

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

Robert da Silva Angelino

**OTIMIZAÇÃO E IMPLEMENTAÇÃO DE UM MÉTODO PARA ANÁLISE DE
CONTAMINANTES INORGÂNICOS EM INSUMOS FARMACÊUTICOS NA
VACINA DE FEBRE AMARELA POR ABSORÇÃO ATÔMICA POR CHAMA**

ALUNO: ROBERT DA SILVA ANGELINO

ORIENTADORA: SHIRLEY DE MELLO PEREIRA ABRANTES

Rio de Janeiro

2020

Robert da Silva Angelino

**OTIMIZAÇÃO E IMPLEMENTAÇÃO DE UM MÉTODO PARA ANÁLISE DE
CONTAMINANTES INORGÂNICOS EM INSUMOS FARMACÊUTICOS NA
VACINA DE FEBRE AMARELA POR ABSORÇÃO ATÔMICA POR CHAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para Obtenção de título de Mestre em Vigilância Sanitária

Orientadora: Dra. Shirley de Mello Pereira

Abrantes

Rio de Janeiro

2020

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Angelino, Robert

Otimização e Implementação de um método para análise de contaminantes inorgânicos em insumos farmacêuticos na vacina de febre amarela por absorção atômica por chama. / Robert Angelino. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2020.

69 f. : il. ; fig. ; graf. ; tab.

Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2020.

Orientadora: Shirley de Mello Pereira Abrantes.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Espectrometria de Absorção Atômica por chama. 2. Impurezas Elementares. 3. Contaminantes Inorgânicos. I. Título.

Optimization and Implementation of a method for analysis of inorganic contaminants in pharmaceutical in the yellow fever vaccine by atomic flame absorption.

Dedicatória

Aos meus avós in memoriam.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Porque dEle, por Ele, e para Ele são todas as coisas. Sem Ele nada disso poderia ser possível. Obrigado Abba Pai.

Aos meus Pais Marcos Angelino e Zilda da Silva, por estarem ao lado em todo o período do curso me apoiando, e incentivando nos momentos de dificuldades. Em especial ao meu Pai, pelo companheirismo que demonstrou em todo esse período.

A Mulher que fez a minha vida mudar por inteiro, minha esposa Eyshila Ramos, muito obrigado por todo carinho, compreensão e paciência em todo período do curso. Aos meus tios Valdeci e Nilda, por me incentivarem desde a época do curso técnico.

Aos meus Tios Roberto e Fátima, por sempre me incentivarem a buscar os conhecimentos necessários, a fim de que pudesse atingir todos meus objetivos.

Aos meus primos Carolinne, Camilla, Wagner e Tamires por sempre torcerem e se alegrarem comigo por mais esta etapa vencida.

Aos meus Sogros Luiz Carlos e Marcilene Oliveira, o meu muito obrigado por serem meus Pais. Por me acolherem, me amarem e estarem sempre comigo. Em especial ao meu Sogro que me ensinou que nada disso importaria, se não tivermos Deus em nossas vidas.

Ao meu cunhado Pedro Ramos, um irmão a qual eu ganhei e no qual eu me espelho muito por sua força e determinação. Muito obrigado pela reciprocidade que temos, e sempre teremos. E sua esposa, Paula Leal. Obrigado por todas as conversas de apoio e incentivo quando falava do que almejava fazer, o meu muito obrigado.

A minha cunhada e caçulinha Maria Eduarda, muito obrigado por todo carinho, amor e apoio, a reciprocidade é verdadeira.

Ao amigo e irmão Vitor Sisino, o meu muito obrigado. Como diz a música de Milton Nascimento, “ Amigo é coisa para se guardar, debaixo de 7 chaves dentro do coração”. E você meu irmão, tem um espaço especial no meu coração. Obrigado por tudo.

Ao amigo Thallis, por todas as conversas motivacionais, por toda paciência e ideias sugeridas para o andamento do trabalho.

A minha querida orientadora Shirley Abrantes, meu muito obrigado pela paciência, e orientação durante todo o decorrer do curso. Que Deus continue abençoando, conduzindo seus caminhos em graça e paz.

Ao amigo Daniel Guedes, o meu muito obrigado pelo apoio e incentivo desde o processo seletivo. Durante o curso, obrigado pela atenção e compreensão dedicados a mim. Aos colegas de trabalho do LAFIQ, por torcerem por mais essa conquista.

A todos que torceram direta e indiretamente, muito obrigado!

RESUMO

Os órgãos reguladores vêm sendo cada vez mais rígidos em suas atualizações de monografias, pois sabe-se que a contaminação por impurezas metálicas pode ser originada por diferentes processos, desde o armazenamento ao processo de sínteses, que são realizadas durante a formulação de um produto. Isto ocorre devido à necessidade de garantir que segurança e eficácia dos produtos não sejam afetadas. Portanto, órgãos como o ICH, a FDA e a ANVISA definem os limites e requisitos de grau de purezas, para insumos da indústria farmacêutica, para identificação e qualificação. Diante disto, sugerem técnicas analíticas seletivas e sensíveis como cromatografia e espectroscopia para o controle e determinação de impurezas. Alguns laboratórios ainda utilizam métodos tradicionais colorimétricos para a identificação de impurezas, não sendo muito preciso, pois os métodos tradicionais são técnicas qualitativas. Este estudo teve como objetivo demonstrar que elementos considerados como impurezas (Fe, Pb, Ni, As) para insumos farmacêuticos, podem ser analisados por espectrometria de absorção atômica por chama, e substituir perfeitamente os métodos tradicionais (colorimétrico). Com o intuito de testar a linearidade do equipamento, preparou-se em primeiro lugar, uma curva analítica com 7 pontos. Testada a linearidade, preparou-se a curva com 6 pontos, e deu-se continuidade aos testes. Para os elementos Fe, Pb e Ni foi possível encontrar LOD e LOQ – (0,235; 0,785mgL⁻¹) (0,217; 0,649mgL⁻¹), (0,238; 0,712mgL⁻¹), respectivamente. O elemento arsênio não foi possível quantificar na faixa estabelecida para os elementos, baseada em preceitos farmacopeicos, pois apresentou grande variações em suas medidas. A faixa de recuperação do método para os elementos Pb, Fe, Ni e As foram (91,1-99,1); (97,5-99,8); (97,3-102,6) e (85,8-136,5) %, respectivamente, passando Pb, Fe e Ni pelo critério de aceitação. Os elementos Fe, Ni e Pb obtiveram excelentes resultados de repetibilidade e precisão intermediária. E a especificidade foi adequada para todos os elementos. Sabe-se, portanto, que uma das maiores preocupações da indústria farmacêutica é a crescente fiscalização por parte das agências regulatórias com relação ao controle de impureza em produtos farmacêuticos. Os estudos realizados atualmente sobre impurezas farmacêuticas são essenciais para o controle de qualidade dos produtos oriundos da indústria farmacêutica e para a segurança da sociedade.

ABSTRACT

Regulatory agencies have been increasingly rigid in their monograph updates, as it is known that contamination by metallic impurities can be caused by different processes, from storage to the synthesis process that are carried out during the formulation of a product. This is due to the need to ensure the safety and effectiveness of the products are not affected. Therefore, bodies such as ICH, FDA and ANVISA define the limits and requirements for the degree of purity for inputs from the pharmaceutical industry, for identification and qualification. In view of this, they suggest selective and sensitive analytical techniques such as chromatography and spectroscopy for the control and determination of impurities. Some laboratories still use traditional colorimetric methods for the identification of impurities, and it is not very accurate, as traditional methods are qualitative techniques. This study aimed to demonstrate that elements considered as impurities (Fe, Pb, Ni, As) for pharmaceutical inputs and raw materials, can be analyzed by flame atomic absorption spectrometry, and perfectly replace traditional methods (colorimetric). In order to test the linearity of the equipment, an analytical curve with 7 points was prepared in the first place. After testing the linearity, the curve was prepared with 6 points, and the tests continued. For the elements Fe, Pb and Ni it was possible to find LOD and LOQ - (0.235; 0.785mgL⁻¹) (0.217; 0.649mgL⁻¹), (0.238; 0.712mgL⁻¹), respectively. The element arsenic was not possible to quantify in the range established for the elements, based on pharmacopoeial precepts, as it presented great variations in its measurements. The recovery range of the method for the elements Pb, Fe, Ni and As were (91.1-99.1); (97.5-99.8); (97.3-102.6) and (85.8-136.5)%, respectively, passing Pb, Fe and Ni by the acceptance criterion. The elements Fe, Ni and Fe obtained excellent results of repeatability and intermediate precision. And the selectivity was adequate for all elements. It is known, therefore, that one of the biggest concerns of the pharmaceutical industry is the increasing inspection by regulatory agencies regarding the control of impurities in pharmaceutical products. Studies currently carried out on pharmaceutical impurities are essential for the quality control of products from the pharmaceutical industry and for the safety of society.

LISTRA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas que ocorrem na amostra durante análise por espectrometria de absorção atômica por chama.

Figura 2. Atomizador em chama

Figura 3. Estrutura da chama em combustível na espectrometria de absorção atômica

Figura 4. Esquema de Espectrômetro de Absorção Atômica com chama

Figura 5. Gráfico da linearidade do equipamento para a determinação de Ferro.

Figura 6. Gráfico da linearidade do equipamento para a determinação de Chumbo.

Figura 7. Gráfico da linearidade para a determinação de Chumbo (MOLIN, 2010).

Figura 8. Gráfico da linearidade do equipamento para a determinação de Níquel.

Figura 9. Gráfico da linearidade do para determinação de Níquel (MOLIN, 2010).

Figura 10. Gráfico da linearidade do equipamento para a determinação de Arsênio

Figura 11. Gráfico da linearidade do para determinação de As (MOLIN, 2010).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da vacina contra febre amarela (frascos para 5 e 10 doses).

Tabela 2: Limites de notificação, identificação e qualificação de produtos

Tabela 3. Concentrações utilizadas no Estudo da Linearidade em mgL^{-1} de Ferro.

Tabela 4. Concentrações utilizadas no Estudo da Linearidade em mgL^{-1} Chumbo.

Tabela 5. Concentrações utilizadas no Estudo da Linearidade em mgL^{-1} Níquel.

Tabela 6. Concentrações utilizadas no estudo da linearidade em mgL^{-1} Arsênio.

Tabela 7. Limites de detecção e quantificação de ferro, chumbo e níquel em F AAS

Tabela 8. Resultados (mgL^{-1}) e percentual (%) de recuperação.

Tabela 9: Leituras para precisão realizadas no mesmo dia (repetibilidade)

Tabela 10. Precisão intermediária.

Tabela 11. Comparação $CV_{RP_{exp}} / CV_{RP}$.

Tabela 12. Modificações avaliadas na robustez do método de FAAS nas determinações de chumbo, níquel, ferro e arsênio.

Tabela 13. Modificações alternativas na robustez do método de F AAS nas determinações de chumbo, níquel, ferro e arsênio.

Tabela 14. Comparação das médias do padrão e amostra em F AAS

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Propriedades da Chama em espectrometria de absorção atômica (Adaptado de SKOOG, (2006).

Quadro 2 – Documentos de validação de órgãos nacionais e internacionais

Quadro 3 – Definições, aplicação e parâmetros de validação de alguns dos principais órgãos (nacionais).

Quadro 4. Informações de Padrões e Equipamentos utilizados na análise de contaminantes inorgânicos em vacinas contra febre amarela.

Quadro 5. Preparo dos padrões utilizados na análise de contaminantes inorgânicos em vacinas contra febre amarela em F AAS.

Quadro 6. Preparo das amostras utilizados na análise de contaminantes inorgânicos em vacinas contra febre amarela em F AAS.

Quadro 7. Avaliação da linearidade do elemento chumbo

Quadro 8. Avaliação da linearidade do elemento Ferro.

Quadro 9. Avaliação da linearidade do elemento Níquel

Quadro 10. Avaliação da linearidade do elemento Arsênio

Quadro 11. Concentrações utilizadas para determinação dos teores dos elementos Fe, Pb, Ni e As em mgL^{-1} .

Quadro 12. Critérios de aceitação para recuperação de contaminantes inorgânicos para FAAS e Forno de Grafite

LISTA DE SIGLAS

AAS – Espectrometria de Absorção Atômica

AES – Espectrometria de Emissão Atômica

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

As - Arsênio

BPF – Boas Práticas de Fabricação

CQ – Controle de Qualidade

CTV - Complexo Tecnológico de Vacinas

CVAAS - Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor Frio

DEQUA - Departamento de Controle de Qualidade

DSS – GF AAS – *Direct Current Plasma Optical Emission Spectrometry*

EMA – *European Medicines Agency*

FAAS – *Flame Atomic Adsorption Spectrometry*

Fe - Ferro

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

GQ - Garantia da Qualidade

HGAAS - Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Hidretos

IARC – *International Agency for Research on Cancer*

ICH – *The International Concil for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*

ICP – AES – Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado

ICP – MS - Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado

LAFIQ – Laboratório Físico-Químico

MG – Minas Gerais

MS – Ministério da Saúde

Ni - Níquel

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPAS - Organização Pan-Americana de Saúde

Pb – Chumbo

PNI - Programa Nacional de Imunização

POP – Procedimento Operacional Padrão

RDC – Resolução de Diretoria Colegiada

SUS – Sistema Único de Saúde

UO – Unidade Operacional

XRFS – Espectrometria de Florescência de Raios X

SUMÁRIO

| | |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1. A Vacina Febre Amarela (VFA)..... | 17 |
| 1.2. Vigilância Sanitária e o Controle de Qualidade | 19 |
| 1.3. Impurezas Farmacêuticas..... | 20 |
| 1.3.1. Classificação de Impurezas | 21 |
| 1.3.2. Especificações para Impurezas | 23 |
| 1.4. Técnicas Analíticas para Determinação de Impurezas | 25 |
| 1.5 MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS..... | 27 |
| 1.5.1. Espectrometria de Absorção Atômica | 27 |
| 1.5.2. Espectrometria de Absorção Atômica por Chama (FAAS)..... | 29 |
| 1.5.2.1. Processo de Atomização..... | 29 |
| 1.5.2.2. Instrumentação | 30 |
| 1.5.2.3. Tipos de Chama..... | 31 |
| 1.5.2.4. Estrutura da Chama | 32 |
| 1.5.2.5. Atomizadores de Chama..... | 33 |
| 1.6. VALIDAÇÃO | 34 |
| 1.6.1. Seletividade/Especificidade | 36 |
| 1.6.2. Efeito Matriz..... | 36 |
| 1.6.3. Linearidade | 37 |
| 1.6.6. Limite de Detecção e Quantificação..... | 37 |
| 1.6.7. Robustez..... | 38 |
| 2. OBJETIVOS | 39 |
| 2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 39 |
| 3. METODOLOGIA..... | 40 |
| 3.1. Materiais, Reagentes e Equipamentos | 40 |
| 3.1.1. Condições analíticas do espectrofotômetro de absorção atômica | 40 |
| 3.2. Amostras..... | 40 |
| 3.3. Elementos avaliados..... | 41 |
| 3.4. Amostragem | 41 |
| 3.5. Lavagem de Materiais..... | 41 |
| 3.6. Preparo das Soluções..... | 42 |
| 3.7. Preparo das Amostras | 42 |
| 3.8. Procedimento de Análise | 43 |
| 3.9. Validação | 44 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 44 |
| 4.1. Validação do Método Analítico para Impurezas Farmacêuticas | 44 |
| 4.2. Linearidade | 44 |
| 4.3. Curva analítica usada para determinação dos teores dos elementos Fe, Pb, Ni e As 56 | |
| 4.4. Seletividade/Especificidade | 56 |
| 4.5. Limite de Detecção E Limite de Quantificação | 57 |
| 4.7. Precisão | 58 |
| 4.7.1. Repetibilidade..... | 58 |
| 4.8. Precisão Intermediária | 59 |
| 4.9. Robustez..... | 60 |
| 5. Conclusão | 62 |
| 6. PRODUTO TÉCNOLÓGICO | 64 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 65 |

1. INTRODUÇÃO

O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) foi fundado em 1976, pertence a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), e é a unidade responsável pelo desenvolvimento e produção de vacinas, reativos para diagnósticos e fitofármacos (GONÇALVES, 2015).

Um estudo realizado pelo Instituto Reputation em 2014, revelou que a Fiocruz tem uma reputação de forte a excelente, postura ética e busca a melhoria da qualidade da vida humana e o atendimento às necessidades por meio da ciência e inovação. Sobre a diversidade de atividades desenvolvidas pela Fundação, a maioria das pessoas consultadas reconheceu a Fiocruz como um “centro de pesquisas” e como “uma fábrica de produtos de saúde”. Em todos os públicos, as associações predominantes sobre a Fundação foram “pesquisas”, “vacinas” e “saúde”. Isso demonstra o importante papel da produção de vacinas por Bio-Manguinhos para a imagem e a projeção da Fiocruz na sociedade (GONÇALVES, 2015)..

O Plano Nacional de Imunização (PNI) do Ministério da Saúde (MS) tem como objetivo principal oferecer todas as vacinas com qualidade a todas as crianças que nascem anualmente no Brasil. Desta forma alcançando coberturas vacinais de 100% homogeneamente em todos os municípios e em todos os bairros. Bio-Manguinhos ocupa uma posição de destaque, como fornecedor de vacinas ao PNI, uma vez que das 15 vacinas que compõem o Calendário Nacional de Vacinação, sete são fornecidas pelo Instituto, conforme listadas abaixo:

- * Febre Amarela;
- * Pneumocócica decavalente;
- * Poliomielite 1 e 3 oral;
- * Poliomielite inativada;
- * Rotavírus humano;
- * Sarampo, caxumba e rubéola (tríplice viral);
- * Sarampo, caxumba, rubéola e varicela (tetra viral).

Com um dos maiores e mais modernos centros de produção da América Latina, o Complexo Tecnológico de Vacinas (CTV) de Bio-Manguinhos submete as suas atividades diretamente ao MS, garantindo a confiabilidade de seus produtos que

atendem prioritariamente às demandas da saúde pública nacional, de acordo com o calendário básico de imunização (GONÇALVES, 2015).

Bio-Manguinhos busca, de forma constante, garantir que a população brasileira possa ter acesso gratuito a imunobiológicos de alta tecnologia, e a redução dos gastos do MS. É reconhecido mundialmente por possuir acreditação em seus laboratórios e atender ao cumprimento dos requerimentos de Boas Práticas de Fabricação (BPF). Em 2001, o Instituto passou a ser pré-qualificado junto à Organização Mundial da Saúde (OMS) para fornecimento da vacina de febre amarela. É responsável pelo quantitativo exportado para mais de 70 países, por meio da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), com um percentual de 58,82% das vacinas produzidas no Brasil (GONÇALVES, 2015).

Observa-se que a saúde pública tem apresentado um processo dinâmico de transformações nas últimas décadas, com mudanças estruturais consideráveis e novos modelos inovadores de gestão, focando sempre na melhoria da qualidade dos serviços e também na melhoria da assistência, destinados à população, de acordo com as diretrizes do Sistema Único de Saúde (SUS). Diante dessa logística, o SUS representa uma modernização de organização dos serviços de saúde, tendo seus pilares relacionados à universalidade, à integralidade, à acessibilidade, à hierarquização, à regionalização, à descentralização e ao controle social. Com isso, novas propostas apresentam modelos de “inteligência sanitária”, cujo objetivo seja aplicável na saúde da sociedade, entre eles o de Vigilância em Saúde (VS) (BRASIL, 2004).

Sabe-se que, atualmente, os recentes casos de surtos de febre amarela têm sido um grande e constante desafio. No Brasil, segundo a Lei 8080/1990, a VS é definida como:

“Um conjunto de ações e serviços de saúde, prestados por órgãos e instituições públicas federais, estaduais e municipais que visam à redução de riscos e doenças ou de outros agravos, e assegurem um acesso universal e igualitário de ações, e aos serviços para sua promoção, proteção e recuperação”.

A VS está inserida no campo de ação do SUS e desenvolve programas relevantes de controle e prevenção em várias áreas: Epidemiológica, Ambiental, Saúde do trabalhador, Imunização, Sanitária e Infraestrutura. Compete à vigilância epidemiológica, realizar ações que proporcionem o conhecimento, a detecção ou a prevenção de qualquer mudança em fatores determinantes e condicionantes de saúde

individual ou coletiva, com a finalidade de recomendar e adotar medidas de prevenção e controle de doenças ou agravos. Com isso, a prevenção de surtos de febre amarela em humanos, deve ser realizada através de um conjunto de atividades que orientem, a detecção ou a prevenção nos fatores que atinjam a saúde pública de forma geral (DABKIEWICZ, 2016).

1.1. A Vacina Febre Amarela (VFA)

Theiler e Smith iniciaram, em 1937 a produção da vacina nos laboratórios da fundação Rockefeller, a partir da cepa 17D, que foi coletada de um africano diagnosticado com febre amarela. No desenvolvimento da vacina, a mesma foi utilizada em maior escala em um surto epidêmico ocorrido no Brasil, no município de Varginha / Minas Gerais. A partir de então, passou a ser utilizada nos estados brasileiros, em programas de vacinação, e também em regiões endêmicas, tornando-se assim, a melhor alternativa para o controle da febre amarela no país (BRASIL, 2004).

A vacina contra a febre amarela é rotineiramente utilizada pelo PNI do MS nas zonas de transição e risco potencial, e torna-se obrigatória a todas as pessoas que se deslocam para regiões endêmicas. Esta vacina é considerada altamente imunogênica, e é bem tolerada e esporadicamente associada a efeitos adversos graves. É indicada a partir dos nove meses de vida, em dose única. É contraindicada para mulheres em fase de amamentação, devido a possível transmissão do vírus para o leite materno. A vacina é comercializada conforme as especificações e composição finais apresentadas na Tabela 1, com destaque para sacarose, glutamato de sódio e sorbitol. A farmacopeia europeia, indica analisar nestas matérias-primas impurezas elementares.

Tabela 2. Composição da vacina contra febre amarela (frascos para 5 e 10 doses).

| | |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Virus 17D | 1.000 DL ₅₀ |
| Sacarose | 0,8 mg/dose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ -MM 342,2965 g/mol) |
| Glutamato de sódio | 4,0 mg/dose (C ₅ H ₈ NaNO ₄ -MM 169,11 g/mol) |
| Sorbitol | 8,5 mg/dose (C ₆ H ₁₄ O ₆ -MM 182,17 g/mol) |
| Gelatina bovina hidrolisada | 5,0 mg/dose (85% de proteína) |
| Eritromicina | 1,5 µg/dose (C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃ -MM 733,93 g/mol) |
| Canamicina | 5,0 µg /dose (C ₁₈ H ₃₆ N ₄ O ₁₁ -MM 484,44 g/mol) |

MM: Massa molecular

Fonte: (INSTITUTO EM IMUNOBIOLOGICOS - BIO-MANGUINHOS, 2014b).

A produção da VFA segue as normas estabelecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), seguindo os padrões descritos na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019B) e o dossiê do produto submetido pelo fabricante no ato do registro. O Brasil, desde de dezembro de 2016, vem enfrentando um grande surto de febre amarela, sendo que o maior número de casos foi observado na região sudeste. Foram registrados valores maiores do que os registros em anos anteriores, porém, ressalta-se que todos os casos foram de pessoas residentes em zonas rurais ou que tiveram algum contato com a zona silvestre, por motivos de lazer ou trabalho (Instituto em Imunobiológicos - Bio-Manguinhos, 2018).

Com o objetivo de atender à demanda do país nos próximos anos, o MS solicitou a Bio-Manguinhos / Fiocruz, um considerável aumento na produção do número de lotes de vacinas para o ano de 2019. Desde janeiro de 2017, até o momento, foram enviadas 68,9 milhões de doses de vacinas a todas as unidades federadas. Diante deste cenário, Bio-Manguinhos estabeleceu uma parceria com o laboratório Libbs

Farmacêuticas, em São Paulo, a fim de cumprir a meta de aumentar a capacidade de produção da vacina (Instituto em Imunobiológicos - Bio-Manguinhos, 2018).

1.2. Vigilância Sanitária e o Controle de Qualidade

Seguindo estas diretrizes, a VS está diretamente ligada ao SUS, compreendendo um conjunto de atividades que regulamenta, monitora, fiscaliza e controla os processos e os produtos, com o objetivo de manter a confiabilidade e prevenir contra qualquer risco à saúde pública, estando em conformidade dentro das premissas executivas e jurídicas (CARVALHO; MACHADO; TIMM, 2004; BRASIL, 2010).

Criada pela Lei nº 9.782 de janeiro de 1999, a Anvisa, submete suas atividades ao MS como autarquia sob regime especial, sendo sua principal função atuar em todos os setores relacionados a produtos e serviços que possam afetar a saúde da população brasileira, exercendo assim o controle dos produtos que são comercializados (DABKIEWICZ, 2016).

De forma a garantir que as BPF estejam inseridas na “Garantia da Qualidade”, a Anvisa faz uso de suas atribuições que estão estabelecidas na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 17, de 16 de abril de 2010, mostrando os requisitos mínimos de BPF, para que, assim, possa se assegurar que os produtos são produzidos e controlados, com qualidade apropriada para sua principal finalidade e assim garantir o seu registro diante da Anvisa (BRASIL, 2010).

Com o objetivo de estar em conformidade com as especificações estabelecidas segundo a RDC 17/2010, as atividades de controle de qualidade têm a função de estarem presente em todo processo de produção, com o objetivo de desenvolver, validar e implementar procedimentos e protocolos, sempre de acordo com a legislação ambiental. Todo procedimento deve estar escrito, descrevendo e fornecendo instruções para a realização de operações na forma de Procedimento Operacional Padrão (POP), com critérios de aceitação para aprovação de um método analítico de uso na rotina, apresentando as atividades a serem realizadas na validação de um projeto específico (BRASIL, 2010).

A vacina de febre amarela produzida por Bio-Manguinhos, em conformidade com as condições de BPF, é certificada pela Anvisa e pela OMS para suprir a demanda do MS e das Agências das Nações Unidas. De acordo com as recomendações da OMS, devem ser realizados os testes de controle de qualidade nos insumos e matérias-

primas, nas diferentes etapas de produção, até o seu produto final, a fim de garantir a segurança química e microbiológica da vacina, bem como os estudos de estabilidade no produto final (DABKIEWICZ, 2016).

1.3. Impurezas Farmacêuticas

A presença de impurezas, mesmo que em baixas concentrações, podem ser oriundas de diferentes fontes de contaminação. As matérias-primas envolvidas, etapas de síntese de fármaco e o processo de formulação, são exemplos de etapas do processo passivo de contaminação. Mesmo que em baixas concentrações, estas impurezas podem levar a alterações nos princípios ativos de medicamentos, vacinas e fármacos. A qualidade dos produtos farmacêuticos é muito importante para garantir sua eficácia, com isso, as exigências de qualidade em relação ao princípio ativo e ao conteúdo das matérias-primas utilizadas na obtenção dos medicamentos estão descritas na maioria das farmacopeias (USP, Farmacopeia Europeia).

Observa-se que a maior fonte de impurezas é o processo de síntese, onde subprodutos são formados nas reações do processo. É possível identificar as impurezas que podem estar presentes no processo de formulação, mas é necessário certificar-se primeiramente da qualidade das matérias-primas, dos insumos utilizados e da sua estabilidade. Diferentes rotas do meio reacional geram diferentes intermediários, devido a isso a necessidade de diminuição do risco de contaminação deve ser realizada. Entretanto, as impurezas também podem surgir devido ao armazenamento inadequado e por contaminação física. Um exemplo típico são as soluções e suspensões, que são mais propensas à degradação, devido a hidrólise e reações químicas com solventes. Reações que ocorrem, apenas, quando a água ou outro solvente foi utilizado em alguma etapa da produção. De certo, a água contribui com suas próprias impurezas e seguidamente tem capacidade de favorecer reações de hidrólise e catálise metálicas (ASHU; SALONI; NARASIMHAN, 2012).

Sabe-se que em matérias-primas e em soluções intermediárias ao processo de formulação de produtos farmacêuticos, as impurezas são mais comumente encontradas. Sendo assim, a determinação de impurezas em produtos farmacêuticos é um importante ensaio para garantir a qualidade e a segurança dos produtos. Essa importância pode ser evidenciada por meio de diversos livros e artigos, que são publicados sobre o assunto (ASHU; SALONI; NARASIMHAN, 2012).

As impurezas elementares que são mais complexas para serem eliminadas, representam de certa forma para a química analítica, um grande desafio. Pois além de modificarem o princípio ativo do medicamento, ou da vacina também dificultam o desenvolvimento de metodologias. Devido a estes fatos, faz-se necessário um controle mais rigoroso para a detecção desse contaminantes, em cada etapa do processo. Durante as reações de síntese que ocorrem no processo de formulação, a partir de uma molécula podem surgir produtos intermediários, subprodutos e produtos de transformação. Outras impurezas que podem ser relacionadas ao processo de produção são os reagentes e catalisadores, que geralmente são utilizados nas reações de síntese orgânica. Outro fator preponderante é a presença de solventes nos insumos e produtos farmacêuticos (ASHU; SALONI; NARASIMHAN, 2012).

A água, sem dúvida, é o solvente mais utilizado na indústria farmacêutica, muitas vezes não é considerada como passível de contaminação. Entretanto a água dependendo de onde é proveniente, pode afetar a estabilidade dos produtos, vacinas e fármacos, causando reações de hidrólise de grupos susceptíveis. Esses elementos que são indesejáveis, além de apresentarem alta toxicidade, podem modificar propriedades e características físico-químicas de alguns compostos, que podem acarretar em prejuízos na saúde humana. As exigências de qualidade e pureza para matérias-primas são menores do que para insumo, porém não menos importante. É relevante, desde vestígios a quantidades significativas de impurezas, que podem reagir com outros produtos químicos utilizados e por sua vez, afetar a pureza do produto final (ASHU; SALONI; NARASIMHAN, 2012).

A garantia e o controle de insumos farmacêuticos e matérias-primas são questões que devem ser tratadas com a maior atenção, pois são de grande importância no âmbito de análises farmacêuticas, e o maior objetivo de uma indústria farmacêutica é prevenir danos e prejuízo para a sociedade que fará uso das vacinas (MAGGIO et al., 2014).

1.3.1. Classificação de Impurezas

A classificação das impurezas e suas especificações estão disponibilizadas nas guias normativas por diferentes agências regulatórias como a *Food and Drug Administration* (FDA), o *The International Council for Harmonisation of Technical*

Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) e a *European Medicines Agency (EMA)*.

As impurezas farmacêuticas podem ser definidas como qualquer componente que esteja presente na formulação do fármaco, além da substância ativa dos incipientes as impurezas podem estar presentes em todas as etapas de produção da vacina, de soluções ao produto final. As impurezas são classificadas nas seguintes categorias:

- Impurezas orgânicas
- Impurezas Inorgânicas
- Solventes residuais

As impurezas orgânicas podem surgir em processo de síntese que incluem matérias-primas, subprodutos, intermediários, produtos de degradação, e reagentes. Com um estudo científico é possível prever as substâncias que possam ocorrer no meio reacional, com base nas reações e condições em que a síntese ocorre (VENKATESAN; VALLIAPPAN, 2014).

Já as impurezas inorgânicas podem ser resultadas dos processos produtivos, que normalmente são conhecidos e facilmente identificados, como reagentes, catalisadores, metais pesados, sais inorgânicos entre outros. Sendo assim, podem ser detectadas e identificadas por métodos, como espectrometria de absorção atômica com chama (*Flame Atomic Absorption Spectrometry, FAAS*) e a espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (*Direct Current Plasma Optical Emission Spectrometry, DSS-GF AAS*).

Esta contaminação pode acarretar alterações no princípio ativo da vacina ou medicamento, que pode causar danos à saúde dos usuários. De maneira geral, a determinação de impurezas elementares em medicamentos ou substâncias para uso farmacêutico visa observar a composição química das amostras, considerando os limites especificados para os elementos de interesse. O controle de metais em fármacos é importante, pois muitas destas substâncias são empregadas em tratamentos de uso contínuo (EUROPEIAN PHARMACOPEIA, 2017).

Para realizar um procedimento de referência de análise para elementos, a farmacopeia europeia é a monografia de referência utilizada por Bio-Manguinhos, e será utilizada no desenvolvimento deste trabalho. A Farmacopeia nos orienta que é necessário conhecer as características da matéria-prima ou insumo de interesse, para que possam ser definidos, de maneira adequada, a preparação da amostra, a técnica de detecção e os parâmetros analíticos do instrumento. A monografia utilizada, lista

as técnicas espectrométricas de medição para determinação de impurezas elementares, porém para a realização deste projeto, e de acordo com os equipamentos que Bio-Manguinhos dispõe, o mesmo só poderá ser realizado por uma das técnicas em destaque, listadas a seguir:

Espectrometria de Emissão Atômica – AES

Espectrometria de Absorção Atômica – AAS

Espectrometria de Fluorescência de raios X – XRFS

Espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado – ICP-AES

Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado – ICP-MS

Portanto, a importância do desenvolvimento de metodologias para a quantificação de metais presentes, como impurezas, em produtos farmacêuticos pode ser demonstrada pelos diversos trabalhos publicados sobre este assunto. Marguí e colaboradores (2009) propuseram um procedimento para a determinação de Cr, Fe, Ni e Zn em princípios ativos farmacêuticos, através de X-XRFS com dispersão em comprimento de onda (WDXRF). Chuang e colaboradores (2000) desenvolveram uma metodologia para a determinação de Pb, Cd, As, Hg, Cu, Co e Mn em diversas plantas medicinais chinesas, utilizando diferentes técnicas espectrométrica FAAS; GFAAS; Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Hidretos – HGAAS; Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor Frio – CVAAS. No trabalho proposto por BOLZAN e colaboradores (2007) foram determinados Cd e Pb em suplementos de cálcio, usando ICP-MS, FAAS, GFAAS e voltametria de redissolução anódica (ASV).

1.3.2. Especificações para Impurezas

Sabe-se, portanto, que, a necessidade para o controle e monitoramento de impurezas farmacêuticas está baseada em razões éticas e econômicas, bem como questões de segurança e eficácia do produto. Em conformidade com as guias do ICH, devem ser inclusas especificações para cada elemento que é considerado impureza para um determinado insumo ou matéria-prima, e também o total de impurezas e produtos de degradação. Os limites de alerta para a notificação e o controle das

impurezas são propostos, com base na dose máxima diária do insumo farmacêutico ativo presente no produto. Qualquer impureza encontrada acima do limite de notificação, bem como as impurezas totais encontradas devem ser analisadas por procedimentos analíticos adequados. No Brasil, a Anvisa publicou em 2013 a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) número 58 que estabelece parâmetros para a verificação de produtos de degradação em medicamentos, para a notificação, identificação e qualificação desses produtos, conforme Tabela 2. Esta resolução é válida para substâncias ativas e semissintéticas novas, genéricas e similares, também para a renovação de registro de alterações pós-registro. Os limites estabelecidos são os mesmos estabelecidos pelo ICH.

Tabela 2: Limites de notificação, identificação e qualificação de produtos

| Limites de Notificação | |
|---------------------------------|-------------------------------------|
| Dose máxima diária ¹ | Limites ² |
| < ou = 1 g | 0,1% |
| >1 g | 0,05% |
| Limites de identificação | |
| Dose Máxima Diária | Limites |
| < 1 mg | 1,0% ou 5 µg ITD, o que for menor |
| 1 mg – 10 mg | 0,5% ou 20 µg ITD, o que for menor |
| >10 mg – 2 g | 0,2% ou 2 mg ITD, o que for menor |
| > 2 g | 0,10% |
| Limites de quantificação | |
| Dose Máxima Diária | Limites |
| < 10 mg | 1,0% ou 50 µg ITD, o que for menor |
| 10 mg – 100 mg | 0,5% ou 200 µg ITD, o que for menor |
| >100 mg – 2 g | 0,2% ou 3 mg ITD, o que for menor |
| > 2 g | 0,15% |

1. Quantidade máxima de insumo farmacêutico ativo administrado por dia.

2. Os limites dos produtos de degradação são expressos como percentagem do insumo farmacêutico ativo, ou como ingestão total diária (ITD) de um produto de degradação.

1.4. Técnicas Analíticas para Determinação de Impurezas

A presença de impurezas em insumos, matérias-primas e produtos de origem farmacêutica devem ser avaliados qualitativa e quantitativamente, e com isso um rigoroso controle de qualidade é muito importante no desenvolvimento de medicamentos e vacinas. Sabe-se que o pilar de uma indústria farmacêutica, no aspecto de análises, são as farmacopeias que norteiam esse campo, por isso a cada produto, exige uma técnica com análises específicas de acordo com as características de cada produto, levando-se em consideração cada elemento que seja considerado como impureza. Geralmente, impurezas orgânicas são analisadas a partir de técnicas cromatográficas devido a capacidade de alta resolução e a possibilidade de utilizar diferentes detectores, que permitem a determinação precisa dessas substâncias (Brasil, 2010; ICH, 2014).

Entre as impurezas descritas nas farmacopeias, encontram-se as impurezas inorgânicas, cujo o principal foco seria a contaminação por metais pesados, antiga nomenclatura das farmacopeias. As atualizações recentes trazem, hoje, o nome do elemento como a identificação do teste a ser realizado. O limite dos metais considerados como impurezas ou contaminantes presentes nos insumos e matérias-primas é, normalmente, definido por agências reguladoras, as quais empregam ensaios semiquantitativos e não seletivos de precipitação de sulfetos metálicos (TEASDALE; ELDER; NIMS, 2018).

Os ensaios limites para contaminantes, descrito nas principais farmacopeias empregam soluções de sulfeto de hidrogênio ou tioacetamida, que produzem precipitados coloridos cuja intensidade de coloração, ou desenvolvimento de turbidez é comparado visualmente com uma solução referência conhecida de chumbo. Portanto, os elementos que normalmente respondem ao antigo ensaio limites de metais pesados são Arsênio (As), Prata (Ag), Bismuto (Bi), Cobre (Cu), Cadmio (Cd), Mercúrio (Hg), Molibdênio (Mo), Chumbo (Pb), Antimônio (Sb) e Estanho (Sn) (ICH, 2014).

Entretanto, o teste de ensaio limites de metais pesados apresenta uma limitação em apenas passar uma informação semiquantitativa, pois o desenvolvimento de coloração será proporcional aos precipitados formados de todos os elementos que podem ocorrer nas situações citadas. Deste modo, os testes trazem consigo uma informação incompleta, pois não informam qual elemento está contribuindo com o

desenvolvimento de cor ou turbidez ou opalescência na solução contendo a amostra, e nem com a concentração individual destes contaminantes (ICH, 2014).

Sabe-se também que o teste depende de acuidade visual do analista, pois a detecção é feita por comparação direta com uma solução de referência conhecida, uma vez que a comparação pode ser influenciada por erros do analista ou mesmo pela luminosidade do ambiente. Este teste é específico nas farmacopeias para o grupo de elementos citados anteriormente, porém com as atualizações das farmacopeias houve o desmembramento do teste, tendo como o principal o teste de As, devido a sua alta toxicidade por ser considerado um elemento carcinogênico. Outros elementos importantes sob o aspecto toxicológico, como é o caso do cromo, não respondem a este teste. Além do que os reagentes tioacetamida e sulfeto de hidrogênio são tóxicos e instáveis, devendo ser preparados no momento em que será realizado a análise (SOUSA, 2015).

Diante disto, a baixa seletividade e sensibilidade dos métodos oficiais para impurezas inorgânicas em medicamentos e vacinas, é de grande relevância o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de metais. E quando descritos em farmacopeia é necessário a implementação da técnica o quanto antes, a fim de que seja confirmado a baixa concentração do contaminante, para que possa se garantir a segurança dos produtos finais para o consumo humano (SOUSA, 2015).

Existem muitos artigos que relatam a utilização de várias técnicas instrumentais para que se tenha uma eficiência no controle de qualidade dos insumos que entram diretamente na formulação do produto, ou das matérias-primas que entram em algum dos muitos processos de formulação. De certo, sabe-se que nem todas as indústrias, possuem todas as técnicas analíticas descritas nas farmacopeias disponíveis em seus laboratórios, pois isso envolvem questões de capital financeiro. Mas há uma necessidade de que os resultados obtidos em laudos analíticos tragam uma resposta rápida e eficaz, ao se tratar da determinação de um produto (MULLER, 2014, SOUSA, 2015).

Portanto, para as indústrias do ramo farmacêutico faz-se necessário que a atualização de suas técnicas de análises seja constantemente atualizada em conformidade com as farmacopeias que as mesmas se baseiam. Dentre as técnicas sugeridas, está a FAAS a qual será discutida nesse trabalho, pois com a realidade do laboratório é a técnica que se encontra disponível. A aplicação convencional desta técnica, geralmente, requer o preparo da amostra, o qual pode envolver o processo

de digestão ácida ou diluição da amostra em solvente (MULLER, 2014, SOUSA, 2015).

A amostragem direta de sólidos empregando a FAAS é uma boa alternativa na determinação de metais, principalmente quando estes encontram-se em baixa concentração, ou quando a amostra for de difícil decomposição. Além do baixo limite de detecção, esta técnica apresenta vantagens como menor risco de perda de analito e de contaminação de amostra, e baixo consumo de reagentes tóxicos.

Métodos apropriados, validados e específicos devem ser usados na determinação de cada metal em suas variadas formas, cujos os metais podem estar em formas diferentes do que a forma original utilizada como catalisador ou reagente. Procedimentos estabelecidos para a determinação de metais residuais estão descritos nas farmacopeias. Caso estejam utilizados apenas metais da classe 2 ou classe 3, podem ser utilizados métodos não específicos (BRASIL, 2010; MACHADO 2012).

1.5 MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS

Os métodos espectrométricos constituem um vasto campo analítico, baseados na espectrometria atômica e molecular, onde o termo espectroscopia é um termo geral empregado para caracterizar a ciência, que trata das interações moleculares dos diversos tipos de radiação com a matéria. Há relatos históricos que as interações de interesse eram aquelas entre a radiação eletromagnética e a matéria, no entanto, atualmente a espectroscopia tem sido ampliada e inclui interações entre matéria e outras formas de energia. A espectrometria e os métodos espectrométricos referem-se à medida da intensidade de radiação com um condutor fotoelétrico ou com outro tipo de dispositivo eletrônico. Os métodos espectrométricos mais amplamente utilizados estão baseados na radiação eletromagnética, a qual é um tipo de energia que toma diversas formas, as mais prontamente reconhecíveis são a luz e o calor radiante. As manifestações menos frequentes incluem os raios gama e os raios X, bem como, a radiação ultravioleta de micro-ondas e de radiofrequência (EUROPEIAN PHARMACOPEIA, 2017).

1.5.1. Espectrometria de Absorção Atômica

A espectrometria de absorção atômica é utilizada para a determinação de diversos elementos da tabela periódica, principalmente metais e consiste, basicamente, de

quatro técnicas: F AAS, HG AAS, CV AAS e GF AAS (SKOOG, 2008; EUROPEAN PHARMACOPEIAN, 2017).

A partir da década de sessenta, a técnica e os equipamentos de Espectrometria de Absorção Atômica adquiriram uma importância de elevada relevância, devido à busca por parte de grupos de investigação interessados na determinação de metais. Com isso, ocorreu a implementação da técnica nos laboratórios de análise de rotina.

Vale salientar que a Espectrometria de Absorção Atômica foi um dos métodos que mais contribuiu para o desenvolvimento da química analítica. De referir, que nos progressos mais relevantes da técnica, a fabricação de queimadores para a utilização de mistura de acetileno e óxido nitroso (C_2H_2 / N_2O) (atingindo temperaturas na ordem dos $3200^\circ K$, temperaturas mais elevadas alcançadas com as misturas gasosas) foi o fundamental para o progresso impulsionador da chama para a análise de metais pesados (SKOOG; WEST; HOLLER; CROUCH, 2006; EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2017).

Vale salientar que a evolução que foi observado da técnica, não está somente relacionado somente ao avanço tecnológico, mas também a busca necessária para os problemas que vinham surgindo com o passar dos anos. Com as necessidades da indústria, da saúde, da tecnologia surgidas imediatamente pós-segunda guerra mundial, onde passou-se a exigir limites de detecção dia pós dia mais baixos, equipamento adaptado a realização de medidas nas próprias linhas de produção, entre outros (SKOOG; WEST; HOLLER; CROUCH, 2006; EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2017).

Por todas estas razões, o controle analítico de alguns metais, como por exemplo o Pb, Fe, Ni, e As, que devem ser analisado por um método que tenha uma sensibilidade de ordem de grandeza por partes por milhão (ppm). Mesmo com algumas dificuldades que possam surgir, durante a análise, devido às características dos elementos à concentrações muito baixas, isso nos leva a ter um controle muito mais rígido.

A alta seletividade e a boa precisão são alguns aspectos positivos da Espectrometria de Absorção Atômica, mas como se sabe que todas as técnicas possuem seus limitantes, esta não seria diferente. Uma das mais relevantes limitações da técnica é que não nos permite determinar mais do que um elemento de cada vez. Para que ocorra a determinação de elementos distintos, (SKOOG; WEST; HOLLER; CROUCH, 2006; EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2017).

1.5.2. Espectrometria de Absorção Atômica por Chama (FAAS)

A FAAS utiliza como fonte de radiação lâmpadas específicas para cada elemento de interesse, o que torna a técnica altamente seletiva e dispensa o uso de monocromadores de alta resolução. Apresentando ainda algumas outras vantagens, além de apresentar reduzido número de interferências espectrais ocasionadas por sobreposição de linhas de outros elementos (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2017).

Sabe-se que assim como as vantagens, todas as técnicas também têm suas limitações, não sendo diferente na espectrometria de absorção atômica por chama, onde entre as limitações inerentes, a mais frequente é o fato de ser uma técnica que determina um elemento por vez, o que torna o procedimento relativamente repetitivo e tedioso, tendo em vista um grande volume de amostra e elementos que devam ser analisados. Com isso, a técnica requer uma variedade de lâmpadas (de certo, uma para cada elemento), que têm tempo de vida limitadas (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2017).

Entretanto, têm-se por convicção que a maior limitação desta técnica tem sido o fato de absorção ser medida apenas sobre intervalos espectrais consideravelmente estreitos, sendo correspondentes à largura da linha atômica emitida pela fonte de radiação, o que deixa ainda mais restrito a informação sobre ambiente espectral (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2017).

1.5.2.1. Processo de Atomização

Na FAAS, a amostra é introduzida com a mistura de gases que alimentam a chama produzida pelo queimador laminar, ou seja, em um atomizador de chama a solução amostra é nebulizada por um fluxo de óxido gasoso, misturada com um combustível gasoso, e levada à chama onde ocorre a atomização (SKOOG; WEST; HOLLER; CROUCH, 2006).

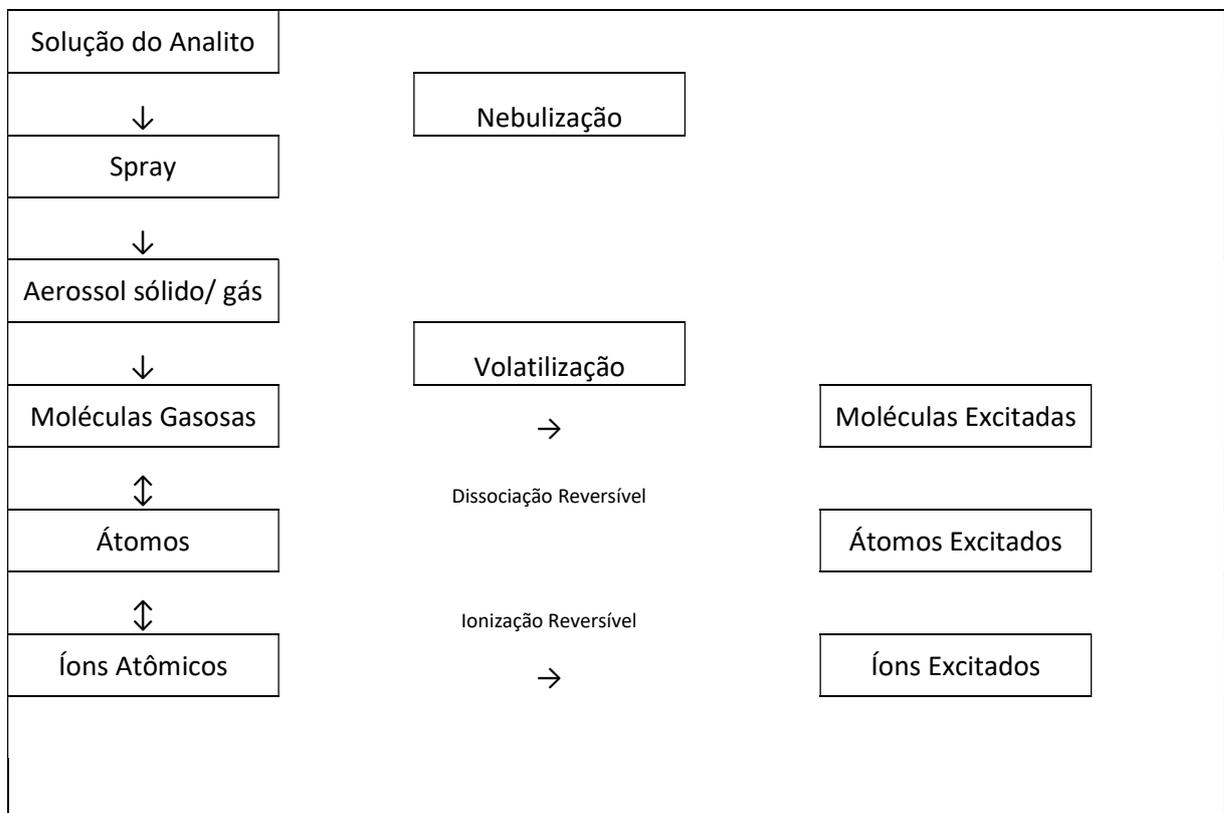
Com o intuito de diminuir as elevadas perdas de amostras durante o processo de nebulização há pouco tempo de permanência dos átomos na chama, isso faz com que condicionem drasticamente a sensibilidade do método, tornando-o inadequado para aplicações quantitativas em micrograma por litro (μgL^{-1}).

A Figura 1 mostra detalhadamente os processos que ocorrem com amostra que são intimamente ligados. A primeira etapa é a dessolvatação, onde o solvente evapora produzindo um aerossol de partículas extremamente pequenas. A dissociação da maior

parte das moléculas resulta em um gás atômico, deste modo ocorre também a geração dos cátions e elétrons (SKOOG; WEST; HOLLER; CROUCH, 2006).

Sabe-se que outros átomos e moléculas são produzidos na chama, que são resultados de interações do combustível com o oxidante e com os vários elementos que possam estar presentes na amostra, mesmo que em quantidades muito pequenas. Com a ocorrência de simultâneos processos ocorrendo, a atomização torna-se a etapa mais crítica.

Figura 1. Etapas que ocorrem na amostra durante análise por espectrometria de absorção atômica por chama.



Fonte: (Próprio Autor)

Este método apresenta, portanto, algumas limitações na precisão e limites de detecção, relativamente altos para algumas aplicações. Para concentrações na faixa de μgL^{-1} , o forno de grafite mostra-se mais preciso devido a sua sensibilidade.

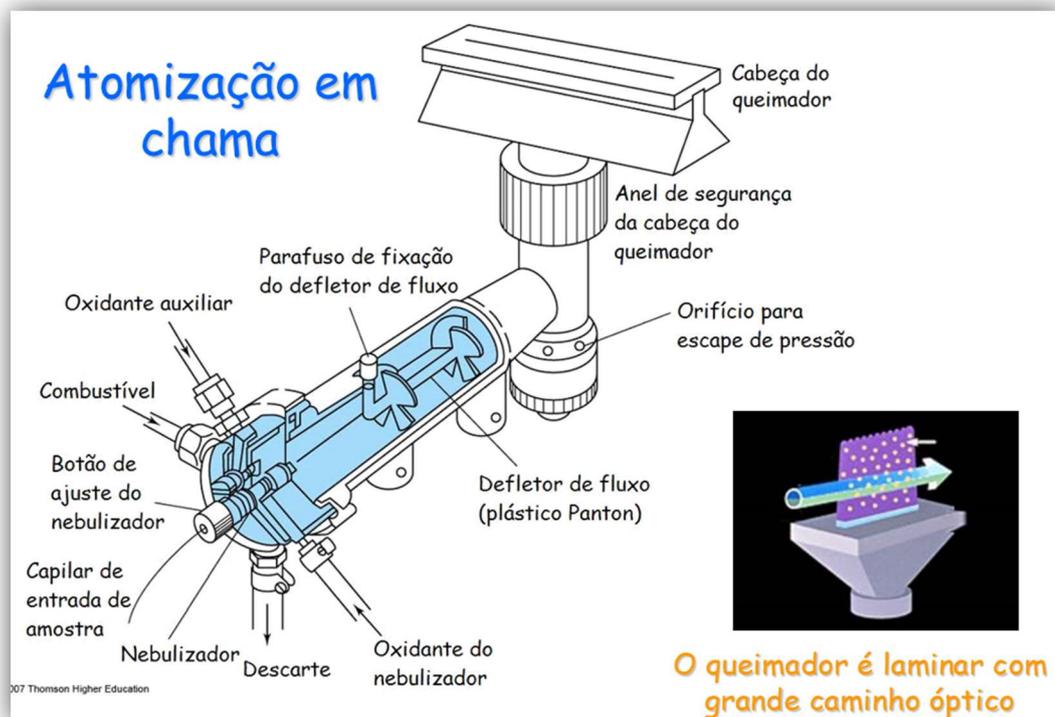
1.5.2.2. Instrumentação

Um instrumento de Absorção Atômica é constituído por vários sistemas instrumentais, tais como: sistema de emissão de seleção ou fonte de radiação,

sistema de absorção ou suporte para amostra, sistema de seleção ou um seletor de comprimento de onda e o sistema de detecção ou registro ou um detector e um processador de sinais e um dispositivo de saída.

Os instrumentos de Absorção Atômica são bem parecidos entre si, sendo as principais diferenças entre si a fonte e a célula de absorção A Figura 2 mostra o esquema de atomização em chama.

Figura 2. Atomizador em chama



Fonte: <https://pt.slideshare.net/diegoarica/componentes-ticos-em-espectroscopia>

1.5.2.3. Tipos De Chama

O Quadro 1, lista os principais tipos de combustível e oxidantes empregados em FAAS, e suas respectivas faixas de temperaturas, que são obtidas através dessas misturas. Observa-se entre a faixa de 1700°C a 2400°C são obtidas com vários combustíveis, quando o ar atua como oxidante. Ou seja, com essas temperaturas as amostras são atomizadas e se decompõe com maior facilidade. Para amostras refratárias, devem ser empregados outros oxidantes, tais como, oxigênio ou óxido nítrico. Com combustíveis comuns, esses oxidantes produzem temperaturas na faixa dos 2500°C a 3100°C de acordo com SKOOG, (2006).

Quadro 1. Propriedades da chama em espectrometria de absorção atômica (Adaptado de SKOOG, (2006).

| Combustível | Oxidante | Temperaturas (°C) | Velocidade Máxima de Queima (cm. S-1) |
|--------------------|-----------------|--------------------------|----------------------------------------------|
| Gás Natural | Ar | 1700-1900 | 39-43 |
| Gás Natural | Oxigênio | 2700-2800 | 370-390 |
| Hidrogênio | Ar | 2000-2100 | 300-440 |
| Hidrogênio | Oxigênio | 2550-2700 | 900-1400 |
| Acetileno | Ar | 2100-2400 | 158-266 |
| Acetileno | Oxigênio | 3050-3150 | 1100-2480 |
| Acetileno | Óxido Nitroso | 2600-2800 | 285 |

Fonte: (Próprio Autor)

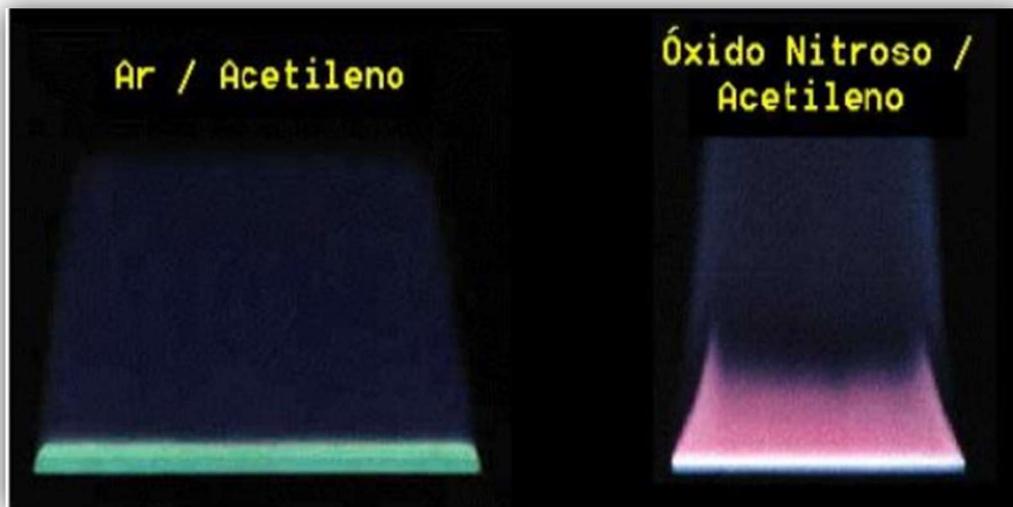
Observa-se que a velocidade da queima da chama é de extrema importância devido a estabilidade em determinados intervalos de fluxos de gás. Se o fluxo de gás não excede a velocidade da queima, a chama se propaga retornando ao queimador causando um fenômeno chamado de *flashback*. Se há aumento do fluxo, a chama cresce até atingir um ponto acima do queimador onde o fluxo de gás e a velocidade de queima se mostram iguais. Com isto, nessa região, as chamas tornam-se estáveis.

Com fluxos mais altos, a chama aumenta e eventualmente atinge um ponto onde ela explode fora do queimador. Essas condições confirmam a importância do controle do fluxo da mistura combustível / oxidante. Este fluxo é altamente dependente do tipo de combustível e oxidante que estão sendo usados (Holler, Nieman e Skoog (2002).

1.5.2.4. Estrutura da Chama

A estrutura da chama apresenta várias regiões importantes, como por exemplo a zona de combustão primária, a região entre zonas, a zona de combustão secundária, como mostrados na Figura 3. Em cada região pode-se encontrar distintas aparências e vários tamanhos, isso ocorre devido ao tipo de combustível ou oxidante utilizado (SKOOG; WEST; HOLLER; CROUCH, 2006).

Figura 3. Estrutura da chama em combustível na espectrometria de absorção atômica



Fonte: <http://www.ufjf.br/quimica/files/2016/08/ESPECTROMETRIA-DE-EMISS%C3%83O-AT%C3%94MICA-e-ABSOR%C3%87%C3%83O-AT%C3%94MICA-2017.pdf>

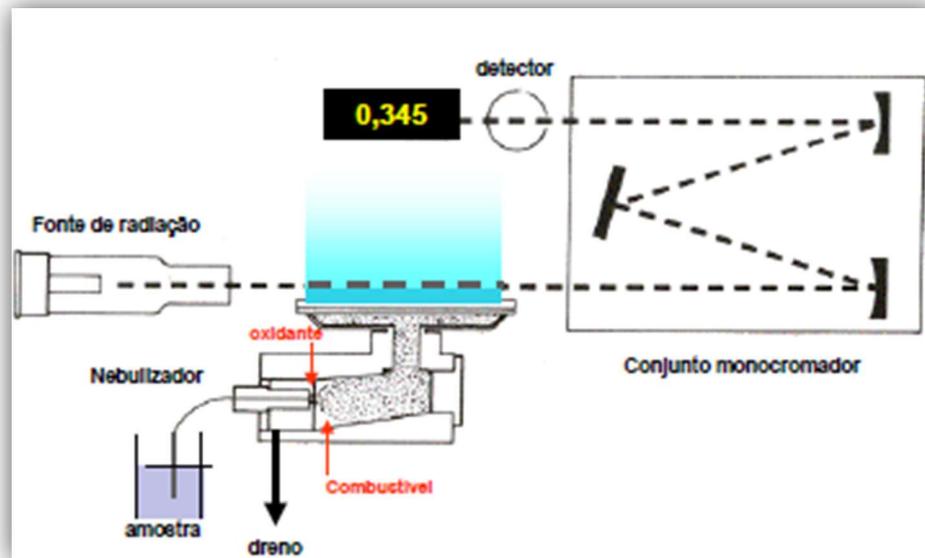
1.5.2.5. Atomizadores de Chama

O atomizador é fundamental, pois neste dispositivo serão gerados os átomos gasosos no estado fundamental, que absorverão a radiação de comprimento de onda característico proveniente da fonte de radiação, e, conseqüentemente, a determinação da concentração do elemento de interesse.

O nebulizador pneumático, atuando pela ação de fluxo de gás comprimido, aspira solução da amostra do seu recipiente e esta é nebulizada na forma de aerossol (gotículas dispersas em gás) em uma câmara de nebulização, onde a amostra é introduzida na chama, e uma parte é descartada. A dessolvatação ocorre com a evaporação do solvente das gotículas na chama, produzindo um aerossol seco (suspensão de partículas sólidas ou fundidas soluto). Em FAAS, a atomização, isto é, a conversão da espécie volatilizada em átomos livres, deverá ser a maior possível para a obtenção do máximo sinal.

A função primordial do nebulizador é formar um aerossol da solução aquosa que se deseja analisar, pois esse aerossol é constituído por pequenas gotículas que entram na câmara de nebulização, e chegam ao queimador arrastado pelos gases combustível e oxidante. A Figura 4 mostra um esquema de um espectrômetro de absorção atômica com chama e seus principais componentes.

Figura 4. Esquema de Espectrômetro de Absorção Atômica com chama



Fonte: <https://pt.slideshare.net/silvanaboacinafreitas/absorcao-versus-emissao>

1.6. VALIDAÇÃO

A qualidade das medições em análises químicas quantitativas tem sido cada vez mais exigida, principalmente quando se trata de vacinas e medicamentos, que têm suas matrizes complexas, o que reflete em diferença nas análises laboratoriais, sendo necessário o desenvolvimento de métodos analíticos que sejam simples, eficazes e de baixo custo. O controle de qualidade de produtos farmacêuticos reúne um conjunto de medidas que são destinadas a testar e verificar a qualidade de cada lote de vacina, a fim de que obedeçam às normas de atividade de pureza e eficácia. Os estudos para a validação de método é parte essencial de BPF, garantindo o cumprimento dos pré-requisitos, sendo todo o processo conduzido por protocolos pré-definidos e aprovados. De acordo com a 9ª Edição da farmacopeia europeia (2017), antes do uso inicial do procedimento de determinação de contaminantes, deve-se assegurar que a preparação da amostra e o método de determinação para o elemento de interesse sejam apropriados, com isso faz-se necessário que aja um plano de desenvolvimento para o processo de validação (European Pharmacopeian, 2017). De maneira geral, resume-se em um planejamento de todas as atividades a serem desenvolvidas com objetivos, prazos e responsabilidade bem definidos (RDC 17/2010; RDC 166 da ANVISA, BRASIL, 2017).

A Quadro 2 relaciona alguns órgãos ou comitês reguladores nacionais e internacionais, com seus respectivos guias de validação.

Quadro 2 – Documentos de validação de órgãos nacionais e internacionais

| Publicação | Documento | Publicação | Publicação |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------------|-------------------|
| CODEX | <i>Guidelines on Good Laboratory Practice in Residue Analysis</i> | CAC/GL 40-1993 | 2003 |
| ANVISA | Validação de Métodos Analíticos | RDC Nº 166 de 24/07/2017 | 2017 |
| INMETRO | Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos | DOQ-CGCRE-008 Revisão 09 | 2020 |

Fonte: (CODEX, 2003; ANVISA, 2017; INMETRO 2020)

As definições de validação, o grupo que é aplicável e os parâmetros que são preconizados por cada um desses órgãos estão na Quadro 3.

Quadro 3 – Definições, aplicação e parâmetros de validação de alguns dos principais órgãos (nacionais).

| Publicação | Definição | Aplicação | Parâmetros de Validação |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ANVISA | Avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos | Insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos biológicos | Seletividade Linearidade Efeito Matriz Faixa de Trabalho Precisão Exatidão LOD LOQ Robustez |
| INMETRO | Fornecimento de evidência objetiva de que um dado item satisfaz requisitos especificados, como, por exemplo, a confirmação de que as propriedades relativas ao desempenho ou aos requisitos legais são satisfeitas por um sistema de medição | Laboratórios acreditados ou postulantes à acreditação e aos avaliadores e especialistas na área de laboratórios de ensaios | Seletividade Linearidade Faixa de Trabalho Faixa linear de trabalho Sensibilidade LOD LOQ Recuperação Precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade) Robustez* |

Fonte: (BRASIL, 2017; INMETRO, 2020)

1.6.1. Seletividade/Especificidade

De acordo com a definição do documento guia do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), seletividade é uma característica do método a fim de garantir que não haja interferentes que possam ser identificados e/ou quantificados juntos com o analito de interesse. Para a avaliação da seletividade, de acordo com o encontrado na literatura, os ensaios devem ser com o material de referência certificado, incluindo amostras com e sem o analito e a avaliação de quanto o método é capaz de identificar o analito de interesse na presença de interferentes, tais como, impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2017; INMETRO, 2020).

1.6.2. Efeito Matriz

Efeito matriz é definido como a influência de uma ou mais substâncias vindas da amostra que interferem na concentração do analito de interesse, podendo levar a um aumento ou diminuição da resposta quando comparado com a resposta produzida pelo analito em solvente (INMETRO, 2020).

1.6.3. Linearidade

É a capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra, ou seja, em um intervalo de concentração estabelecida (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2017).

O INMETRO recomenda para avaliação da linearidade tenha no mínimo 5 níveis obtidos pela curva analítica, com no mínimo triplicatas de cada nível (INMETRO, 2020).

De acordo com Souza; Junqueira (2005) sugere que para análise da linearidade deve ser realizada através dos seguintes testes estatísticos, critérios para aceitação dos resultados dos testes:

- Normalidade dos resíduos – Teste de Ryan – Joiner
- Homogeneidade dos resíduos – Teste de Brown – Forsythe
- Autocorrelação dos resíduos – Teste de Durbin – Watson

E a equação 1 da reta deve relacionar duas variáveis indicadas na equação a seguir.

$$Y = bx + a$$

Equação 1

Onde:

Y = valor da variável dependente (absorvância);

x = Valor da variável independente (concentração);

b = declividade da reta ou coeficiente angular;

a = representa o intercepto da reta ou coeficiente linear.

1.6.4. Precisão

É a proximidade das medições obtidas por repetidas aferições de múltiplas alíquotas de uma única fonte de matriz. Geralmente, deve ser investigada entre série de replicatas genuínas obtidas de uma amostra homogênea, e determinada para circunstâncias específicas, onde pode ser considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

- a) A repetibilidade expressa a concordância entre resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e a mesma instrumentação. Consiste, em no mínimo, 9 determinações, que estejam dentro da faixa do método, ou seja, 3 concentrações baixas, médias e altas, com 3 replicatas cada ou, no mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste (BRASIL, 2017; INMETRO 2020).
- b) A precisão intermediária de um método analítico pode ser expressa como a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, entretanto com uma variação, resultados obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes (ICH, 2005)
- c) Reprodutibilidade: Ocorre com resultados de laboratórios diferentes como se fosse um estudo colaborativo, geralmente são aplicados à padronização de metodologia analítica, como por exemplo para a inclusão em farmacopeias (ICH, 2005).

Usualmente a precisão é expressa pela variância, desvio padrão ou o coeficiente de variação de uma série de medições (ICH, 2005).

1.6.5. Limite de Detecção e Quantificação

Considera-se o limite de detecção a menor concentração em que o analito pode ser detectado, entretanto o limite de quantificação está diretamente relacionado com a mais baixa concentração que o analito poderá ser quantificado com aceitáveis exatidão e precisão.

1.6.6. Robustez

Uma medida de um procedimento analítico de não ser afetado por variações pequenas, mas deliberadas nos parâmetros do método e fornece uma indicação de sua confiabilidade durante o uso normal (ICH, 2005). A robustez é um procedimento opcional, normalmente realizado previamente à validação do método, na etapa de otimização (INMETRO, 2020).

2. OBJETIVOS

Propor um método de análise para a determinação de Fe, Pb, Ni e As que são preconizados nas farmacopeias, como impurezas, para insumos farmacêuticos: gelatina, glutamato de sódio e sorbitol da vacina de febre amarela, a fim de suprir a demanda de análises de contaminantes por teste mais rápidos, mais eficazes em seus resultados.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar, escolher e otimizar a melhor metodologia de preparo para análise de impurezas em insumos farmacêuticos: gelatina, glutamato de sódio e sorbitol;
- Determinar os teores de impurezas em insumos: gelatina, glutamato de sódio e sorbitol da vacina de febre amarela;

3. METODOLOGIA

3.1. Materiais, Reagentes e Equipamentos

Os materiais utilizados para o desenvolvimento do estudo apresentaram-se em perfeito estado de uso, com suas qualificações e verificações diárias dentro do estabelecido por norma. Os padrões dos elementos Fe, Pb, Ni e As de interesse de análise foram utilizados levando-se em consideração o fornecedor e validade. Como a técnica é mono elementar, utilizou-se os padrões conforme os elementos analisados, que para os insumos escolhidos, a farmacopeia preconiza análise desses contaminantes. O Quadro 4 resume as informações.

Quadro 4. Informações de Padrões e Equipamentos utilizados na análise de contaminantes inorgânicos em vacinas contra febre amarela.

| PADRÕES UTILIZADOS | | | | |
|-----------------------------------|----------------|------------|----------------|------------|
| PADRÃO | FERRO | CHUMBO | NÍQUEL | ARSÊNIO |
| FORNECEDOR | MERCK | MERCK | MERCK | MERCK |
| LOTE FORNECEDOR | HC73093126 | HC73335972 | HC74848536 | HC712849 |
| VALIDADE | 30/06/2020 | 31/07/2021 | 31/12/2020 | 28/02/2022 |
| EQUIPAMENTOS UTILIZADOS | | | | |
| BALANÇA ANALÍTICA | METTLER TOLEDO | TAG W1233 | VAL.: MARÇO/20 | |
| ESPECTROMETRO DE ABSORÇÃO ATÔMICA | Analytik Jena | | NovAA 300 | |

Fonte: (Próprio Autor)

3.1.1. Condições analíticas do espectrofotômetro de absorção atômica

Foram observados inicialmente as condições sugeridas pelo equipamento, e posteriormente foram feitas as adaptações necessárias para cada elemento de acordo com as especificações

3.2. Amostras

As amostras que foram analisadas são os insumos utilizados para produção da VFA. Foram eles gelatina, glutamato de sódio e sorbitol.

3.3. Elementos avaliados

Neste estudo, foram analisados os elementos Chumbo (Pb), Ferro (Fe), Níquel (Ni), e Arsênio (As), que são tratados como contaminantes para os insumos e matérias-primas.

3.4. Amostragem

A amostragem foi baseada na *International Organization for Standardization* (ISO) 2859, para os materiais que são recebidos em Bio-Manguinhos, por intermédio do almoxarifado.

3.5. Lavagem de Materiais

À Seção de Preparo de Materiais (SEPRM) do Departamento de Controle de Qualidade (DEQUA) é responsável pelo processo de lavagem dos materiais utilizados pelas Unidades Operacionais (UOs). Existe, portanto, um formulário padrão, onde todas as UOs devem fazer o pedido de tratamento de material, através deste formulário devidamente preenchido e entregue juntamente com o material a ser lavado (PBP1317_002MAN).

Ao dar início no procedimento de lavagem, a SEPRM utiliza sabão neutro Extran 2,0% por dentro e por fora do material, quando aplicável. Esta solução é preparada no início da jornada de trabalho e descartado ao final. Posteriormente, o material contendo o sabão neutro é enxaguado com água ultrapura (PW) até que todo excesso de sabão neutro do material seja retirado, e após lavagem com água corrente purificada quente (WFI). Após, os materiais são levados para secagem em forno, à temperatura de 50°C a 60°C, por aproximadamente 1 hora ou até certificar-se que os materiais estejam totalmente secos. Toda vidraria e todo material utilizado, durante os testes, foram imersos durante 24 horas em ácido nítrico a 10%; posteriormente, o material foi enxaguado exaustivamente, com PW. Após o processo de lavagem, o material foi levado para secar em estufa (Documento interno PBP1317_002MAN).

3.6. Preparo das Soluções

O preparo das soluções teste e padrão foi realizado no momento da análise, portanto, isso nos garantiu estabilidade das soluções.

O preparo dos padrões de Fe, Pb, Ni e As foi realizado partindo-se de uma solução de concentração conhecida (1000 mgL^{-1}), a fim de que, fosse preparado uma nova solução intermediária de concentração (100 mgL^{-1}). Para a realização dos testes, a solução intermediária preparada também no momento do teste será a solução onde ocorrerá a diluição dos padrões para concentrações mais baixas. Todos os padrões são dos elementos individuais e foram obedecidas as orientações criteriosamente do fornecedor MERCK.

Para a diluição dos padrões, utilizou-se a fórmula de diluição ($C_1V_1=C_2V_2$, equação 2).

Onde, C_1 e V_1 , são respectivamente concentração inicial e volume a ser tomado desta solução, ou seja, solução intermediária. E C_2 e V_2 , que é a concentração e o volume a que se quer chegar. O Quadro 5 resume de forma clara os materiais volumétricos utilizados, identificação e prazo de validade de cada padrão.

Quadro 5. Preparo dos padrões utilizados na análise de contaminantes inorgânicos em vacinas contra febre amarela em F AAS.

| Equipamento | Identificação | Validade | Elemento |
|------------------------------------------|----------------------|-----------------|-----------------|
| Pipeta volumétrica 1000 μL | TAG V0231 | Janeiro de 2020 | |
| Balão Volumétrico 50 mL | TAG V3427 | Janeiro de 2020 | Arsênio (As) |
| Balão Volumétrico 50 mL | TAG V4327 | Janeiro de 2020 | Chumbo (Pb) |
| Balão Volumétrico 50 mL | TAG V7026 | Janeiro de 2020 | Ferro (Fe) |
| Balão Volumétrico 50 mL | TAG V1027 | Janeiro de 2020 | Níquel (Ni) |

Fonte: (Próprio autor)

3.7. Preparo das Amostras

Pesou-se, em torno de 3,0 g de amostra, que sofreram digestão com ácido nítrico concentrado (5 mL), e posteriormente completou-se seu volume com água Milli-Q® para um volume final de 50 mL. A digestão ácida é realizada para que durante o

processo ocorra a dissociação dos íons, pois estes na forma ionizada facilitam a identificação dos elementos através da energia liberada. A digestão foi realizada em chapa de aquecimento a temperatura de 250°C, pois o laboratório não possui forno de micro-ondas. O Quadro 4 a seguir mostra nove massas de cada produto, a partir delas serão feitas as leituras e diluições necessárias para o procedimento no equipamento.

Quadro 6. Preparo das amostras utilizados na análise de contaminantes inorgânicos em vacinas contra febre amarela em F AAS.

| Amostra | Massa | TAG BV 50 mL | Amostra | Massa | TAG BV 50 mL | Amostra | Massa | TAG BV 50 mL |
|---------------|--------|--------------|-----------|----------|--------------|-----------|------------|--------------|
| Sorbitol | 3,0011 | V2714 | Gelatina | 3,0015 | V2714 | Glutamato | 3,001 | V2724 |
| | 3,0009 | V2299 | | 3,0011 | V2299 | | 3,0008 | V2249 |
| | 3,0024 | V2664 | | 3,0036 | V2664 | | 3,0014 | V2634 |
| | 3,0034 | V2735 | | 3,0015 | V2735 | | 3,0024 | V2435 |
| | 3,0034 | V2305 | | 3,0013 | V2305 | | 3,0004 | V2605 |
| | 3,0035 | V2701 | | 3,0017 | V2701 | | 3,0015 | V2501 |
| | 3,0023 | V2720 | | 3,0014 | V2720 | | 3,0003 | V2620 |
| | 3,0022 | V2712 | | 3,0036 | V2712 | | 3,0002 | V2812 |
| | 3,0021 | V2703 | | 3,0013 | V2703 | | 3,0020 | V2903 |
| Ácido Nítrico | MERCK | Lote | K47834856 | Validade | | | 30/04/2020 | |

Fonte: (Próprio autor)

3.8. Procedimento de Análise

Para a análise da determinação da concentração dos diferentes metais, nos insumos, as amostras selecionadas foram submetidas a um ataque ácido com o objetivo de que ocorra a digestão da matéria orgânica e dissociação dos metais presentes nas amostras, para que possam ser quantificados pelo equipamento. Posteriormente, ocorre a solubilização com água até o volume final 50 mL.

Após todas as soluções padrões e as amostras prontas, foi selecionado no equipamento a lâmpada do elemento de interesse para dar-se início as análises. Concluída essa fase, procedeu-se à leitura do branco, e em seguida a calibração fazendo a leitura dos padrões correspondentes ao elemento em análise. Na etapa de calibração, onde foi realizada a curva analítica, aproveitou-se para avaliar a linearidade, uma das etapas da validação, onde é necessário a realização de 3 curvas analíticas com no mínimo 7 pontos de concentração.

Observou-se, portanto, que os valores da reta e o coeficiente de correlação estavam coerentes, prosseguiu-se para a leitura do material certificado, atentando-se

para o limite de quantificação (LOQ), e o padrão de controle. Como todos os resultados foram satisfatórios, prosseguiu-se à análise das amostras uma a uma manualmente no equipamento, que posteriormente apresentou a concentração do elemento em análise para cada amostra de matriz, calculados em função do peso de cada amostra.

Na solução amostra a leitura foi efetuada na diluição de maneira tal que a concentração esteja dentro da faixa de trabalho estabelecida nos 7 pontos da curva de calibração. Apenas se efetua uma diluição sucessiva se amostra possuir uma concentração alta do elemento de interesse, para este estudo, os valores foram dados em ppm ou mgL^{-1} .

3.9. Validação

A validação intralaboratorial foi realizada seguindo as orientações descritas no POP do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) nº 65.3120.126 (INCQS/FIOCRUZ, 2015). O procedimento segue recomendações do documento DOQ-CGCRE-008 (INMETRO, 2018), da RDC nº 166/2017, e dos trabalhos publicados por Thompson, Ellison e Wood (2002), Horwitz (2006) e Souza (2007). Foram verificados os parâmetros linearidade, seletividade / especificidade, limites de detecção e quantificação, repetibilidade, precisão intermediária e robustez.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Validação do Método Analítico para Impurezas Farmacêuticas

Os resultados da validação foram avaliados com base nos critérios de aceitação definidos pela resolução RDC 166 de 2017.

4.2. Linearidade

Foi realizado um estudo sobre o parâmetro da linearidade, a fim de que se pudesse comprovar que a técnica analítica escolhida para o desenvolvimento dos ensaios limites, fosse suficientemente capaz de quantificar a faixa mínima de concentração do elemento de interesse. O estudo realizado foi composto pela preparação de uma curva analítica com 7 pontos, procurando sempre englobar o limite da concentração do elemento de interesse. Assim, a faixa de trabalho escolhida para todos os elementos

que serão analisados variou de $0,0 \text{ mgL}^{-1}$ até 10 mgL^{-1} . Foi analisado em triplicata, todos os pontos que compõem a curva analítica. O Quadro 5 apresenta os resultados das absorbâncias em relação as concentrações na avaliação da linearidade do Ferro.

De acordo com o estudo de MOLIN (2010), a avaliação da faixa linear deve ser realizada segundo o Guia de Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, elaborado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, conforme feito neste estudo (INMETRO, 2020). A tabela 3 apresenta as concentrações, em triplicata, que foram utilizadas no teste da linearidade do ferro, em conformidade com o Figura 5 que mostra o gráfico de linearidade encontrado pelo equipamento.

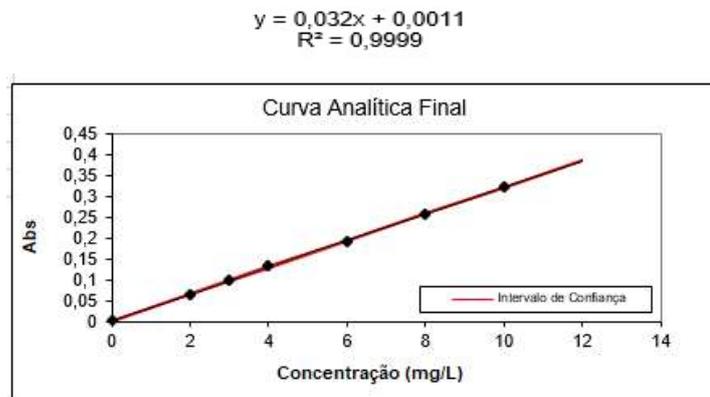
Tabela 3. Concentrações utilizadas no Estudo da Linearidade em mgL^{-1} de ferro.

| Curva Analítica | | | |
|-----------------|----|--------------------|--------------------|
| Nível (K) | i | $X_i \text{ mg/L}$ | $Y_i \text{ mg/L}$ |
| 1 | 1 | 0 | -0,0002 |
| | 2 | 0 | 0,0013 |
| | 3 | 0 | 0,0001 |
| 2 | 4 | 2 | 0,0648 |
| | 5 | 2 | 0,0647 |
| | 6 | 2 | 0,0646 |
| 3 | 7 | 3 | 0,0973 |
| | 8 | 3 | 0,0972 |
| | 9 | 3 | 0,0972 |
| 4 | 10 | 4 | 0,1309 |
| | 11 | 4 | 0,1309 |
| | 12 | 4 | 0,1308 |
| 5 | 13 | 6 | 0,1916 |
| | 14 | 6 | 0,1918 |
| | 15 | 6 | 0,1915 |
| 6 | 16 | 8 | 0,2564 |
| | 17 | 8 | 0,2563 |
| | 18 | 8 | 0,2562 |
| 7 | 19 | 10 | 0,3207 |
| | 20 | 10 | 0,3209 |
| | 21 | 10 | 0,3207 |

A Figura 5 mostra o gráfico de linearidade do equipamento para a determinação de ferro. Observa-se que na curva analítica, existe uma proximidade nas três medidas

realizadas em cada ponto, como consequência, possibilitou obter o coeficiente de determinação R^2 0,9999.

Figura 5. Gráfico da linearidade do equipamento para a determinação de ferro.

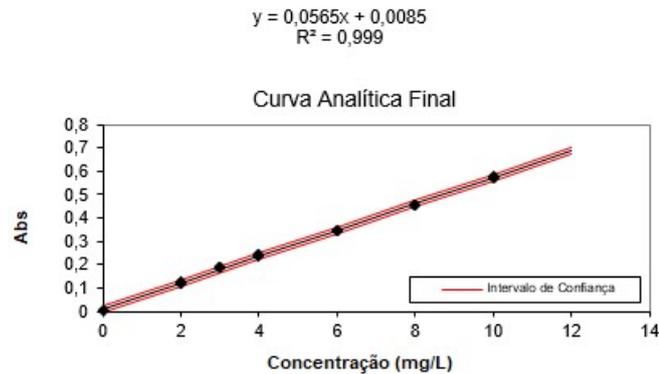


A Tabela 4 apresenta as absorbâncias em relação as concentrações em triplicatas do chumbo e a Figura 6 mostra o seu gráfico.

Tabela 4. Concentrações utilizadas no Estudo da Linearidade em mgL^{-1} chumbo.

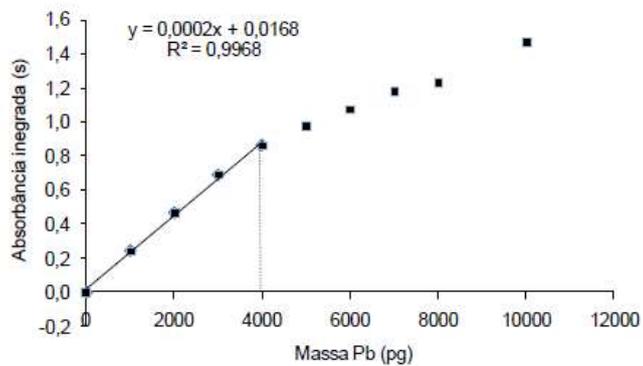
| Curva Analítica | | | |
|-----------------|----|------------|-------------------------|
| Nível (K) | i | X_i mg/L | Y_i mgL^{-1} |
| 1 | 1 | 0 | -0,0001 |
| | 2 | 0 | 0 |
| | 3 | 0 | 0 |
| 2 | 4 | 2 | 0,1219 |
| | 5 | 2 | 0,1222 |
| | 6 | 2 | 0,1233 |
| 3 | 7 | 3 | 0,187 |
| | 8 | 3 | 0,188 |
| | 9 | 3 | 0,187 |
| 4 | 10 | 4 | 0,24 |
| | 11 | 4 | 0,237 |
| | 12 | 4 | 0,241 |
| 5 | 13 | 6 | 0,342 |
| | 14 | 6 | 0,348 |
| | 15 | 6 | 0,348 |
| 6 | 16 | 8 | 0,456 |
| | 17 | 8 | 0,455 |
| | 18 | 8 | 0,452 |
| 7 | 19 | 10 | 0,575 |
| | 20 | 10 | 0,574 |
| | 21 | 10 | 0,573 |

Figura 6. Gráfico da linearidade do equipamento para a determinação de chumbo.



De acordo com MOLIN (2010) utilizou forno de grafite para realizar análise de chumbo para determinar as impurezas elementares em nível de traço, conforme figura 7, entretanto foi mostrado, neste trabalho, a determinação em nível de traço utilizando-se FAAS, confirmando assim a não necessidade de equipamento sofisticado para determinação de chumbo nos insumos para a VFA.

Figura 7. Gráfico da linearidade para a determinação de chumbo (MOLIN, 2010).

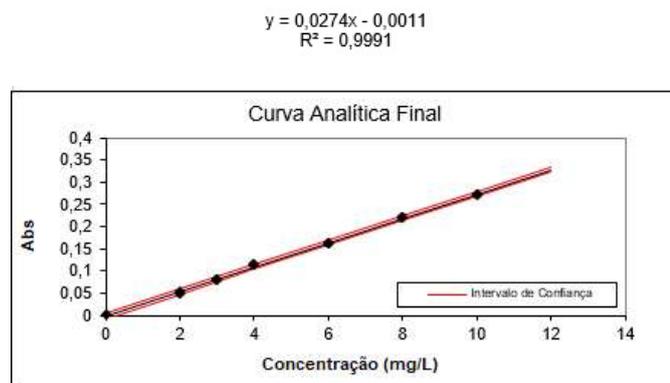


A Tabela 5 apresenta os 7 pontos de concentração utilizados para avaliação da linearidade do Ni e a Figura 8 apresenta as concentrações usadas com suas respectivas respostas, em absorbância, e a Figura 9 mostra o seu gráfico.

Tabela 5. Concentrações utilizadas no estudo da linearidade em mgL^{-1} níquel.

| Curva Analítica | | | |
|-----------------|----|--------------------|------------------------|
| Nível (K) | i | $X_i \text{ mg/L}$ | $Y_i \text{ mgL}^{-1}$ |
| 1 | 1 | 0 | -0,0023 |
| | 2 | 0 | 0 |
| | 3 | 0 | -0,0003 |
| 2 | 4 | 2 | 0,052 |
| | 5 | 2 | 0,0511 |
| | 6 | 2 | 0,0508 |
| 3 | 7 | 3 | 0,079 |
| | 8 | 3 | 0,0791 |
| | 9 | 3 | 0,0791 |
| 4 | 10 | 4 | 0,1133 |
| | 11 | 4 | 0,113 |
| | 12 | 4 | 0,1139 |
| 5 | 13 | 6 | 0,163 |
| | 14 | 6 | 0,1636 |
| | 15 | 6 | 0,1631 |
| 6 | 16 | 8 | 0,2209 |
| | 17 | 8 | 0,2208 |
| | 18 | 8 | 0,2209 |
| 7 | 19 | 10 | 0,2709 |
| | 20 | 10 | 0,2701 |
| | 21 | 10 | 0,2706 |

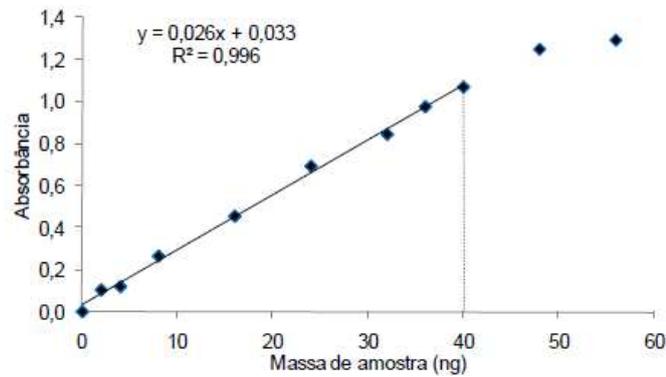
Figura 8. Gráfico da linearidade do equipamento para a determinação de níquel.



A Figura 9 apresenta a curva de calibração para o teste de linearidade do níquel mostrando a possibilidade de usar um sistema analítico menos sensível para determinação, em nível de traço, do elemento níquel. Contudo, MOLIN (2010) determinou este mesmo elemento usando forno de grafite e obteve um R^2 0,996,

conforme observado na Figura 9, menor quando comparado com obtido neste trabalho de 0,999.

Figura 9. Gráfico da linearidade do para determinação de níquel (MOLIN, 2010).

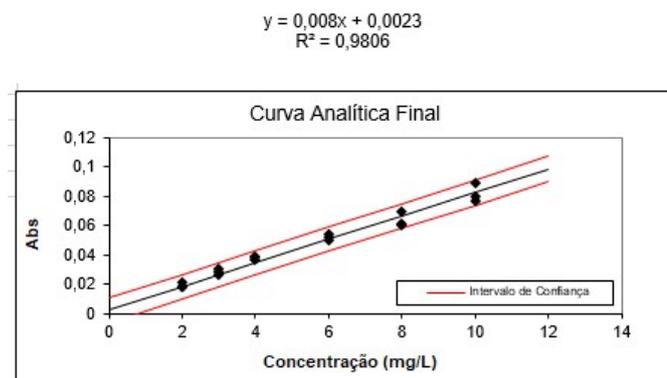


O Tabela 6 apresenta as concentrações para o teste de linearidade do arsênio, podendo observar uma grande variação entre as medidas de absorbância para a técnica de chama. Isto, é comprovado com a Figura 10 que mostra a dispersão das leituras para os pontos em estudo.

Tabela 6. Concentrações utilizadas no estudo da linearidade em mgL^{-1} arsênio.

| Curva Analítica | | | |
|-----------------|----|--------------------|------------------------|
| Nível (K) | i | $X_i \text{ mg/L}$ | $Y_i \text{ mgL}^{-1}$ |
| 1 | 1 | 0 | -0,0026 |
| | 2 | 0 | -0,0013 |
| | 3 | 0 | -0,0013 |
| 2 | 4 | 2 | 0,0183 |
| | 5 | 2 | 0,0175 |
| | 6 | 2 | 0,0211 |
| 3 | 7 | 3 | 0,0265 |
| | 8 | 3 | 0,0279 |
| | 9 | 3 | 0,0301 |
| 4 | 10 | 4 | 0,038 |
| | 11 | 4 | 0,0365 |
| | 12 | 4 | 0,0386 |
| 5 | 13 | 6 | 0,0541 |
| | 14 | 6 | 0,0501 |
| | 15 | 6 | 0,0519 |
| 6 | 16 | 8 | 0,069 |
| | 17 | 8 | 0,0602 |
| | 18 | 8 | 0,0613 |
| 7 | 19 | 10 | 0,0885 |
| | 20 | 10 | 0,0797 |
| | 21 | 10 | 0,0764 |

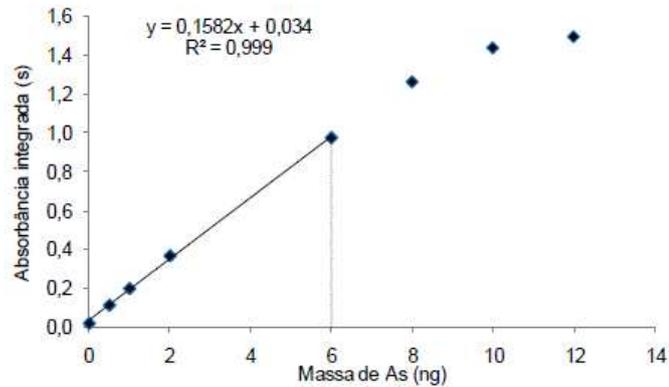
Figura 10. Gráfico da linearidade do equipamento para a determinação de arsênio



Observou-se que comparando os resultados do trabalho de MOLIN (2010), que utilizou forno de grafite para determinar arsênio e este estudo que usou FAAS, que o resultado do coeficiente de determinação 0,9806 foi menor que o obtido por DAL MOLIN, que foi de 0,999, conforme apresentado na Figura 11. Percebe-se, então,

para medidas mais precisas para determinação de arsênio, deve-se utilizar o forno de grafite.

Figura 11. Gráfico da linearidade do para determinação de As (MOLIN, 2010).



Tendo em vista que os elementos analisados apresentaram suas especificações com limites bem baixos, em conformidade com as farmacopeias. Foram avaliadas as premissas de linearidade destas curvas como normalidade, homocedasticidade e autocorrelação na relação concentração *versus* absorbância para os elementos Pb, Fe, Ni e As. Os Quadros 7, 8, 9 e 10, contemplam as informações do que foi levado em consideração para a avaliação da linearidade.

Quadro 7. Avaliação da linearidade do elemento chumbo

| Normalidade dos Resíduos | | Sorbitol | Gelatina | Glut. Sódio* | | |
|-------------------------------------------------|--------------|--------------------------|------------|--------------|----------|----------|
| (Teste de Ryan-Joiner) | | Chumbo (Solvente) | | | | |
| Req | | 0,97 | 0,97 | 0,95 | | |
| Rcrit ($\alpha = 0,05$) | | 0,95 | 0,95 | 0,95 | | |
| Autocorrelação dos Resíduos | | | | | | |
| (Teste de Durbin-Watson) | | | | | | |
| d (calculado) | | 0,95 | 0,98 | 0,96 | | |
| dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$ | | 1,16 | 1,16 | 1,16 | | |
| dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$ | | 1,39 | 1,39 | 1,39 | | |
| Homogeneidade da Variância dos Resíduos | | | | | | |
| (Teste de Brown-Forsythe) | | | | | | |
| Variância Combinada | | 1,09 E -05 | 1,16 E -05 | 2,10 E -05 | | |
| t _L calculado | | 1,06 E +00 | 1,46 E -01 | 1,06 E +00 | | |
| t _{tabelado} ($\alpha = 0,05$) | | 2,12 E +00 | 2,12 E +00 | 2,12 E +00 | | |
| p | | 3,07 E -01 | 4,10 E -01 | 3,05 E -01 | | |
| RESUMO DA AVALIAÇÃO | | | | | | |
| Homogeneidade de variância | | | | | | |
| Há Homocedasticidade | | | | | | |
| Regressão e Teste de Desvio de Linearidade | | | | | | |
| A regressão é significativa | | $p < 0,001$ | | | | |
| Não há desvio de linearidade | | $p > 0,05$ | | | | |
| Autocorrelação dos Resíduos ($\alpha = 0,05$) | | | | | | |
| não há autocorrelação | | $d > dU$ | | | | |
| Teste de Normalidade ($\alpha = 0,05$) | | | | | | |
| Segue a normal | | $Req > Rcrit$ | | | | |
| Glut. Sódio* | fonte | G.L. | SQ | MQ | F | p |
| | Regressão | 1 | 7,51E-01 | 7,51E-01 | 1,67E+04 | 1,39E-05 |
| | Ajuste | 4 | 6,85E-04 | 1,71E-04 | 5,93E+01 | 8,34E-08 |
| Gelatina | fonte | G.L. | SQ | MQ | F | p |
| | Regressão | 1 | 7,81E-01 | 7,81E-01 | 2,20E+04 | 1,53E-06 |
| | Ajuste | 4 | 5,49E-04 | 1,37E-04 | 8,55E+01 | 1,03E-08 |
| Sorbitol | fonte | G.L. | SQ | MQ | F | p |
| | Regressão | 1 | 6,76E-01 | 6,76E-01 | 2,35E+04 | 8,88E-07 |
| | Ajuste | 4 | 4,24E-04 | 1,06E-04 | 3,60E+01 | 1,36E-06 |

G.L – Graus de Liberdade; SQ – Soma dos Quad; MQ – Quadrado médio; F – Estatística F;

p – Valor; glutamato de sódio.

Pode-se observar que para o teste de Chumbo no solvente, nota-se que a regressão foi significativa, não houve, desvio de linearidade e nem há autocorrelação.

Quadro 8. Avaliação da linearidade do elemento ferro.

| Normalidade dos Resíduos | Sorbitol | Gelatina | Glut. Sódio* | | | |
|------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------|---------------|-----------|-----------|-----------|
| (Teste de Ryan-Joiner) | Ferro (Solvente) | | | | | |
| Req | 0,95 | 0,95 | 0,96 | | | |
| Rcrit ($\alpha = 0,05$) | 0,95 | 0,95 | 0,95 | | | |
| Autocorrelação dos Resíduos | | | | | | |
| (Teste de Durbin-Watson) | | | | | | |
| d (calculado) | 1,46 | 1,41 | 1,46 | | | |
| dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$ | 1,16 | 1,16 | 1,16 | | | |
| dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$ | 1,39 | 1,39 | 1,39 | | | |
| Homogeneidade da Variância dos Resíduos | | | | | | |
| (Teste de Brown-Forsythe) | | | | | | |
| Variância Combinada | 2,35 E -07 | 4,67 E -07 | 2,34 E -06 | | | |
| t_L calculado | 1,64 E +00 | 1,67 E +00 | (-4,34 E -01) | | | |
| $t_{\text{tabelado}} (\alpha = 0,05)$ | 2,12 E +00 | 2,12 E +00 | 2,12 E +00 | | | |
| p | 1,20 E -01 | 1,15 E -01 | 6,70 E -01 | | | |
| RESUMO DA AVALIAÇÃO | | | | | | |
| Homogeneidade de variância | | | | | | |
| Há Homocedasticidade | | | | | | |
| Regressão e Teste de Desvio de Linearidade | | | | | | |
| A regressão é significativa | $p < 0,001$ | | | | | |
| Não há desvio de linearidade | $p < 0,05$ | | | | | |
| Autocorrelação dos Resíduos ($\alpha = 0,05$) | | | | | | |
| não há autocorrelação | $d > dU$ | | | | | |
| Teste de Normalidade ($\alpha = 0,05$) | | | | | | |
| Segue a distribuição normal | $Req > Rcrit$ | | | | | |
| ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste) | | | | | | |
| Glut. Sódio* | fonte | G.L. | SQ | MQ | F | p |
| | Regressão | 1 | 2,22E-01 | 2,22E-01 | 3,63E+04 | 2,79E-08 |
| | Ajuste | 4 | 9,46E-05 | 2,36E-05 | 8,39+01 | 1,15E-08 |
| Gelatina | fonte | G.L. | SQ | MQ | F | p |
| | Regressão | 1 | 2,15E-01 | 2,15E-01 | 1,80 E-05 | 7,70E-04 |
| | Ajuste | 4 | 1,78 E-05 | 4,44 E-06 | 4,07 E+01 | 6,92 E-07 |
| Sorbitol | fonte | G.L. | SQ | MQ | F | p |
| | Regressão | 1 | 2,15E-01 | 2,15E-01 | 2,87E+05 | 1,85E-05 |
| | Ajuste | 4 | 1,07E-05 | 2,68E-06 | 2,53E+01 | 9,04E-06 |

G.L – Graus de Liberdade; SQ – Soma dos Quad; MQ – Quadrado médio; F – Estatística F;

p – Valor; glutamato de sódio.

Quadro 9. Avaliação da linearidade do elemento níquel

| Normalidade dos Resíduos | Sorbitol | Gelatina | Glut. Sódio* | | | |
|------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-------------|--------------|-----------|----------|----------|
| (Teste de Ryan-Joiner) | Níquel (Solvente) | | | | | |
| Req | 0,97 | 0,98 | 0,95 | | | |
| Rcrit ($\alpha = 0,05$) | 0,95 | 0,95 | 0,95 | | | |
| Autocorrelação dos Resíduos | | | | | | |
| (Teste de Durbin-Watson) | | | | | | |
| d (calculado) | 1,07 | 1,07 | 0,92 | | | |
| dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$ | 1,16 | 1,16 | 1,16 | | | |
| dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$ | 1,39 | 1,39 | 1,39 | | | |
| Homogeneidade da Variância dos Resíduos | | | | | | |
| (Teste de Brown-Forsythe) | | | | | | |
| Variância Combinada | 2,21E-06 | 2,14E_06 | 3,20E-06 | | | |
| t_L calculado | 1,35E+00 | 1,55E+00 | 6,45E-01 | | | |
| $t_{\text{tabelado}} (\alpha = 0,05)$ | 2,12 E +00 | 2,12 E +00 | 2,12 E +00 | | | |
| p | 1,95E-01 | 1,40E_01 | 5,28E-01 | | | |
| RESUMO DA AVALIAÇÃO | | | | | | |
| Homogeneidade de variância | | | | | | |
| Há Homocedasticidade | | | | | | |
| Regressão e Teste de Desvio de Linearidade | | | | | | |
| A regressão é significativa | $p < 0,001$ | | | | | |
| Não há desvio de linearidade | $p < 0,05$ | | | | | |
| Autocorrelação dos Resíduos ($\alpha = 0,05$) | | | | | | |
| não há autocorrelação | $d > dU$ | | | | | |
| Teste de Normalidade ($\alpha = 0,05$) | | | | | | |
| Segue a normal | $Req > Rcrit$ | | | | | |
| ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste) | | | | | | |
| Glut. Sódio* | fonte | G.L. | SQ | MQ | F | p |
| | Regressão | 1 | 1,56E-01 | 1,56E-01 | 2,24E+04 | 1,32E-06 |
| | Ajuste | 4 | 1,10E-04 | 2,76E-05 | 4,76E+02 | 4,21E-13 |
| Gelatina | fonte | G.L. | SQ | MQ | F | p |
| | Regressão | 1 | 1,56E-01 | 1,56E-01 | 2,25E+04 | 1,28E-06 |
| | Ajuste | 4 | 1,10E-04 | 2,75E-05 | 2,77E+02 | 1,06E-11 |
| Sorbitol | fonte | G.L. | SQ | MQ | F | p |
| | Regressão | 1 | 1,57E-01 | 1,57E-01 | 1,95E+04 | 3,94E-06 |
| | Ajuste | 4 | 1,24E-04 | 3,10E-05 | 7,91E+01 | 1,62E-08 |

G.L – Graus de Liberdade; SQ – Soma dos Quad; MQ – Quadrado médio; F – Estatística F; p – Valor; glutamato de sódio.

Quadro 10. Avaliação da linearidade do elemento arsênio

| Normalidade dos Resíduos | Sorbitol | Gelatina | Glut. Sódio* | | | |
|-----------------------------------------------------------------------|----------------|------------|--------------|----------|----------|----------|
| (Teste de Ryan-Joiner) | Arsênio | | | | | |
| Req | 0,98 | 0,66 | 0,87 | | | |
| Rcrit ($\alpha = 0,05$) | 0,95 | 0,95 | 0,95 | | | |
| Autocorrelação dos Resíduos | | | | | | |
| (Teste de Durbin-Watson) | | | | | | |
| d (calculado) | 1,39 | 2,18 | 0,72 | | | |
| dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$ | 1,16 | 1,16 | 1,16 | | | |
| dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$ | 1,39 | 1,39 | 1,39 | | | |
| Homogeneidade da Variância dos Resíduos | | | | | | |
| (Teste de Brown-Forsythe) | | | | | | |
| Variância Combinada | 3,70E-06 | 1,22E-03 | 5,63E-03 | | | |
| t_L calculado | (-1,31E+00) | 1,14E+00 | (-1,27E+00) | | | |
| $t_{\text{tabelado}} (\alpha = 0,05)$ | 2,12 E +00 | 2,12 E +00 | 2,12 E +00 | | | |
| p | 2,10E-01 | 2,69E-01 | 2,22E-01 | | | |
| RESUMO DA AVALIAÇÃO | | | | | | |
| Homogeneidade de variância | | | | | | |
| Há Homocedasticidade | | | | | | |
| Regressão e Teste de Desvio de Linearidade | | | | | | |
| A regressão não é significativa | $p < 0,001$ | | | | | |
| Há desvio de linearidade | $p < 0,05$ | | | | | |
| Autocorrelação dos Resíduos ($\alpha = 0,05$) | | | | | | |
| Há autocorrelação | $dL < d < dU$ | | | | | |
| Teste de Normalidade ($\alpha = 0,05$) | | | | | | |
| Não segue a normal | $Req > Rcrit$ | | | | | |
| ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste) | | | | | | |
| | fonte | G.L. | SQ | MQ | F | p |
| Glut. Sódio* | Regressão | 1 | 5,11E-03 | 5,11E-03 | 6,42E-01 | 4,35E-01 |
| | Ajuste | 4 | 7,88E-02 | 1,97E-02 | 4,86E+00 | 4,21E-13 |
| Gelatina | fonte | G.L. | SQ | MQ | F | p |
| | Regressão | 1 | 6,94E-03 | 6,94E-03 | 4,98E+00 | 4,04E-02 |
| | Ajuste | 4 | 6,16E-03 | 1,54E-03 | 1,14E+00 | 3,82E-01 |
| Sorbitol | fonte | G.L. | SQ | MQ | F | p |
| | Regressão | 1 | 1,34E-02 | 1,34E-02 | 8,65E+02 | 2,35E-15 |
| | Ajuste | 4 | 9,91E-05 | 2,48E-05 | 1,99E+00 | 1,60E-01 |

G.L – Graus de Liberdade; SQ – Soma dos Quad; MQ – Quadrado médio; F – Estatística F;

p – Valor; glutamato de sódio.

Para o teste de arsênio, observou-se que apresenta um desvio de linearidade, não seguindo assim a normalidade. Há autocorrelação, e que não apresenta significativa regressão linear.

4.3. Curva analítica usada para determinação dos teores dos elementos Fe, Pb, Ni e As

Para a determinação dos teores dos elementos Fe, Pb, Ni e As foram utilizados somente seis pontos de concentração, conforme mostrado no Quadro 11, onde as absorbâncias são apresentadas em relação as concentrações dos elementos.

Quadro 11. Concentrações utilizadas para determinação dos teores dos elementos Fe, Pb, Ni e As em mgL^{-1} .

| | | | | | | |
|-------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Pontos Fe | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| mgL^{-1} | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| Abs | 0,0001 | 0,0647 | 0,1303 | 0,1917 | 0,2563 | 0,3207 |
| | | | | | | |
| Pontos Pb | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| mgL^{-1} | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| Abs | 0 | 0,1208 | 0,2404 | 0,342 | 0,4559 | 0,5754 |
| | | | | | | |
| Pontos Ni | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| mgL^{-1} | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| Abs | 0 | 0,0520 | 0,1133 | 0,1630 | 0,2209 | 0,2709 |
| | | | | | | |
| Pontos As | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| mgL^{-1} | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| Abs | 0 | 0,0183 | 0,0380 | 0,0541 | 0,0690 | 0,0885 |

4.4. Seletividade/Especificidade

O procedimento na amostra (insumos) foi o tratamento com ácido nítrico concentrado, que eliminou totalmente quaisquer vestígios da matriz e, portanto, quaisquer interferentes provenientes da matriz. Mediante ao exposto, o estudo de efeito matriz não se aplica neste caso. Para determinação de cada elemento usou-se

lâmpada específica de leitura da absorção, referente a característica química de cada elemento. A FAAS é uma técnica analítica específica por si só.

4.5. Limite De Detecção E Limite De Quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram determinados usando as leituras das amostras branco (Solução X_B) e aplicando as Equações 3 e 4 e os resultados estão apresentadas no Tabela 7:

$$X_B \pm 3s \text{ para LOD} \qquad \qquad \qquad \text{Equação 3}$$

$$X_B \pm 10s \text{ para LOQ} \qquad \qquad \qquad \text{Equação 4}$$

Onde:

X_B = Concentração da amostra branco;

S= Desvio padrão das concentrações da amostra branco.

Os limites de detecção e quantificação estão descritos no quadro 10.

Tabela 7.Limites de detecção e quantificação de ferro, chumbo e níquel em F AAS

| Elemento | Média e desvio padrão de 10 leituras do branco | LOD (n=10) mgL⁻¹ | LOQ (n=10) mgL⁻¹ |
|-----------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Fe | 0,0010 ± 0,0003 | 0,235 | 0,785 |
| Pb | 0,0010 ± 0,0003 | 0,217 | 0,649 |
| Ni | 0,0010 ± 0,0003 | 0,238 | 0,712 |

Fonte: (Próprio Autor); Limite de Detecção (LOD); Limite de Quantificação (LOQ).

4.6. Precisão

4.6.1. Repetibilidade

A precisão do método, nestes casos, foi obtida através dos resultados das análises dos padrões em dez repetições genuínas. Estudou-se a repetibilidade, como mostrado na Tabela 9, usando, sempre, as mesmas condições e calculando-se os desvios padrão (s) das repetições, os desvios padrão relativos de repetibilidade experimental ($DPR_{r.exp.}(\%)$), os desvios padrão relativos previstos de reprodutibilidade ($DPR_{R.P.}(\%)$) e de repetibilidade ($DPR_{r.P.}(\%)$) e a razão $DPR_{r.exp.}(\%) / DPR_{r.P.}(\%)$.

Tabela 9: Leituras para precisão realizadas no mesmo dia (repetibilidade)

| Ferro | mgmL⁻¹ | Chumbo | mgmL⁻¹ | Níquel | mgmL⁻¹ | Arsênio | mgmL⁻¹ |
|-----------------------------------------------------------------|--------------------------|---------------|--------------------------|---------------|--------------------------|----------------|--------------------------|
| 1 | 0,2589 | 1 | 0,5415 | 1 | 0,2241 | 1 | 0,02786 |
| 2 | 0,2586 | 2 | 0,5414 | 2 | 0,2243 | 2 | 0,02058 |
| 3 | 0,2587 | 3 | 0,5417 | 3 | 0,2244 | 3 | 0,02295 |
| 4 | 0,2589 | 4 | 0,5420 | 4 | 0,2246 | 4 | 0,02304 |
| 5 | 0,2585 | 5 | 0,5412 | 5 | 0,2241 | 5 | 0,02502 |
| 6 | 0,2587 | 6 | 0,5414 | 6 | 0,2240 | 6 | 0,02294 |
| 7 | 0,2581 | 7 | 0,5414 | 7 | 0,2243 | 7 | 0,02179 |
| 8 | 0,2583 | 8 | 0,5413 | 8 | 0,2248 | 8 | 0,01897 |
| 9 | 0,2585 | 9 | 0,5415 | 9 | 0,2241 | 9 | 0,02455 |
| 10 | 0,2581 | 10 | 0,5419 | 10 | 0,2240 | 10 | 0,02544 |
| <i>M</i> (<i>n</i> =10) | 0,25853 | | 0,541530 | | 0,22427 | | 0,023314 |
| <i>s</i> | 2,91E-04 | | 2,58E-04 | | 2,67E-04 | | 2,55E-03 |
| <i>DPR_{r.exp.}</i> (%) | 0,11 | | 0,05 | | 0,11 | | 10,95 |
| <i>DPR_{R.P.}</i> (%) | 19,59 | | 17,55 | | 20,09 | | 22,00 |
| <i>DPR_{r.P.}</i> (%) | 9,80 | | 8,78 | | 10,05 | | 11,00 |
| <i>DPR_{r.exp.}</i> (%) / <i>DPR_{r.P.}</i> (%) | 0,01 | | 0,01 | | 0,01 | | 1,00 |

M, média aritmética; *n*, número de réplicas; *s*, desvio padrão; *DPR_{rep.exp.}* (%), desvio padrão relativo experimental (em condições de repetibilidade); *DPR_{R.P.}* (%) desvio padrão relativo previsto (em condições de reprodutibilidade); *DPR_{r.P.}* (%) desvio padrão relativo previsto (em condições de repetibilidade); *DPR_{r.exp.}* (%) / *DPR_{r.P.}* (%) a razão de Horwitz (para repetibilidade).

Observa-se que para as leituras espectrais para o elemento ferro a concentração média encontrada foi de 0,25853 mgmL⁻¹, com a fração de massa de $2,6 \times 10^{-7}$. Então para se calcular a reprodutibilidade previsto *DPR_{R.P.}* (%) utilizou-se a equação de Horwitz $2C^{-0,1505}$ (HORWITZ, 2006), onde C está denotado em fração de massa. Calculando-se por etapas:

1° Etapa - $DPR_{R.P.}(\%) = 2 \times (2,6 \times 10^{-7})^{-0,1505} = 19,59$;

Para se calcular $DPR_{r.P.}(\%)$, divide-se $DPR_{R.P.}(\%)$ por 2 (Horwitz concluiu que se poderia deduzir o valor para repetibilidade prevista $DPR_{r.P.}(\%)$ dividindo-se por dois o valor da reprodutibilidade prevista $DPR_{R.P.}(\%)$)

2° Etapa - $DPR_{r.P.}(\%) = 1/2 \times 19,59 = 9,80$;

Horwitz também deduziu que a relação entre o desvio padrão relativo da repetibilidade, obtido experimentalmente, e o desvio padrão relativo de repetibilidade previsto é um valor menor ou igual a dois.

3° Etapa - $DPR_{r.exp.}(\%) / DPR_{r.P.}(\%) = (0,11 / 9,80) = 0,01$

Portanto, a relação de $DPR_{r.exp.}(\%) / DPR_{r.P.}(\%) \leq 2$. Com esta relação $DPR_{r.exp.}(\%) / DPR_{r.P.}(\%)$, obteve-se o resultado de 0,01, que passa no critério de aceitação. O mesmo procedimento de cálculo, foi feito para os outros elementos. Para o As a concentração média foi $0,023314 \text{ mgmL}^{-1}$ e fração de massa de $2,3 \times 10^{-9}$ o valor estipulado para o $DPR_{R.P.}(\%)$ é 22 %, as etapas seguintes foram realizadas para o cálculo da razão de Horwitz para o elemento As, conforme mostrado na Tabela 9.

4.7. Precisão Intermediária

De acordo com os resultados obtidos, a avaliação da precisão intermediária, conforme mostrado na Tabela 10, foi satisfatória quanto à RDC 166 da ANVISA, conforme a tabela.

Tabela 10. Precisão intermediária.

| Datas | Ferro (mgmL^{-1}) $M(n=3)$ | Chumbo (mgmL^{-1}) $M(n=3)$ | Níquel (mgmL^{-1}) $M(n=3)$ | Arsênio (mgmL^{-1}) $M(n=3)$ |
|--------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 09/09/2019 | 0,2589 | 0,6233 | 0,2851 | 0,2851 |
| 10/09/2019 | 0,2586 | 0,6231 | 0,2856 | 0,2856 |
| 11/09/2019 | 0,2587 | 0,6233 | 0,2859 | 0,2859 |
| 12/09/2019 | 0,2589 | 0,6232 | 0,2854 | 0,2854 |
| 13/09/2019 | 0,2587 | 0,6236 | 0,2852 | 0,2852 |
| 14/09/2019 | 0,2585 | 0,6235 | 0,2855 | 0,2855 |
| $M (n=6)$ | 0,2587 | 0,6263 | 0,2862 | 0,2855 |
| $s(n=6)$ | $1,60 \times 10^{-4}$ | $1,86 \times 10^{-4}$ | $2,88 \times 10^{-4}$ | $2,88 \times 10^{-4}$ |
| $DPR_{R.P.}(\%)$ | 19,6067 | 17,1638 | 19,3108 | 19,3180 |
| $DPR_{R.exp.}(\%)$ | 0,0618 | 0,0297 | 0,1006 | 0,1009 |

M , média aritmética; n , número de réplicas; s , desvio padrão; $DPR_{R.exp.}(\%)$, desvio padrão relativo experimental (em condições de reprodutibilidade); $DPR_{R.P.}(\%)$ desvio padrão relativo previsto (em condições de reprodutibilidade).

De acordo com o VIM (2012), a precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sob condições que compreendem o mesmo procedimento de medição. Entretanto, no caso da precisão intermediária considera-se o desvio padrão relativo previsto pela equação de Horwitz $DPR_{R.P.}(\%) = 2C^{-0,1505}$, logo o valor para $DPR_{R.P.}(\%)$ é igual a 19,6067 para o elemento Fe e calculando-se o valor do desvio padrão relativo da precisão intermediária obtida experimentalmente $DPR_{R.exp.}(\%) = (1,60 \times 10^{-4} \times 100/0,2587) = 0,0618$.

Comparando-se $DPR_{R.exp.}(\%) / DPR_{R.P.}(\%) \leq 2$, os valores obtidos estão organizados na Tabela 11.

Tabela 11. Comparação $DPR_{R.exp.}(\%) / DPR_{R.P.}$.

| CV_{Rexp} / CV_{RP} | Fe | Pb | Ni | As |
|-----------------------|----------|---------|---------|---------|
| | 0,031434 | 0,23427 | 0,05382 | 0,05386 |

Valores menores que dois para a razão $DPR_{R.exp.}(\%) / DPR_{R.P.}$, os resultados passam pelo critério de aceitação.

4.8. Robustez

A avaliação da robustez foi realizada por meio de pequenas modificações nos parâmetros do método, como apresentado na Tabela 12, com o intuito de evitar os possíveis interferentes de sobreposição de linha espectral.

Tabela 12. Modificações avaliadas na robustez do método de FAAS nas determinações de chumbo, níquel, ferro e arsênio.

| Parâmetro de Operação | Chumbo | Níquel | Ferro | Arsênio |
|---------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Modo de leitura | Abs | Abs | Abs | Abs |
| Comprimento de onda (nm) | 283,3 | 232,0 | 248,3 | 193,7 |
| Resolução Espectral (nm) | 1,2 | 0,2 | 0,2 | 0,5 |
| Tempo de delay (s) | 30 | 30 | 30 | 30 |
| Fluxo de Combustível | 65 | 65 | 65 | 65 |
| Tempo de medida (s) | Otimizado | Otimizado | Otimizado | Otimizado |
| Composição da chama | Otimizado | Otimizado | Otimizado | Otimizado |
| Vazão da amostra (uL) | Otimizado | Otimizado | Otimizado | Otimizado |
| Volume da amostra (uL) | Otimizado | Otimizado | Otimizado | Otimizado |
| Altura de observação (cm) | Otimizado | Otimizado | Otimizado | Otimizado |

Fonte: (Próprio Autor).

Entretanto, mesmo com o cuidado ao fazer as modificações, alguns elementos apresentam ao utilizar-se um comprimento de onda alternativo. Será apresentado na

Tabela 13 as modificações para cada elemento, e as possíveis interferências que possam existir no momento da leitura.

Tabela 13. Modificações alternativas na robustez do método de F AAS nas determinações de chumbo, níquel, ferro e arsênio.

| Parâmetro de Operação | Chumbo | Níquel | Ferro | Arsênio |
|------------------------------|---------------|---------------|--------------|----------------|
| Modo de leitura | Abs | Abs | Abs | Abs |
| Comprimento de onda (nm) | 217,0 | 216,5 | 216,7 | 193,0 |
| Resolução Espectral (nm) | 1 | 0,4 | 0,4 | 0,7 |
| Tempo de delay (s) | 30 | 30 | 30 | 30 |
| Fluxo de Combustível | 70 | 70 | 70 | 70 |
| Tempo de medida (s) | Otimizado | Otimizado | Otimizado | Otimizado |
| Composição da chama | Otimizado | Otimizado | Otimizado | Otimizado |
| Vazão da amostra (uL) | Otimizado | Otimizado | Otimizado | Otimizado |
| Volume da amostra (uL) | Otimizado | Otimizado | Otimizado | Otimizado |
| Altura de observação (cm) | Otimizado | Otimizado | Otimizado | Otimizado |

Fonte: (Próprio Autor).

Observou-se, portanto, que para o elemento chumbo é possível a sobreposição de linha com os elementos: Cu 216,5 nm, Fe 216,7, Ni 216,6 nm, Sb 217,6 nm, Pt 216,5 nm. Esses interferentes, são indicados pelo próprio equipamento quando é feito a alteração dos parâmetros iniciais.

Ainda para o elemento chumbo, a fim de evitar essas interferências o próprio equipamento sugere linhas alternativas para a determinação de Pb que são: 261,4 nm, e 368,3 nm.

Para as modificações feitas no elemento Fe é possível que ocorra depressões de sinal por alguns elementos: Al, Si, Mn, Ni e Co. Essas observações também foram feitas pelo próprio equipamento ao alternar os parâmetros. E as linhas possíveis indicadas foram 252,0 nm e 373,7 nm, onde é possível a determinação sem nenhuma interferência de outros metais. Para os elementos Níquel e Arsênio não foi observado possíveis interferentes para as modificações realizadas.

Devido as possíveis interferências, a robustez foi avaliada por estatística do teste t, onde na comparação das médias, conforme na Tabela 14, onde os resultados dos padrões e amostras, não houveram diferenças significativas, levando-se em consideração as modificações realizadas, podendo então, afirmar que para as poucas e pequenas alterações no método, os resultados não foram modificados, com isso o teste foi considerado robusto.

Tabela 14. Comparação das médias do padrão e amostra em F AAS

| | Chumbo | Níquel | Ferro | Arsênio |
|--------------------------------------------|--------|--------|-------|---------|
| \bar{t} (Calculado parâmetro original) | 1,06 | 1,35 | 1,64 | -1,31 |
| \bar{t} (Calculado parâmetro modificado) | 1,06 | 0,645 | 0,434 | -1,27 |
| \bar{t} (Calculado Padrão) | 1,16 | 1,55 | 1,67 | -1,42 |
| \bar{t} (Tabelado) $\alpha = 0,05$ | 2,12 | 2,12 | 2,12 | 2,12 |

Fonte: (Próprio Autor)

5. Conclusão

Os resultados obtidos demonstram que o método proposto apresenta significativa linearidade, precisão e especificidade. Pois, passaram pelos critérios de aceitação os parâmetros de validação avaliados na determinação dos elementos Fe, Ni e Pb nos insumos glutamato de sódio, gelatina e sorbitol, que compõem a VFA com 5 e 10 doses. Se houver interferentes da matriz estes não serão quantificados, devido a especificidade do método. O preparo da amostra, a digestão da amostra com ácido nítrico concentrado, elimina toda parte orgânica, e conseqüentemente quaisquer interferentes proveniente da matriz. E o uso de lâmpadas específicas para dosagem de cada elemento confere ao método sua especificidade. Conclui-se, portanto, que o estudo pode ser aplicado para a análise quantitativa de impurezas elementares, em substituição aos métodos tradicionais (colorimétricos), pois estes apresentam resultados apenas visuais, não sendo possível expressar em termos quantitativos cada impureza na amostra.

Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores encontrados para os elementos Fe, Ni, Pb. Devido as variações encontradas nos valores de As, não pode-se concluir que a técnica é adequada para sua quantificação, necessitando de método analítico de maior sensibilidade.

Como todo método de análise apresenta vantagens e desvantagens, a espectrometria por chama, não seria diferente. Sua principal desvantagem é que, a análise deve ser feita de cada elemento por vez. Já sua vantagem, mais marcante é a confiabilidade nos resultados, de maneira rápida e eficaz. Desta forma, é possível contribuir com o controle de qualidade, onde é necessário aprimorar as técnicas

disponíveis, para que assim possa se garantir a eficácia e segurança nos resultados. Assim, a técnica apresentou características que possibilitam seu emprego no controle de qualidade de impurezas inorgânicas em insumos farmacêuticos.

6. PRODUTO TECNOLÓGICO

O POP elaborado para a realização das análises de impurezas elementares por FAAS, será aplicado diretamente na rotina de trabalho do Laboratório Físico-Químico (LAFIQ), do Departamento do Controle de Qualidade (DEQUA) otimizando assim o tempo de análise para os testes de impurezas elementares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A. J. Curtius, ***Determination of Co, Cu, Fe, Mn, Ni and V in diesel and biodiesel***
ALSANTE, K; HUYNH-BA, K.C; BAERTSCHI, S.W.; REED, R.A.; LANDIS, M.E.S.;
FURNESS, S.; OLSEN, B; MOWERY, M.; RUSSO, K.; ISER, R.; STEPHENSON,
G.A.; JANSEN, P. Recent trend in product development and regulatory issues on
impurities in active pharmaceutical ingredient (API) and drug products. Part 2: safety
considerations of impurities in pharmaceutical products and surveying the impurity
landscape. AAPS PharmSciTech, v. 15, n. 1, p. 237-251, 2014.

ALSANTE, K; HUYNH-BA, K.C; BAERTSCHI, S.W.; REED, R.A.; LANDIS, M.S.;
KLEINMAN, M.H.; FOTI, C.; RAO, V.M.; MEERS, P.; ABEND, A.; REYNOLDS, D.W.;
JOSHI, B.K. Recent trend in product development and regulatory issues on impurities
in active pharmaceutical ingredient (API) and drug products. Part 1: Predicting
degradation related impurities and impurity considerations for pharmaceutical dosage
forms. AAPS PharmaSciTech, V. 15, n. 1, p. 198-212, 2014. Analytica, 18, 2005, 58-
67.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Gerência de Avaliação de
Segurança e Eficácia – GESEF. Guia para a condução de estudos não clínicos de
toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de
medicamentos, v. 2, 2013.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para obtenção do perfil de
degradação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos,
n. 4, v. 1, 2015.

ASHU, S.; SALONI, K.; NARASIMHAN, B. Sources of impurities: a review. International
Journal of Pharmacy, v. 3, n. 1, p. 57-59, 2012. B. Welz, H. Becker-Ross, S. Florek, U.
Heitmann, High-Resolution continuum

BLESSY, M.; PATEL, R.D.; PRAJAPATI, P.N.; AGRAWAL, K.Y. Development of
forced degradation and stability indicating studies of drugs – a review. Journal of
Pharmaceutical Analysis, n. 4, v. 3, p. 159-165, 2014.

BOLZAN, R. C.; RODRIGUES, L. F.; MATTOS, J. C. P.; DRESSLER, V.L.; FLORES,
E.M. M.; Chromium determination in pharmaceutical grade barium sulfate by solid
sampling electrothermal atomic absorption spectrometry with zeeman-effect
background correction, Talanta 74 (2007) 119-124

BRASIL, Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde, Manual de Vigilância
Epidemiológica de Febre Amarela, Brasília (DF); 2004.p.69.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Instrução Normativa nº
36, de 21 de agosto de 2019. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação
complementares a insumos e medicamentos biológicos. Brasília, DF, 2019

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Instrução Normativa nº 40, de 21 de agosto de 2019. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação complementares às atividades de amostragem de matérias-primas e materiais de embalagens utilizadas na fabricação de medicamentos. Brasília, DF, 2019

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução - RDC nº 16, de 28 de março de 2013. Aprova o Regulamento Técnico de Boas Práticas de Fabricação de Produtos Médicos e Produtos para Diagnóstico de Uso In Vitro e dá outras providências. Brasília, DF, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Estabelece critérios para a validação de métodos analíticos. Brasília, DF, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução - RDC nº 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº 301, de 21 de agosto de 2019. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Brasília, DF, 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada-RDC no 45, de 09 de agosto de 2012. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0045_09_08_2012.htm. Acesso em: 04 jun. 2018.

BRASIL. Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. Norma NBR 5425 - Guia Para Inspeção Por Amostragem no Controle e Certificação da Qualidade. Rio de Janeiro, RJ, 1985.

BRASIL. Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. Norma NBR 5426 - Planos de Amostragem e Procedimentos na Inspeção por atributos. Rio de Janeiro, RJ, 1985

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Instrução Normativa nº 13 de 03 de outubro de 2003. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Uso Veterinário. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), 2003. Instrução Normativa nº 13 de outubro de 2003. Aprova o Regulamento de Boas Práticas de Fabricação de Produtos de Uso Veterinário e o Glossário. Brasília, DF, 2003.

CARVALHO, C; MACHADO, R. B; TIMM, L. B. **O direito sanitário brasileiro**. 1. ed. Quartier latin, São Paulo, 2004.

CHUANG , I.-C.; CHEN, K.-S.; HUANG, Y.-L.; LEE, P.-N.; LIN T.-H.; Determination of Trace Elements in Some Natural Drugs by Atomic Absorption Spectrometry, Biol. ; Biol. Trace Elem. Res. 76 (2000) 235-244

CONCHA, G.; VOGLER, G.; NERMELL, B.; VAHTER, M. **Low-Level arsenic excretion in breast milk of native Andean women exposed to high levels of arsenic in drinking water.** *Int. Arch. Ocup. Environ. Health.*, v. 71, p. 42-46, 1998c.

D. L. G. Borges, A. J. Curtius, B. Welz, U. Heitmann, **Fundamentos da Determinação de elementos traço em diesel e biodiesel por espectrometria de emissão atômica em chama e por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado com introdução da amostra por vaporização eletrotérmica**, Dissertação de mestrado, Departamento de química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2008. E. S. Chaves, F. G. Lepri, J. S. A. Silva, D. P. C. de Quadros, T. D. Saint'Pierre

Emídio Dabkiewicz, Vanessa – Desenvolvimento e Validação de método não destrutivo determinação de nitrogênio proteico em vacina de febre amarela por espectrometria de infravermelho próximo com calibração multivariada / Vanessa Emídio Dabkiewicz - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2016.

Espectrometria de Absorção Atômica de Alta Resolução com Fonte Contínua, EURACHEM Guide: **The Fitness for Purpose of Analytical Methods** – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Magnusson, B. and U. Örnemark (Ed.), 2014.

European Pharmacopeia (Ph. Eur.) 9th Edition – 2017.

Farmacopeia Brasileira 5^a ed. Brasília, Brasil, 2010.

Gonçalves, Natália Pedra - Detecção de Mycoplasma sp. e Acholeplasma laidlawii em imunobiológicos e insumos de processos por PCR em tempo real. /Natália Pedra Gonçalves. – Rio de Janeiro, 2015. xxii, 163 f. : il. ; 30 cm.

HERTRAMPF, A.; MULLER, H.; MENEZES, J. C.; HERDLING, T. Advanced qualification of pharmaceutical excipient suppliers by multiple analytics and multivariate analysis combined. **International Journal of Pharmaceutics**. 495(1), p. 447-58, 2015.

HOMMA, A. The Brazilian vaccine manufacturer's perspective and its current status. **Biologicals**, v.37 iss:3, p.1045-1056, 2009.

HOMMA, A. Vacina Febre Amarela: sucessos e desafios. **Curso de vacinas em saúde pública**, Ensp/Fiocruz, 15-19 jul. 2013.

HORWITZ, W.; ALBERT, R. The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision. **Journal of AOAC International**, v. 89, n. 4, p. 1095-1109, 2006.

IARC: Monograph on the Evaluation of Carcinogenicity: An update of IARC Monographs. Lyons: WHO, International Agency for Agency for Research on Cancer, **1-42(7)**, 1987.

ICH: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, in Q2(R1). ICH Harmonised Tripartite Guideline: London, 2005.

ICH HARMONISATION FOR BETTER HEALTH. Disponível em: <http://www.ich.org/about/mission.html>. Acesso em: 5 Jan. 2018.

ICH. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUERIMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Guideline For Elemental Impurities Q3D. Dez, 2014. Disponível em: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3D/Q3D_Step_4.pdf. Acesso em: 5 Jan. 2018.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). DOQ-CGCRE-008. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro: INMETRO, 2003. 35 p.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS. FIOCRUZ - BIOMANGUINHOS. Critérios para aprovação da vacina de febre amarela (atenuada) 05,10 e 50 doses. **Documento Interno: Instrução de trabalho n.0359**. Rev. 01, Rio de Janeiro,2013b.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS. FIOCRUZ - BIOMANGUINHOS. **Febre amarela: sintomas, prevenção e transmissão**. Rio de Janeiro, 2014a. Disponível em: <http://www.bio.fiocruz.br/index.php/febre-amarela-sintomas-transmissao-e-prevencao>.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS. FIOCRUZ - BIOMANGUINHOS. Procedimento para revisão por inspeção visual manual(IVM) de produtos liofilizados. **Documento Interno: Instrução de trabalho n. 7824**. Rev. 01, Rio de Janeiro, 2014b.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS. FIOCRUZ - BIOMANGUINHOS. Determinação do nitrogênio proteico (kjeldahl). **Documento Interno: Instrução de trabalho n. 0060**. Rev. 04, Rio de Janeiro, 2013a.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE. FIOCRUZ - INCQS. Validação de metodologias com determinação através de curva analítica linear. **POP nº 65.3120.126**. Rev. 02. Rio de Janeiro, 2012.

JAIN, D.; BASNIWAL, P.K. Review: Forced degradation and impurity profiling: Recent trends in analytical perspectives. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 86, p. 11-35, 2013.

MAGGIO, R.; CALVO, N.; VIGNADUZZO, S.; KAUFMAN, T. Review: Pharmaceutical impurities and degradation products: Uses and applications of NMR techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 101, p. 102-122, 2014.

MARGUÍ, E.; FONTAS, C.; BUENDIA, A.; HIDALGOB, M.; QUERALTA, I.; Determination of metal residues in active pharmaceutical ingredients according to

European current legislation by using X-ray fluorescence spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2009) 1253 -1257.

Massaro, E. J. Metal Metabolism and Toxicities. Handbook of Human Toxicology, CRC, 1997.

MOLIN, D. D. Determinação de impurezas inorgânicas em suplementos de ferro por dss-gf aas. **Dissertação de mestrado**. Santa Maria, RS, Brasil. 2010.

MOLIN, D. D.;MOLIN, DANIELA D.;DAL MOLIN, DANIELA;Daniela Dal Molin - Título: Determinação de impurezas inorgânicas em suplementos de ferro por DSS-GF AAS,Ano de Obtenção: 2010.

MULLER, A.L.H. Determinação de impurezas elementares em fármacos e estudo de interferências em ICP-MS após decomposição em sistema de alta pressão por combustão iniciada por micro-ondas. **Doutorado em Química – Universidade Federal de Santa Maria**. Santa Maria, RS, Brasil, 2014.

REISDÖRFER, F. C. **Estudo visando à extensão do prazo de validade da vacina febre amarela (atenuada) 05 e 10 doses**. 2011. 112f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Imunobiológicos). Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos, Manguinhos, RJ, 2011.

S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardiã, *Green Analytical Chemistry*, Trends in Analytical Chemistry, 27, 2008, 497-511. **samples by ETV-ICP-MS**, Journal of Environmental Monitoring, 10, 2008, 1211-1216.

Santos, Lisia Maria Gobbo – Avaliação e Otimização de Metodologia de Determinação do Arsênio Total, As (III) e As (V) em Águas e Alimentos e a Relevância dos Riscos por Ingestão. – 2004 xiii, 105f. Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

SCHOOF, R.A.; EICKHOFF, L.J.; YOST, E.A.; CRECELIUS, D.W.; CRAGIN, D.M.; MENZEL, D.B.; **Dietary exposure to inorganic arsenic**. In: CHAPPEL, W.R., ABERNATHY, C.O.; CALDERON, R.L. (Ed.), Arsenic Exposure and Health Effects. Elsevier Science B. V., London, 1999.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. Ed.Trad. de Marco Tadeu Grassi. São Paulo: Ed. Cengage Learning, 2008. **Source Atomic Absorption Spectrometry – The better way to do atomic absorption**

SOUSA, T. B. Uma Revisão sobre o Arcabouço Legal para o Controle de Impurezas em Produtos Farmacêuticos no Brasil. **Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz**, Rio de Janeiro, 2015.**spectrometry**, Wiley-VCH, Weinheim, 2005, 77-88.

SOUZA, S. V. C.: JUNQUEIRA, R. G. A produce to assess linearity by ordinary least squares method. **Anal. Chim. Acta** v. 552, n. 1-2 P. 25-35. 2005.

TEASDALE, A.; ELDER, D.; NIMS, R.W. ICH Quality Guidelines: An Implementation Guide. **Wiley**, p. 233 – 280, 2018.

VENKATESAN, P.; VALLIAPPAN, K. Impurity profiling: theory and practice. *Journal of Pharmaceutical Science & Research*, v. 6, n. 7, p. 254-259, 2014

Vocabulário Internacional de Metrologia: Conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM, 2012). Duque de Caxias, RJ: INMETRO, 2012. P 94.