg/g, 35 µg/g, 17,5 µg/g, 8 µg/g, 4 µg/g, 2 µg/g e 1 µg/g, aproximadamente.

**Figura 6.3 – Relação das concentrações de 70 µg/g, 35 µg/g, 17,5 µg/g, 8 µg/g, 4 µg/g, 2 µg/g e 1 µg/g nominais e as respostas (concentrações medidas) para o elemento Mercúrio.**



Fonte: Elaboração própria

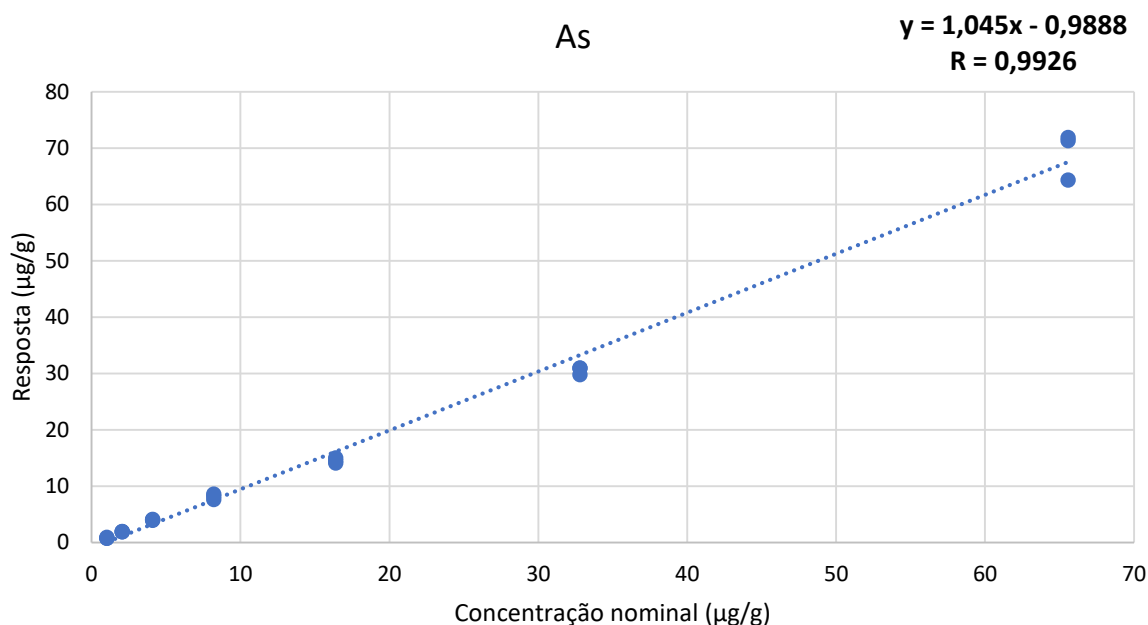
O coeficiente de correlação do ensaio de linearidade para o elemento Hg utilizando a curva de calibração atende a aceitação do parâmetro de linearidade, pois apresenta coeficiente de correlação (R) de 0,9959, assim como intercepto (b) de -1,6567 e inclinação (a) de 1,0109, demonstrando a sensibilidade do método.

### 6.1.3.4. Arsênio (As)

A Figura 6.4 mostra a relação entre as concentrações nominais, proporcionais às respostas (concentrações medidas), em triplicata, obtidas para o elemento Arsênio

para determinação do parâmetro de linearidade do método. As medidas foram feitas para as concentrações de 70 µg/g, 35 µg/g, 17,5 µg/g, 8 µg/g, 4 µg/g, 2 µg/g e 1 µg/g, aproximadamente.

**Figura 6.4 – Relação das concentrações de 70 µg/g, 35 µg/g, 17,5 µg/g, 8 µg/g, 4 µg/g, 2 µg/g e 1 µg/g nominais e as respostas (concentrações medidas) para o elemento Arsênio.**



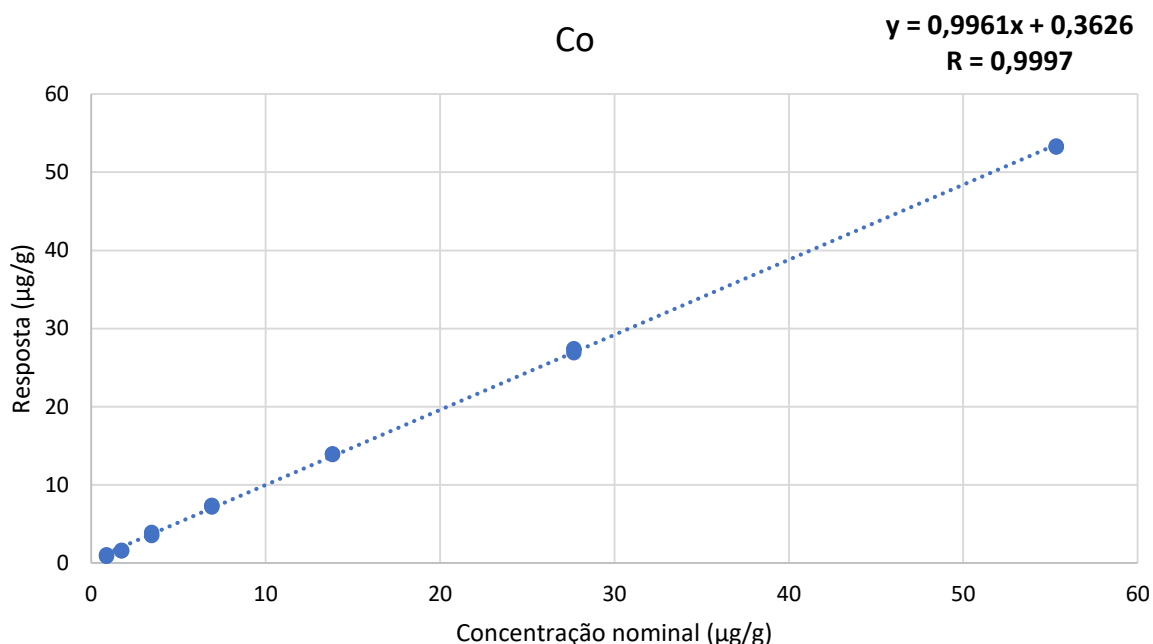
Fonte: Elaboração própria

O coeficiente de correlação do ensaio de linearidade para o elemento As utilizando a curva de calibração atende a aceitação do parâmetro de linearidade, pois apresenta coeficiente de correlação (R) de 0,9926, assim como intercepto (b) de -0,9888 e inclinação (a) de 1,045, demonstrando a sensibilidade do método.

#### **6.1.3.5. Cobalto (Co)**

A Figura 6.5 mostra a relação entre as concentrações nominais, proporcionais às respostas (concentrações medidas), em triplicata, obtidas para o elemento Cobalto para determinação do parâmetro de linearidade do método. As medidas foram feitas para as concentrações de 70 µg/g, 35 µg/g, 17,5 µg/g, 8 µg/g, 4 µg/g, 2 µg/g e 1 µg/g, aproximadamente.

**Figura 6.5 – Relação das concentrações de 70 µg/g, 35 µg/g, 17,5 µg/g, 8 µg/g, 4 µg/g, 2 µg/g e 1 µg/g nominais e as respostas (concentrações medidas) para o elemento Cobalto.**



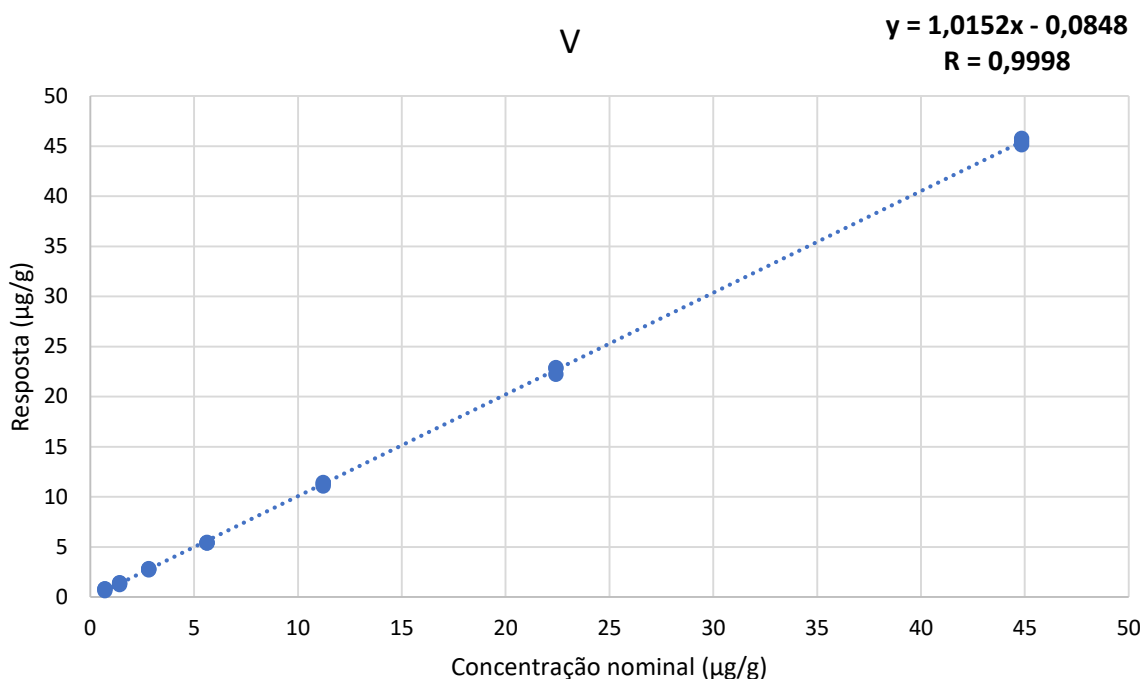
Fonte: Elaboração própria

O coeficiente de correlação do ensaio de linearidade para o elemento Co utilizando a curva de calibração atende a aceitação do parâmetro de linearidade, pois apresenta coeficiente de correlação (R) de 0,9997, assim como intercepto (b) de 0,3626 e inclinação (a) de 0,9610, demonstrando a sensibilidade do método.

#### **6.1.3.6. Vanádio (V)**

A Figura 6.6 mostra a relação entre as concentrações nominais, proporcionais às respostas (concentrações medidas), em triplicata, obtidas para o elemento Vanádio para determinação do parâmetro de linearidade do método. As medidas foram feitas para as concentrações de 70 µg/g, 35 µg/g, 17,5 µg/g, 8 µg/g, 4 µg/g, 2 µg/g e 1 µg/g, aproximadamente.

**Figura 6.6 – Relação das concentrações de 70 µg/g, 35 µg/g, 17,5 µg/g, 8 µg/g, 4 µg/g, 2 µg/g e 1 µg/g nominais e as respostas (concentrações medidas) para o elemento Vanádio.**



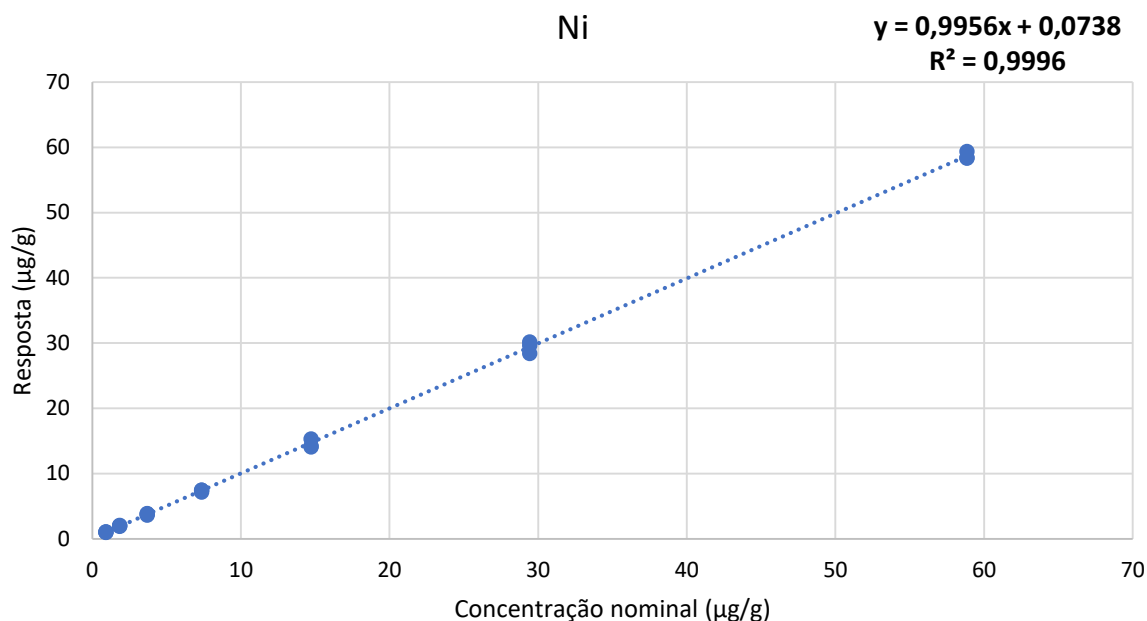
Fonte: Elaboração própria

O coeficiente de correlação do ensaio de linearidade para o elemento V utilizando a curva de calibração atende a aceitação do parâmetro de linearidade, pois apresenta coeficiente de correlação (R) de 0,9998, assim como intercepto (b) de 0,0848 e inclinação (a) de 1,0152, demonstrando a sensibilidade do método.

#### **6.1.3.7. Níquel (Ni)**

A Figura 6.7 mostra a relação entre as concentrações nominais, proporcionais às respostas (concentrações medidas), em triplicata, obtidas para o elemento Níquel para determinação do parâmetro de linearidade do método. As medidas foram feitas para as concentrações de 70 µg/g, 35 µg/g, 17,5 µg/g, 8 µg/g, 4 µg/g, 2 µg/g e 1 µg/g, aproximadamente.

**Figura 6.7 – Relação das concentrações de 70 µg/g, 35 µg/g, 17,5 µg/g, 8 µg/g, 4 µg/g, 2 µg/g e 1 µg/g nominais e as respostas (concentrações medidas) para o elemento Níquel.**



Fonte: Elaboração própria

O coeficiente de correlação do ensaio de linearidade para o elemento Ni utilizando a curva de calibração atende a aceitação do parâmetro de linearidade, pois apresenta coeficiente de correlação (R) de 0,9996, assim como intercepto (b) de 0,0738 e inclinação (a) de 0,09956, demonstrando a sensibilidade do método.

#### **6.1.4. Precisão**

Foram realizadas 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: alta (~35 µg/g), média (~15 µg/g) e baixa (~2 µg/g), com 3 (três) réplicas em cada nível.

A Tabela 6.3 representa os resultados para precisão demonstrada pelo desvio padrão relativo (DPR) da concentração alta (~35 µg/g).

**Tabela 6.3 – Precisão demonstrada pelo desvio padrão relativo (DPR) da concentração alta (~35µg/g).**

|           | CONCENTRAÇÃO<br>NOMINAL<br>(µg/g) | MEDIDA<br>1<br>(µg/g) | MEDIDA<br>2<br>(µg/g) | MEDIDA<br>3<br>(µg/g) | CMD<br>(µg/g) | DESVIO<br>PADRÃO | PRECISÃO<br>DPR<br>(%) |
|-----------|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------|------------------|------------------------|
| <b>Cd</b> | 31,95                             | 30,72                 | 31,19                 | 29,91                 | 30,61         | 0,65             | <b>2,12</b>            |
| <b>Pb</b> | 34,66                             | 33,56                 | 34,64                 | 34,14                 | 34,11         | 0,54             | <b>1,58</b>            |
| <b>Hg</b> | 34,44                             | 30,56                 | 30,55                 | 30,27                 | 30,46         | 0,17             | <b>0,56</b>            |
| <b>As</b> | 29,72                             | 26,05                 | 26,34                 | 25,55                 | 25,98         | 0,40             | <b>1,54</b>            |
| <b>Co</b> | 26,79                             | 25,72                 | 25,23                 | 25,50                 | 25,48         | 0,25             | <b>0,97</b>            |
| <b>V</b>  | 21,03                             | 16,86                 | 16,88                 | 16,98                 | 16,91         | 0,06             | <b>0,38</b>            |
| <b>Ni</b> | 30,66                             | 28,47                 | 28,87                 | 29,14                 | 28,83         | 0,34             | <b>1,18</b>            |

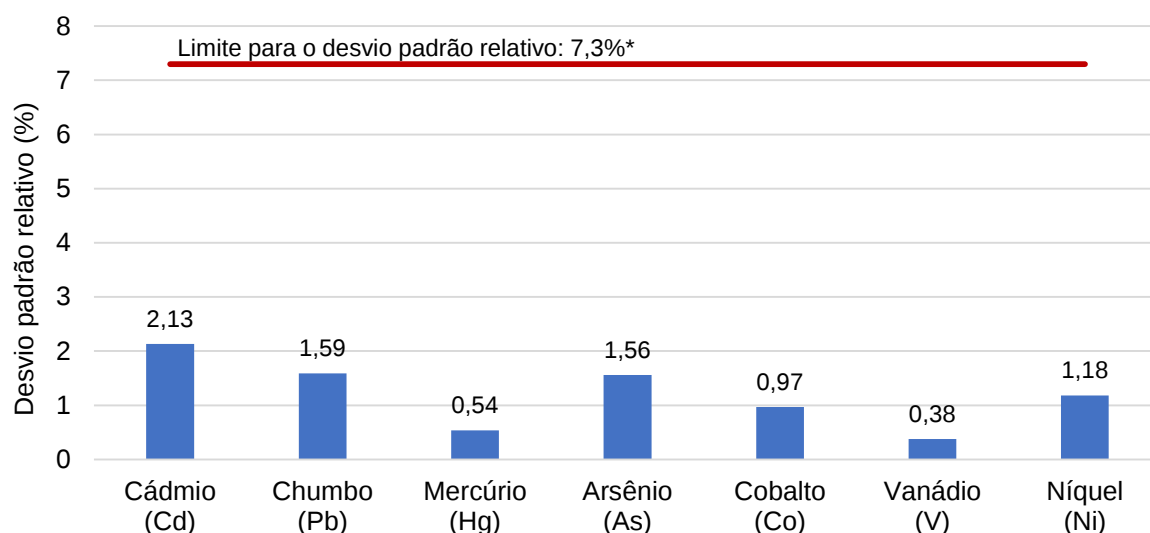
**CMD:** Concentração média determinada

**DPR:** Desvio padrão relativo

Fonte: Elaboração própria

Os resultados obtidos das análises de precisão demonstrada pelo desvio padrão relativo (DPR) dos elementos Cd, Pb, Hg, Co, V, As e Ni da concentração alta (~35 µg/g) atendem aos parâmetros de precisão de acordo com os critérios de repetibilidade, uma vez que foram realizados dentro de um curto período de tempo (todas medidas realizadas no mesmo dia) pelo mesmo analista, nas mesmas condições de operação e mesma instrumentação. Estão dentro da faixa de limite de <7,3% para o DPR (INMETRO, 2020), conforme mostra a Figura 6.8

**Figura 6.8 – Resultados de precisão obtidos pelo desvio padrão relativo (DPR), para os elementos Cádmio, Chumbo, Mercúrio, Arsênio, Cobalto, Vanádio e Níquel na concentração alta (~35µg/g).**



**\*Limite para o desvio padrão relativo de acordo com o DOQ-CGCRE-008 Guia de orientação sobre validação de métodos analíticos (INMETRO, 2020)**

Fonte: Elaboração própria

A Tabela 6.4 representa os resultados para precisão demonstrada via *DPR* da concentração média (~15 µg/g).

**Tabela 6.4 – Precisão demonstrada pelo desvio padrão relativo (DPR) da concentração intermediária (~15µg/g).**

|           | CONCENTRAÇÃO<br>NOMINAL<br>(µg/g) | MEDIDA<br>1<br>(µg/g) | MEDIDA<br>2<br>(µg/g) | MEDIDA<br>3<br>(µg/g) | CMD<br>(µg/g) | DESVIO<br>PADRÃO | PRECISÃO<br>DPR<br>(%) |
|-----------|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------|------------------|------------------------|
| <b>Cd</b> | 14,56                             | 15,10                 | 14,42                 | 15,67                 | 15,06         | 0,62             | <b>4,12</b>            |
| <b>Pb</b> | 15,8                              | 17,04                 | 16,85                 | 17,33                 | 17,07         | 0,24             | <b>1,40</b>            |
| <b>Hg</b> | 15,7                              | 17,92                 | 18,17                 | 18,18                 | 18,09         | 0,15             | <b>0,83</b>            |
| <b>As</b> | 13,55                             | 15,34                 | 15,60                 | 15,69                 | 15,54         | 0,18             | <b>1,18</b>            |
| <b>Co</b> | 12,21                             | 14,56                 | 14,45                 | 14,59                 | 14,53         | 0,07             | <b>0,48</b>            |
| <b>V</b>  | 9,59                              | 10,08                 | 9,90                  | 9,65                  | 9,88          | 0,22             | <b>2,23</b>            |
| <b>Ni</b> | 13,98                             | 15,16                 | 15,67                 | 15,88                 | 15,57         | 0,37             | <b>2,38</b>            |

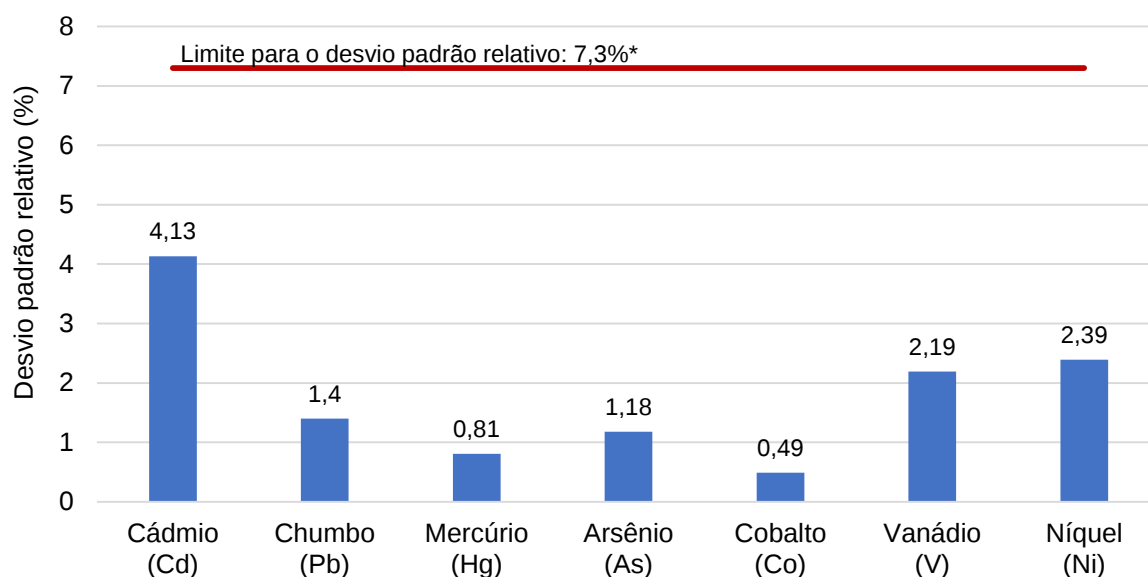
**CMD: Concentração média determinada**

**DPR: Desvio padrão relativo**

Fonte: Elaboração Própria

Os resultados obtidos das análises de precisão demonstrada pelo desvio padrão relativo (DPR) dos elementos Cd, Pb, Hg, Co, V, As e Ni da concentração intermediária (~15 µg/g) atendem aos parâmetros de precisão de acordo com os critérios de repetibilidade, uma vez que foram realizados dentro de um curto período de tempo (todas medidas realizadas no mesmo dia) pelo mesmo analista, nas mesmas condições de operação e mesma instrumentação. Estão dentro da faixa de limite de <7,3% para o DPR (INMETRO, 2020), conforme mostra a Figura 6.9.

**Figura 6.9 – Resultados de precisão obtidos pelo desvio padrão relativo (DPR), para os elementos Cádmio, Chumbo, Mercúrio, Arsênio, Cobalto, Vanádio e Níquel na concentração intermediária (~15µg/g).**



**\*Limite para o desvio padrão relativo de acordo com o DOQ-CGCRE-008 Guia de orientação sobre validação de métodos analíticos (INMETRO, 2020)**

Fonte: Elaboração própria

A Tabela 6.5 representa os resultados para precisão demonstrada via DPR da concentração baixa (~2 µg/g).

**Tabela 6.5 – Precisão demonstrada pelo desvio padrão relativo (DPR) da concentração baixa (2µg/g)**

|           | CONCENTRAÇÃO<br>NOMINAL<br>(µg/g) | MEDIDA<br>1<br>(µg/g) | MEDIDA<br>2<br>(µg/g) | MEDIDA<br>3<br>(µg/g) | CMD<br>(µg/g) | DESVIO<br>PADRÃO | PRECISÃO<br>DPR<br>(%) |
|-----------|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------|------------------|------------------------|
| <b>Cd</b> | 2,43                              | 2,70                  | 2,67                  | 2,53                  | 2,64          | 0,09             | <b>3,41</b>            |
| <b>Pb</b> | 2,64                              | 2,07                  | 2,18                  | 2,21                  | 2,15          | 0,07             | <b>3,26</b>            |
| <b>Hg</b> | 2,62                              | 2,36                  | 2,38                  | 2,35                  | 2,36          | 0,01             | <b>0,42</b>            |
| <b>As</b> | 2,26                              | 2,52                  | 2,59                  | 2,43                  | 2,51          | 0,08             | <b>3,19</b>            |
| <b>Co</b> | 2,04                              | 1,79                  | 1,75                  | 1,77                  | 1,77          | 0,02             | <b>1,13</b>            |
| <b>V</b>  | 1,60                              | 1,85                  | 1,88                  | 1,73                  | 1,82          | 0,08             | <b>4,40</b>            |
| <b>Ni</b> | 2,33                              | 2,04                  | 2,08                  | 2,03                  | 2,05          | 0,03             | <b>1,46</b>            |

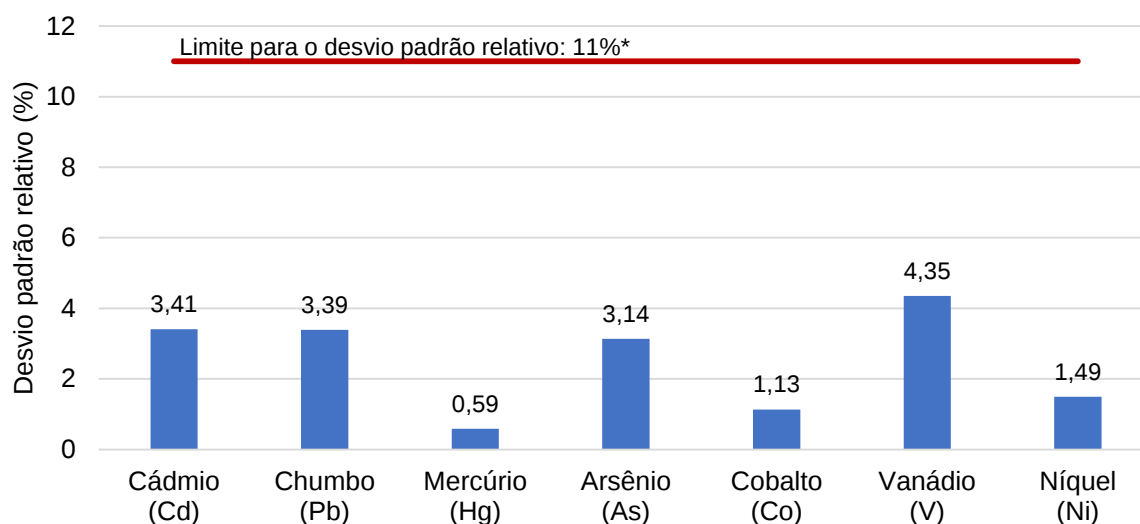
**CMD: Concentração média determinada**

**DPR: Desvio padrão relativo**

Fonte: Elaboração Própria

Os resultados obtidos das análises de precisão demonstrada pelo desvio padrão relativo (DPR) dos elementos Cd, Pb, Hg, Co, V, As e Ni da concentração baixa (~2 µg/g) atendem aos parâmetros de precisão de acordo com os critérios de repetibilidade, uma vez que foram realizados dentro de um curto período de tempo (todas medidas realizadas no mesmo dia) pelo mesmo analista, nas mesmas condições de operação e mesma instrumentação. Estão dentro da faixa de limite de <11% para o DPR (INMETRO, 2020), conforme mostra a Figura 6.10.

**Figura 6.10 – Resultados de precisão obtidos pelo desvio padrão relativo (DPR), para os elementos Cádmio, Chumbo, Mercúrio, Arsênio, Cobalto, Vanádio e Níquel na concentração baixa (~2 µg/g).**



**\*Limite para o desvio padrão relativo de acordo com o DOQ-CGCRE-008 Guia de orientação sobre validação de métodos analíticos (INMETRO, 2020)**

Fonte: Elaboração própria

#### 6.1.5. Exatidão

Foram utilizados materiais de referência certificados, realizados ensaios em triplicata, com 3 (três) concentrações diferentes consideradas baixa (~2 µg/g), intermediária (~15 µg/g) e alta (~35 µg/g), comparando os valores obtidos com o valor verdadeiro (valor conhecido estabelecido por nós).

O Desvio Padrão Relativo foi calculado para todos os elementos de acordo com a fórmula mostrada na Equação (1) (BRASIL, 2017).

A Tabela 6.6 mostra que os resultados obtidos para o parâmetro de exatidão atendem o critério aceitável do desvio padrão relativo, assim como a porcentagem de recuperação (70% a 120% com precisão de até ±20%) de cada elemento para a concentração alta ~35µg/g, atendendo os parâmetros de exatidão (RIBANI et al., 2004).

**Tabela 6.6 – Exatidão da concentração alta (~35µg/g) de cada elemento medida pelo desvio padrão relativo e pelo ensaio de recuperação.**

| Elemento  | CONCENTRAÇÃO<br>NOMINAL<br>(µg/g) | CMD<br>(µg/g) | DP   | DPR<br>(%) | EXATIDÃO<br>Recuperação<br>(%) |
|-----------|-----------------------------------|---------------|------|------------|--------------------------------|
| <b>Cd</b> | 31,95                             | 30,61         | 0,65 | 2,13       | <b>95,80</b>                   |
| <b>Pb</b> | 34,66                             | 34,11         | 0,54 | 1,58       | <b>98,42</b>                   |
| <b>Hg</b> | 34,44                             | 30,46         | 0,17 | 0,56       | <b>88,44</b>                   |
| <b>As</b> | 29,72                             | 25,98         | 0,40 | 1,54       | <b>87,42</b>                   |
| <b>Co</b> | 26,79                             | 25,48         | 0,25 | 0,98       | <b>95,12</b>                   |
| <b>V</b>  | 21,03                             | 16,91         | 0,06 | 0,35       | <b>80,39</b>                   |
| <b>Ni</b> | 30,66                             | 28,83         | 0,34 | 1,18       | <b>94,02</b>                   |

**CMD: Concentração média determinada**

**DP: Desvio padrão**

**DPR: Desvio padrão relativo**

Fonte: Elaboração Própria

A Tabela 6.7 mostra que os resultados obtidos para o parâmetro de exatidão atendem o critério aceitável do desvio padrão relativo, assim como a porcentagem de recuperação (70% a 120% com precisão de até  $\pm 20\%$ ) de cada elemento para a concentração intermediária ~15µg/g, atendendo os parâmetros de exatidão (RIBANI et al., 2004).

**Tabela 6.7 – Exatidão da concentração média (~15 µg/g) de cada elemento medida pelo desvio padrão relativo e pelo ensaio de recuperação.**

| Elemento  | CONCENTRAÇÃO<br>NOMINAL<br>(µg/g) | CMD<br>(µg/g) | DP   | DPR<br>(%) | EXATIDÃO<br>Recuperação<br>(%) |
|-----------|-----------------------------------|---------------|------|------------|--------------------------------|
| <b>Cd</b> | 14,56                             | 15,06         | 0,62 | 4,11       | <b>103,45</b>                  |
| <b>Pb</b> | 15,80                             | 17,07         | 0,24 | 1,41       | <b>108,04</b>                  |
| <b>Hg</b> | 15,70                             | 18,09         | 0,15 | 0,83       | <b>115,23</b>                  |
| <b>As</b> | 13,55                             | 15,54         | 0,18 | 1,18       | <b>114,69</b>                  |
| <b>Co</b> | 12,21                             | 14,53         | 0,07 | 0,49       | <b>119,03</b>                  |

**Tabela 6.7 – Exatidão da concentração média (~15 µg/g) de cada elemento medida pelo desvio padrão relativo e pelo ensaio de recuperação (continuação).**

|           |              |              |             |             |               |
|-----------|--------------|--------------|-------------|-------------|---------------|
| <b>V</b>  | <b>9,59</b>  | <b>9,88</b>  | <b>0,22</b> | <b>2,19</b> | <b>103,00</b> |
| <b>Ni</b> | <b>13,98</b> | <b>15,57</b> | <b>0,37</b> | <b>2,39</b> | <b>111,39</b> |

**CMD: Concentração média determinada**

**DP: Desvio padrão**

**DPR: Desvio padrão relativo**

Fonte: Elaboração Própria

A Tabela 6.8 mostra que os resultados obtidos para o parâmetro de exatidão atendem o critério aceitável do desvio padrão relativo, assim como a porcentagem de recuperação (70% a 120% com precisão de até  $\pm 20\%$ ) de cada elemento para a concentração baixa ~2µg/g, atendendo os parâmetros de exatidão (RIBANI et al., 2004).

**Tabela 6.8 – Exatidão da concentração baixa (~2µg/g) de cada elemento medida pelo desvio padrão relativo e pelo ensaio de recuperação.**

| <b>Elemento</b> | <b>CONCENTRAÇÃO<br/>NOMINAL<br/>(µg/g)</b> | <b>CMD<br/>(µg/g)</b> | <b>DP</b> | <b>DPR<br/>(%)</b> | <b>EXATIDÃO<br/>Recuperação<br/>(%)</b> |
|-----------------|--------------------------------------------|-----------------------|-----------|--------------------|-----------------------------------------|
| <b>Cd</b>       | 2,43                                       | 2,64                  | 0,09      | 3,41               | <b>108,46</b>                           |
| <b>Pb</b>       | 2,64                                       | 2,17                  | 0,04      | 1,84               | <b>82,30</b>                            |
| <b>Hg</b>       | 2,62                                       | 2,36                  | 0,01      | 0,42               | <b>90,24</b>                            |
| <b>As</b>       | 2,26                                       | 2,51                  | 0,08      | 3,14               | <b>111,17</b>                           |
| <b>Co</b>       | 2,04                                       | 1,77                  | 0,02      | 1,13               | <b>86,76</b>                            |
| <b>V</b>        | 1,60                                       | 1,82                  | 0,08      | 4,35               | <b>113,73</b>                           |
| <b>Ni</b>       | 2,33                                       | 2,05                  | 0,03      | 1,49               | <b>87,93</b>                            |

**CMD: Concentração média determinada**

**DP: Desvio padrão**

**DPR: Desvio padrão relativo**

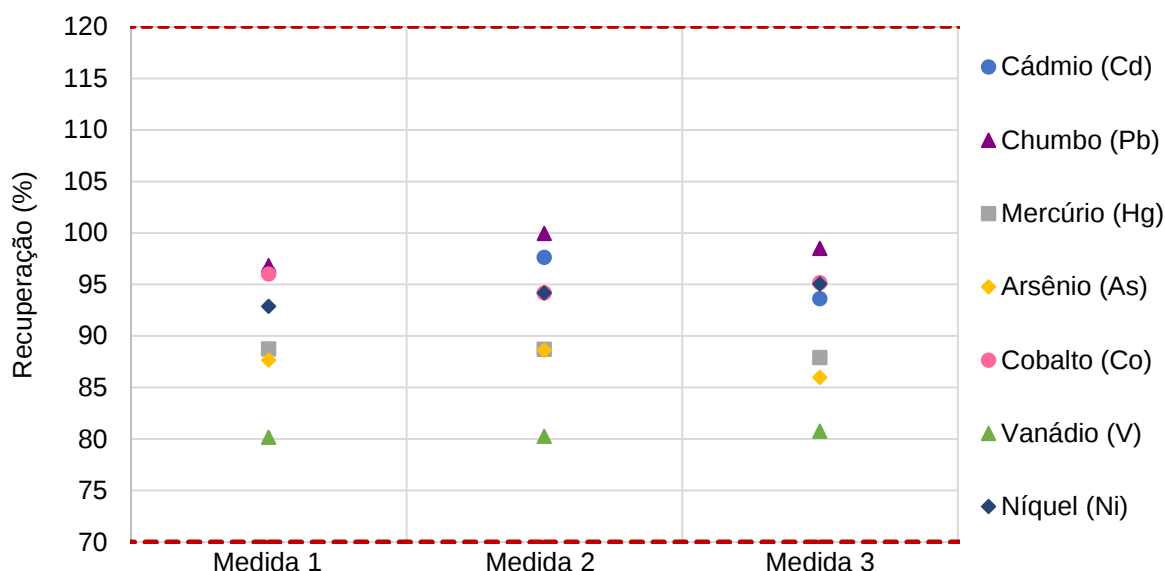
Fonte: Elaboração Própria

#### **6.1.5.1. Ensaio de recuperação**

Os resultados obtidos para o ensaio de recuperação dos elementos Cd, Pb, Hg, Co, V, As e Ni na concentração alta (~35 µg/g) resultantes da equação de recuperação

mostrada na seção 5.1.2.5.4.1 atendem aos parâmetros de recuperação, uma vez que se encontram dentro dos valores aceitáveis de recuperação definido entre 70% a 120%, como pode ser visto na Figura 6.11.

**Figura 6.11 – Representação dos valores obtidos a partir da equação de recuperação, medido em triplicata para concentração alta (~35 µg/g)**



#### Valores representados

**Cd:** medida 1: 96,15%, medida 2: 97,62% e medida 3: 93,62%

**Pb:** medida 1: 96,83%, medida 2: 99,94% e medida 3: 98,50%

**Hg:** medida 1: 88,73%, medida 2: 88,70% e medida 3: 87,89%

**As:** medida 1: 87,65%, medida 2: 88,63% e medida 3: 85,97%

**Co:** medida 1: 96,01%, medida 2: 94,18% e medida 3: 95,18%

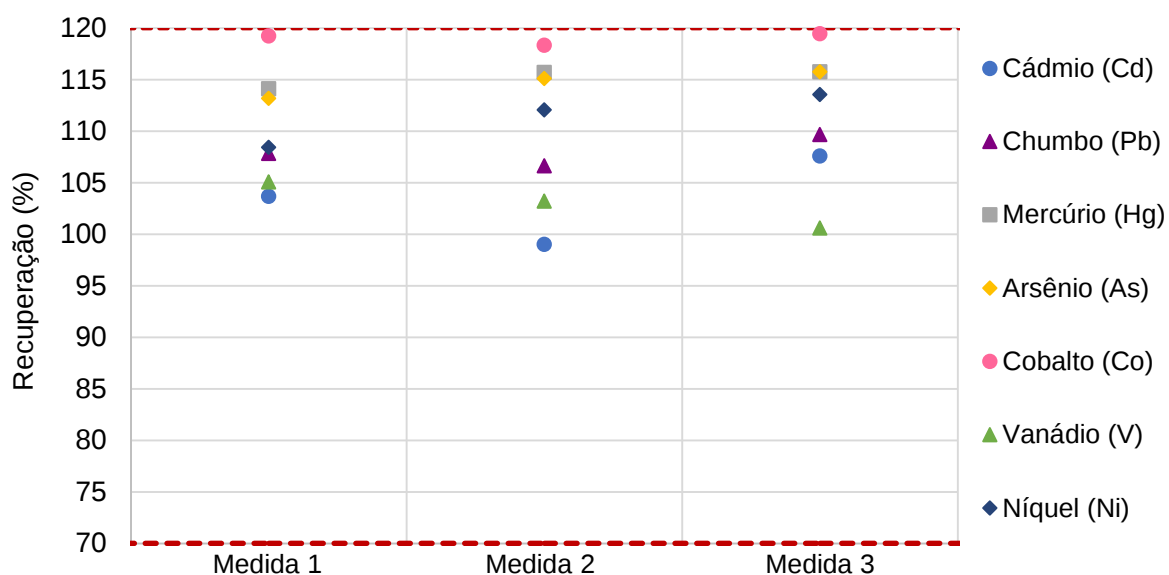
**V:** medida 1: 80,17%, medida 2: 80,27% e medida 3: 80,74%

**Ni:** medida 1: 92,86%, medida 2: 94,16% e medida 3: 95,04%

Fonte: Elaboração própria

Os resultados obtidos para o ensaio de recuperação dos elementos Cd, Pb, Hg, Co, V, As e Ni na concentração intermediária (~15 µg/g) resultantes da equação de recuperação mostrada na seção 5.1.2.5.4.1 atendem aos parâmetros de recuperação uma vez que se encontram dentro dos valores aceitáveis de recuperação definido entre 70% a 120%, como pode ser visto na Figura 6.12.

**Figura 6.12 – Representação dos valores obtidos a partir da equação de recuperação, medido em triplicata para concentração intermediária (~15 µg/g)**



#### Valores representados

**Cd:** medida 1: 103,71%, medida 2: 99,04% e medida 3: 107,62%

**Pb:** medida 1: 107,85%, medida 2: 106,55% e medida 3: 109,68%

**Hg:** medida 1: 114,14%, medida 2: 115,73% e medida 3: 115,80%

**As:** medida 1: 113,21%, medida 2: 115,13% e medida 3: 115,79%

**Co:** medida 1: 119,25%, medida 2: 118,35% e medida 3: 119,49%

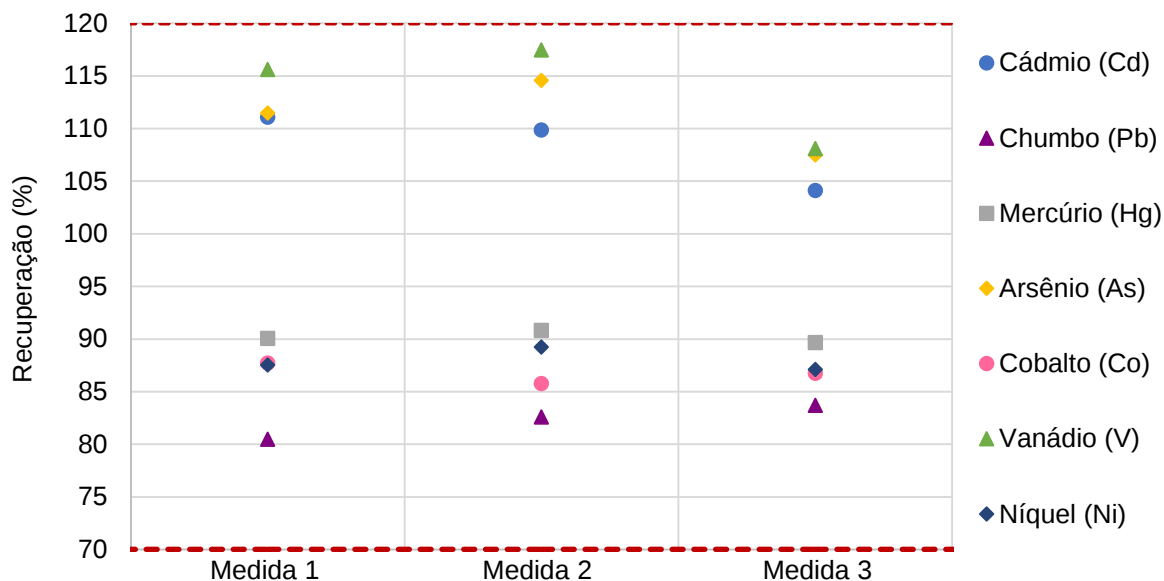
**V:** medida 1: 105,11%, medida 2: 103,23% e medida 3: 100,63%

**Ni:** medida 1: 108,44%, medida 2: 112,09% e medida 3: 113,59%

Fonte: Elaboração própria

Os resultados obtidos para o ensaio de recuperação dos elementos Cd, Pb, Hg, Co, V, As e Ni na concentração baixa (~2 µg/g) resultantes da equação de recuperação mostrado na seção 5.1.2.5.4.1. atendem aos parâmetros de recuperação uma vez que se encontram dentro dos valores aceitáveis de recuperação definido entre 70% a 120%, como pode ser visto na Figura 6.13.

**Figura 6.13 – Representação dos valores obtidos a partir da equação de recuperação, medido em triplicata para concentração baixa (~2 µg/g)**



#### Valores representados

Cd: medida 1: 111,11%, medida 2: 109,88% e medida 3: 104,12%

Pb: medida 1: 80,50%, medida 2: 82,58% e medida 3: 83,71%

Hg: medida 1: 90,08%, medida 2: 90,84% e medida 3: 89,69%

As: medida 1: 111,50%, medida 2: 114,60% e medida 3: 107,52%

Co: medida 1: 87,75%, medida 2: 85,78% e medida 3: 86,76%

V: medida 1: 115,62%, medida 2: 117,50% e medida 3: 108,12%

Ni: medida 1: 87,55%, medida 2: 89,27% e medida 3: 87,12%

Fonte: Elaboração Própria

#### 6.1.6. Limite de Detecção

A Tabela 6.9 mostra os valores dos limites de detecção (LD) conforme definição mostrada na seção 5.1.2.5.5, usando-se a Equação 6. No cálculo do limite de detecção foram feitas medidas em triplicata de 3 espectros distintos, obtidos via contaminação da matriz de celulose com os elementos de interesse deste estudo (Cd, Pb, Hg, As, Co, V e Ni), na concentração baixa, ou seja, de aproximadamente 2 µg/g. A Tabela 6.9 mostra o resultado destas medidas e os respectivos valores dos limites de detecção.

**Tabela 6.9 – Concentrações individuais e médias dos limites de detecção (LD) realizadas pelo software do equipamento de fluorescência de raios-X**

| Matriz                                                                            | Item            | Cd<br>(µg/g) | Pb<br>(µg/g) | Hg<br>(µg/g) | As<br>(µg/g) | Co<br>(µg/g) | V<br>(µg/g) | Ni<br>(µg/g) |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|--------------|
| <b>Celulose microcristalina contaminada com 2 µg/g dos elementos de interesse</b> | LD medida 1     | 0,40         | 0,02         | 0,20         | 0,05         | 0,02         | 0,03        | 0,20         |
|                                                                                   | LD medida 2     | 0,40         | 0,04         | 0,20         | 0,05         | 0,02         | 0,03        | 0,20         |
|                                                                                   | LD medida 3     | 0,40         | 0,04         | 0,20         | 0,05         | 0,02         | 0,02        | 0,20         |
|                                                                                   | <b>LD média</b> | <b>0,40</b>  | <b>0,03</b>  | <b>0,20</b>  | <b>0,05</b>  | <b>0,02</b>  | <b>0,03</b> | <b>0,20</b>  |

Cd: Cádmio; Pb: Chumbo; Hg: Mercúrio; As: Arsênio; Co: Cobalto; V: Vanádio; Ni: Níquel  
LD: Limite de detecção

Fonte: Elaboração própria

Os limites de detecção garantem que o método é adequado para a detecção de valores limites dos elementos presentes em produtos farmacêuticos. Neste parâmetro, o método pode ser utilizado para o fim pretendido, pois atende aos valores permitidos pelas Farmacopeias Brasileira (BRASIL, 2019) e Americana (USP42-NF37, 2019), assim como os limites estabelecidos e permitidos para ingestão diária a serem considerados em avaliação de risco e LPED para impurezas elementares pelo Guideline for elemental impurities (ICH, 2019), conforme citado na seção 1.1 e mostrado na Tabela 1.2.

#### 6.1.7. Limite de Quantificação

A Tabela 6.10 mostra os limites de quantificação (LQ), conforme definição dada na seção 5.1.2.5.6 pela Equação 8. Como o limite de quantificação é obtido via limite de detecção, as considerações feitas na seção 6.1.6 para o LD são as mesmas para o LQ. Na Tabela 6.10 mostramos apenas o LQ do valor médio.

**Tabela 6.10 – Concentrações individuais e médias dos limites de quantificação (LQ) realizadas pelo software do equipamento de fluorescência de raios-X.**

| Matriz                                                                            | Item      | Cd<br>(µg/g) | Pb<br>(µg/g) | Hg<br>(µg/g) | Co<br>(µg/g) | V<br>(µg/g) | As<br>(µg/g) | Ni<br>(µg/g) |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|
| <b>Celulose microcristalina contaminada com 2 µg/g dos elementos de interesse</b> | <b>LQ</b> | 1,21         | 0,09         | 0,61         | 0,06         | 0,09        | 0,15         | 0,61         |

Cd: Cádmio; Pb: Chumbo; Hg: Mercúrio; As: Arsênio; Co: Cobalto; V: Vanádio; Ni: Níquel

**LQ: Limite de quantificação**  
Fonte: Elaboração própria

Os limites de quantificação garantem que o método é adequado para a quantificação de valores limites dos elementos presentes em produtos farmacêuticos. Neste parâmetro, o método pode ser utilizado para o fim pretendido, pois atende aos valores permitidos pelas Farmacopeias Brasileira (BRASIL, 2019) e Americana (USP42-NF37, 2019), assim como os limites estabelecidos e permitidos para ingestão diária a serem considerados em avaliação de risco e LPED para impurezas elementares pelo Guideline for elemental impurities (ICH, 2019), conforme citado na seção 1.1 e mostrado na Tabela 1.2 e na seção 5.1.2.6.6, conforme mostrado na Tabela 5.3, respeitando a faixa de trabalho de 2 µg a 35 µg.

#### 6.1.8. Robustez

Para justificar a robustez do método foram avaliadas em triplicata e calculada a média das concentrações dos elementos presentes nas amostras contendo apenas a matriz de celulose microcristalina, adquirida de diferentes fornecedores e com medidas feitas em datas distintas. O método apresentou robustez por conseguir identificar os elementos em avaliação de risco das classes 1 e 2 A nos diferentes lotes analisados. A Tabela 6.11 mostra os resultados para o teste de Robustez.

**Tabela 6.11 – Resultados do valor médio para o parâmetro de robustez do método para os elementos Cádmio (Cd), Chumbo (Pb), Mercúrio (Hg), Arsênio (As), do classe 1 e Cobalto (Co), Vanádio (V) e Níquel (Ni) do classe 2A, calculados em µg/g.**

| Amostra | Produto                     | Fornecedor   | Data       | Lote   | Cd<br>(µg/g)<br>Classe<br>1 | Pb<br>(µg/g)<br>Classe<br>1 | Hg<br>(µg/g)<br>Classe<br>1 | As<br>(µg/g)<br>Classe<br>1 | Co<br>(µg/g)<br>Classe<br>2A | V<br>(µg/g)<br>Classe<br>2A | Ni<br>(µg/g)<br>Classe<br>2A |
|---------|-----------------------------|--------------|------------|--------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 1       | Celulose<br>Microcristalina | Valdequímica | 13/04/2021 | 023488 | ND*                         | ND*                         | 0,33                        | ND*                         | ND*                          | ND*                         | ND*                          |
| 2       | Celulose<br>Microcristalina | Labsynth     | 14/04/2021 | 227833 | ND*                         | ND*                         | 0,20                        | ND*                         | ND*                          | ND*                         | ND*                          |

\*ND: Não detectável

**Cd: Cádmio; Pb: Chumbo; Hg: Mercúrio; As: Arsênio; Co: Cobalto; V: Vanádio; Ni: Níquel**  
Fonte: Elaboração própria

A média das concentrações para os elementos Cd, Pb, As, Co, V e Ni tiveram resultados não detectáveis para matriz de celulose microcristalina adquirida do fornecedor Valdequímica, sob o lote de fabricação 023488 e analisada dia 13/04/2021, bem como para a análise da matriz de celulose microcristalina adquirida do fornecedor Labsynth, sob o lote de fabricação 227833 e analisada dia 14/04/2021, onde pode-se observar a robustez do método considerando os resultados e indicando a capacidade em resistir a pequenas variações como a troca de lote do produto.

Os valores medidos para a concentração do elemento Hg diferem entre os fornecedores e indicam medida viável, portanto, ainda pode ser observada a robustez já que houve sensibilidade para detecção destes resultados mesmo com a variação entre fornecedores.

## CAPÍTULO 7

### 7.1. Estudo de caso de recuperação a partir de comprimidos, fabricados pela indústria farmacêutica do Brasil

A Tabela 7.1 mostra o resultado do ensaio de recuperação para os comprimidos de Metformina de 500 mg, lote: BR124143, Fabricação: 08/2020, Validade: 07/2023. Os testes de recuperação foram feitos apenas para os elementos da classe 1 (Cd, Pb, Hg e As).

**Tabela 7.1 – Ensaio de recuperação para os comprimidos de Metformina de 500mg medidas em triplicata e calculada a média dos resultados.**

| Classe 1  | Quantidade Verdadeira (µg/g) | Média da Quantidade Recuperada (µg/g) |
|-----------|------------------------------|---------------------------------------|
| <b>Cd</b> | 35,49                        | 35,68                                 |
| <b>Pb</b> | 39,53                        | 30,39                                 |
| <b>Hg</b> | 37,24                        | 30,66                                 |
| <b>As</b> | 35,42                        | 32,25                                 |

**Cd: Cádmio; Pb: Chumbo; Hg: Mercúrio; As: Arsênio**

Fonte: Elaboração Própria.

Os resultados do ensaio de recuperação para os comprimidos de Metformina dos elementos Cd, Pb, Hg e As foram satisfatórios e compreendem o critério aceitável da porcentagem de recuperação que deve ficar entre 70% a 120% com precisão de até  $\pm 20\%$  (RIBANI et al., 2004).

A Tabela 7.2 mostra o resultado do ensaio de recuperação para os comprimidos de Sinvastatina de 20 mg, lote: LD851, Fabricação: 01/2021, Validade: 12/2022.

**Tabela 7.2 – Ensaio de recuperação para os comprimidos de Sinvastatina de 20mg medidas em triplicata e calculada a média dos resultados.**

| Classe 1  | Quantidade Verdadeira (µg/g) | Média da Quantidade Recuperada (µg/g) |
|-----------|------------------------------|---------------------------------------|
| <b>Cd</b> | 35,88                        | 42,90                                 |
| <b>Pb</b> | 39,96                        | 47,60                                 |
| <b>Hg</b> | 37,64                        | 39,45                                 |
| <b>As</b> | 35,81                        | 44,14                                 |

**Cd: Cádmio; Pb: Chumbo; Hg: Mercúrio; As: Arsênio**

Fonte: Elaboração Própria.

Os resultados do ensaio de recuperação para os comprimidos de Sinvastatina de 20mg dos elementos Cd, Pb, Hg e As, foram satisfatórios e compreendem o critério aceitável da porcentagem de recuperação (70% a 120% com precisão de até  $\pm 20\%$ ) (RIBANI et al., 2004).

A Tabela 7.3 mostra o resultado do ensaio de recuperação para os comprimidos de Glibenclamida de 5 mg, lote: ARA06380, Fabricação: 11/2020, Validade: 10/2022.

**Tabela 7.3 – Ensaio de recuperação para os comprimidos de Glibenclamida de 5mg medidas em triplicata e calculada a média dos resultados.**

| <b>Classe 1</b> | <b>Quantidade Verdadeira (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b> | <b>Média da Quantidade Recuperada (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b> |
|-----------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| <b>Cd</b>       | 35,11                                                     | 41,35                                                              |
| <b>Pb</b>       | 39,10                                                     | 44,53                                                              |
| <b>Hg</b>       | 36,84                                                     | 39,67                                                              |
| <b>As</b>       | 35,04                                                     | 28,04                                                              |

**Cd: Cádmio; Pb: Chumbo; Hg: Mercúrio; As: Arsênio**

Fonte: Elaboração Própria.

Os resultados do ensaio de recuperação para os comprimidos de Glibenclamida 5mg dos elementos Cd, Pb, Hg e As, foram satisfatórios e compreendem o critério aceitável da porcentagem de recuperação (70% a 120% com precisão de até  $\pm 20\%$ ) (RIBANI et al., 2004).

O fato dos componentes das formulações usadas neste estudo de caso, usando comprimidos adquiridos no mercado regional, os quais utilizam excipientes que não são necessariamente iguais ao nosso, terem formulação que não se conhece na totalidade e muito menos suas respectivas concentrações, esperávamos resultados discordantes para a taxa de recuperação, no entanto, analisando os valores obtidos nas Tabela 7.1, 7.2 e 7.3 para as quantidades recuperadas e levando-se em consideração a faixa de recuperação aceita, podemos afirmar que não houve nenhum tipo de contaminação por parte da fabricação destes comprimidos pela indústria farmacêutica e que o excipiente que escolhemos para usar como matriz (celulose microcristalina) é usada hoje por muitos fabricantes nas suas formulações, podemos afirmar que contribuiu para obtermos bons resultados neste ensaio.

## **CAPÍTULO 8**

### **8.1. Considerações Finais**

Mostramos neste estudo que a técnica de Fluorescência de Raios-X por Dispersão em Energia (EDXRF) pode ser adotada pela indústria farmacêutica, para análise elementar de ativos, excipientes e/ou acabados, devido a simplicidade da técnica, por ser seletiva, apresentar respostas lineares para faixas de trabalho de interesse, ser precisa e exata, apresentar limites de detecção e quantificações muito baixos (para o grupo de elementos objetos deste estudo, o LD<0.4 µg/g e LQ<1.2 µg/g) e ser robusta.

O custo dos equipamentos envolvidos e a versatilidade na determinação simultânea de uma gama de elementos, atingindo limites de detecção e quantificação apropriados para a investigação de impurezas de interesse das ciências farmacêuticas. Estas substâncias podem ser altamente prejudiciais à saúde quando ingeridos acima dos limites permissíveis, como as impurezas estudadas neste trabalho pertencentes as classes 1 e 2A.

Fizemos a validação do método para a utilização da técnica de EDXRF através da análise química elementar, medindo a concentração dos elementos químicos, em amostras que tinham como base a matriz de celulose microcristalina, a qual foi adicionada contaminantes pertencentes as classes 1 (Cd, Pb, Hg, As ) e 2A (Co, V e Ni), em concentrações de interesse para este estudo. As amostras com os contaminantes foram homogeneizadas e prensadas a fim de formar pastilhas, para posterior análise no equipamento de fluorescência de raios-X.

A análise dos resultados mostra que a técnica de EDXRF pode ser adotada como técnica analítica para análise de insumos e produtos farmacêuticos em determinação qualitativa e quantitativa de contaminantes pertencentes as classes 1 e 2A.

Levando em consideração as possibilidades da técnica e finalidade, há necessidade de calibração prévia do sistema de fluorescência, definição das concentrações de interesse que se deseja trabalhar e escolha das classes para os quais a mesma será aplicada.

Mostramos neste estudo que o processo de validação do método para utilização da técnica de EDXRF para uso em Ciências Farmacêuticas é altamente

eficiente e atende a todos os parâmetros exigidos nos compêndios oficiais requeridos para sua validação, conforme mostrados nos testes de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez conduzidos neste estudo.

Também ficou demonstrado neste trabalho, que a matriz escolhida para validação do método é abrangente e permite que o método seja facilmente escalável para outras matrizes de interesse e/ou formulações usadas por esta indústria.

Por fim testamos em estudo de caso, como esta metodologia de validação se comportaria numa situação real, quando aplicada para verificar a capacidade de recuperação de elementos químicos da classe 1, em produto final (comprimidos) comercializado no Brasil, já que para os insumos o método atendeu todos os parâmetros, considerando a matriz utilizada.

A técnica de EDXRF mostrou-se válida, sendo aplicada com sucesso na determinação dos elementos da classe 1 em três formulações diferentes: Metformina, Sinvastatina e Glibenclamida conseguindo recuperar dentro dos limites estabelecidos pelo método, as impurezas adicionadas às estas formulações. A técnica trabalha com amostras pequenas do material a ser analisado (~4g), a análise é rápida, levando em média 30 minutos por amostra, precisa e mostrou-se muito versátil quando comparada com outras técnicas já validadas pelas Farmacopeias, podendo ser adotada como técnica recomendada pelas Farmacopeias, quando o problema for a determinação química elementar.

## CAPÍTULO 9

### 9.1. Referências

ALINA, M. et al. Heavy metals (mercury, arsenic, cadmium, plumbum) in selected marine fish and shellfish along the straits of malacca. **International Food Research Journal**, v. 19, n. 1, p. 135–140, 2012.

AMPTEK. **MP1 XRF Mounting Plate**. Disponível em: <<http://www.amptek.com/xrf/>>. Acesso em: 11 jan. 2017.

BERNARD, A. Cadmium & its adverse effects on human health. **Indian Journal of Medical Research**, v. 128, n. 4, p. 557–564, 2008.

BERTIN, E. P. Principles and Practice of X-Ray Spectrometric Analysis. **Journal of Applied Crystallography**, v. 5, n. 5, p. 377–388, 1975.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica**, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências.**, 2017.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 6. ed. Brasília, DF: ANVISA, 2019.

BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: Estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, n. 1, p. 129–146, 2003.

BROUWER, P. Theory of XRF. **Pan alytical BV**, v. 3, n. 1, p. 11, 2010.

CHANDRAN, S.; SINGH, R. S. P. Comparison of various international guidelines for

analytical method validation. **International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 62, n. 1, p. 4–14, 2007.

CLETO, D. A. M. **Análise de saliva e do fluido sulco gengival pelo método de fluorescência de raios X por reflexão total**. [s.l.] Universidade Estadual de Londrina, 2013.

CUADRADO, J. A. P. et al. Validación de métodos analíticos. **Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria**, v. 1, p. 331, 2001.

DAVIS, D.; FURUKAWA, H. Using XRF as an alternative technique to plasmaspectrochemistry for the new USP and ICH directives on elemental impurities in pharmaceutical materials. **Spectroscopy**, v. 32, p. 12– 17., 2017.

FRADKIN, L. G.; DURA, J.-M.; NOORDERMEER, J. N. Ryks: new partners for Wnts in the developing and regenerating nervous system. **Trends in neurosciences**, v. 33, n. 2, p. 84–92, 2010.

FURUKAWA, H. et al. The comparative verification of calibration curve and background fundamental parameter methods for impurity analysis in drug materials. **X-Ray Spectrometry**, v. 46, n. 5, p. 382–387, 2017.

GUSTAVO GONZÁLEZ, A.; ÁNGELES HERRADOR, M. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 227–238, 2007.

IAEA - INTERNACIONAL AGENCY ENERGY ATOMIC. **Radioisotope X-ray fluorescence Spectrometry**, 1970.

ICH. Guideline for elemental impurities, Q3D. **International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use**, 2019.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Orientação**

sobre validação de métodos analíticos DOQ-CGCRE-008, 2020.

JAISHANKAR, M. et al. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 7, n. 2, p. 60–72, 2014.

JENKINS R. Quantitative X-ray Spectrometry. In: **Physical Sciences**. 2. ed. New York: Boca Raton, 1981.

KATSANOS, A. A. **X-Ray Methods**. 1. ed. Viena: IAEA - Internacional Agency Energy Atomic, 1980.

KUMP, P.; NEČEMER, M.; VEBER, M. Determination of Trace Elements in Mineral Water Using Total Reflection X-Ray Fluorescence Spectrometry after Preconcentration with Ammonium Pyrrolidinedithiocarbamate. **X-Ray Spectrometry**, v. 26, n. 4, p. 232–236, 1998.

KUSHWAHA, P. Metallic Impurities in Pharmaceuticals: An Overview. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 17, n. 8, p. 960–968, 2020.

MALVERN PANALYTICAL. **Epsilon range/Epsilon1**. Disponível em: <[www.malvernpanalytical.com](http://www.malvernpanalytical.com)>. Acesso em: 24 jan. 2019.

MARGUÍ, E.; QUERALT, I.; HIDALGO, M. Application of X-ray fluorescence spectrometry to determination and quantitation of metals in vegetal material. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 362–372, 2009.

MARTINS, G. W. Human health effects of heavy metals. **Environmental Science and Technology Briefs for Citizens**, v. 15, p. 1–6, 2009.

NEČEMER, M.; KUMP, P.; VOGEL-MIKUŠ, K. **Use X-ray fluorescence-based analytical techniques in phytoremediation**. 9. ed. New York: Handbook of phytoremediation, 2011.

NKANSAH, M. A. et al. Heavy metal contents of some medicinal herbs from Kumasi,

Ghana. **Cogent Environmental Science**, v. 2, n. 1, p. 1–8, 2016.

OBIAJUNWA, E. I.; ADEBAJO, A. C.; OMOBUWAJO, O. R. Essential and trace element contents of some Nigerian medicinal plants. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, v. 252, n. 3, p. 473–476, 2002.

PARREIRA, P. S. Metodologia de EDXRF e aplicações com um sistema portátil. **LFNATEC - Publicação Técnica do Laboratório de Física Nuclear Aplicada**, 2006.

PERIS-VICENTE, J.; ESTEVE-ROMERO, J.; CARDA-BROCH, S. Validation of Analytical Methods Based on Chromatographic Techniques: An Overview. **Analytical Separation Science**, p. 1757–1888, 2015.

RAMBLA-ALEGRE, M.; ESTEVE-ROMERO, J.; CARDA-BROCH, S. Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. **Journal of Chromatography A**, v. 1232, p. 101–109, 2012.

REBIERE, H. et al. Inorganic analysis of falsified medical products using X-ray fluorescence spectroscopy and chemometrics. **Talanta**, v. 195, p. 490–496, 2019.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quimica Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

SÁNCHEZ, H. J. et al. Total reflection X-ray fluorescence analysis of oral fluids of women affected by osteoporosis and osteopenia. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 63, n. 12, p. 1485–1488, 2008.

SAUER, B. et al. Application of X-ray fluorescence spectrometry for screening pharmaceutical products for Elemental Impurities according to ICH guideline Q3D. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 179, p. 1–8, 2020.

SIEGBAHN, K. **Alpha, Beta and Gamma-Ray Spectroscopy**. 1. ed. North-Holland: North-Holland, 1965.

SINGH, N.; KUMAR, D.; SAHU, A. P. Arsenic in the environment: Effects on human health and possible prevention. **Journal of Environmental Biology**, v. 28, n. 2, p. 359, 2007.

SMITH, A. H.; LINGAS, E. O.; RAHMAN, M. Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: A public health emergency. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 78, p. 1093–1103, 2000.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. USP. In: 40. ed. Rockville: Maryland, EUA: United States Pharmacopeial Convention, 2017. p. 8.066, 8.067.

USP42-NF37. Validation of Compendial Procedures. **USP**, 2019.

VANGRIEKEN, R.; MARCOWIOWZ, A. **Handbook of X-Ray Spectrometry**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 2001.

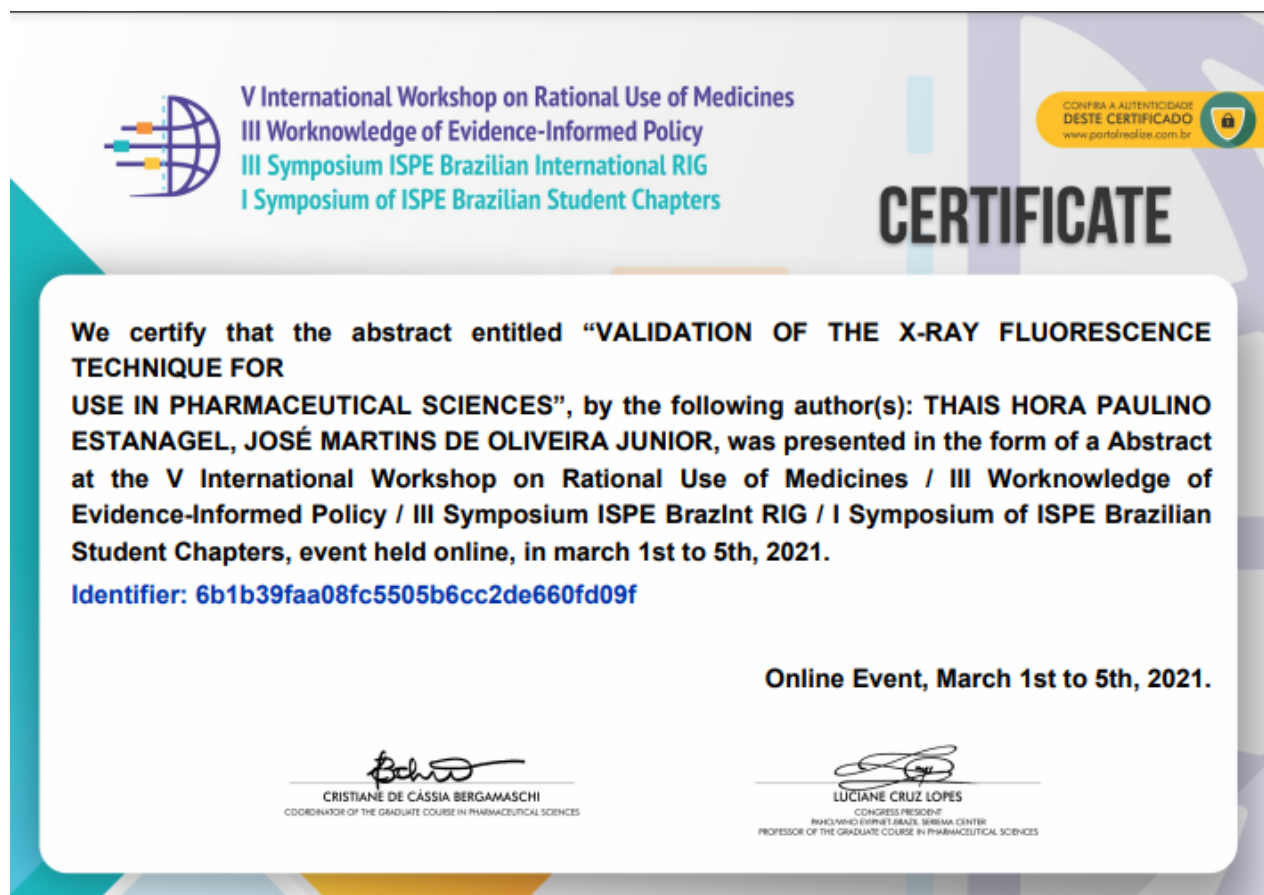
VOGEL-MIKUŠ, K. et al. Analytical Tools for Exploring Metal Accumulation and Tolerance in Plants. **Phytotechnologies: Remediation of Environmental Contaminants**, p. 468–521, 2012.

WALSH, M. C. Moving from official to traceable methods. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 9–10, p. 616–623, 1999.

## CAPÍTULO 10

### 10.1. Anexos

#### 10.1.1. Apresentação no evento: V International Workshop on Rational Use of Medicines



## 10.1.2. Publicação nos anais do evento: V International Workshop on Rational Use of Medicines

10.46943/V.IWRUM.2021.01

Brazilian Journal of  
Pharmaceutical Science 2021

85

TA 04: Innovation and Development of Health Technology

RUM086

### Validation of the x-ray fluorescence technique for the use in pharmaceutical sciences

Thais Hora Paulino Estanagel<sup>1</sup>; José Martins de Oliveira Junior<sup>1</sup>

<sup>1</sup> University of Sorocaba, Sorocaba, São Paulo, Brazil

**Context:** Elementary impurities in medicines can arise from several sources and therefore, there is a need to investigate the chemical composition of these drugs, since the presence in excessive concentrations of some elements, as well as the deficiency of others, can lead to a series of metabolic disorders. For this investigation to be carried out with quality it is essential to validate the technique used. The energy dispersion x-ray fluorescence technique (ED-XRF) can contribute to this end, because it is an elementary analysis technique capable of identifying and quantifying a range of chemical elements in different concentrations.

**Objectives:** Validate the ED-XRF technique for use in pharmaceutical sciences, whose focus is on elementary identification and quantification.

**Methods:** The samples are transformed into tablets using a press and then the fluorescence analyzes are performed with equipment sold by the company panalytical, model Epsilon-1, which uses an excitation x-ray source with variable voltage from 20kV to 50kV and silver target; silicon drift detector and different filter sets. The estimated reading time for each sample is variable to provide data with adequate statistics for the research objectives. The qualitative and quantitative results are obtained by equipment's software, which performs the fundamental analysis parameters.

**Results:** Our results are in accordance with the parameters: (a) selectivity for matrix in the presence of impurities; (b) linearity in the concentrations of 70ppm, 35ppm, 17.5ppm, 8ppm, 4ppm, 2ppm and 1ppm; (c) accuracy in the working range of 80% to 120% recovery and calculation of standard deviation; (d) precision below 4.5% for the relative standard deviation; (e) limit of detection <0,5 ppm; (f) limit of quantification <1,5 ppm and (g) robustness.

**Conclusion:** The increase in demands for reliable and certified analytical results imposes the need to implement a quality system and the technique proposed in this work proved to be effective and has been successfully validated for use in the various segments of the pharmaceutical sciences.

**Funding:** Project funded by the Coordination of Superior Level Staff Improvement (CAPES).

**Ethics statement:** Not applicable.

### 10.1.3. Apresentação no evento (modalidade oral): II Congresso Brasileiro de Ciências Farmacêuticas on-line.



### 10.1.4. Palestra ministrada no evento: XXII Jornada Farmacêutica 2021 UNISO

