

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

Cristian Rafael Andriolli

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO UTILIZANDO A
MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA EM FASE
REVERSA PARA DETERMINAÇÃO DE As, Cd, Hg, Pb, Co, Ni e V EM
EXCIPIENTES FARMACÊUTICOS OLEOSOS**

Santa Maria, RS
2021

Cristian Rafael Andriolli

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO UTILIZANDO A MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA EM FASE REVERSA PARA DETERMINAÇÃO DE As, Cd, Hg, Pb, Co, Ni e V EM EXCIPIENTES FARMACÊUTICOS OLEOSOS

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rochele Sogari Picoloto

Santa Maria, RS
2021

Andriolli, Cristian Rafael

Desenvolvimento de método utilizando a microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa para determinação de As, Cd, Hg, Pb, Co, Ni e V em excipientes farmacêuticos oleosos / Cristian Rafael Andriolli.- 2021. 88 p.; 30 cm

Orientadora: Rochele Sogari Picoloto

Coorientador: Cezar Bizzi

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, RS, 2021

1. Excipientes farmacêuticos oleosos 2. Preparo de amostra 3. RP-DLLME 4. ICP-MS 5. ICH Q3D I. Sogari Picoloto, Rochele II. Bizzi, Cezar III. Título.

Cristian Rafael Andriolli

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO UTILIZANDO A MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA EM FASE REVERSA PARA DETERMINAÇÃO DE As, Cd, Hg, Pb, Co, Ni e V EM EXCIPIENTES FARMACÊUTICOS OLEOSOS

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

Aprovado em 05 de março de 2021:



Dr^a. Rochele Sogari Picoloto (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Dr. Juliano Smanioto Barin (UFSM)



Dr. Éder Lisandro de Moraes Flores (UTFPR)

Santa Maria, RS
2021

DECLARAÇÃO

A pesquisa descrita nesta dissertação foi totalmente elaborada por mim, e as informações retiradas da literatura estão devidamente referenciadas. Esta dissertação (ou partes dela) não foi apresentada anteriormente para obtenção de qualquer outro grau.



Cristian Rafael Andriolli

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)**, ao **Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ)** e ao **Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA)**, pela oportunidade de execução deste trabalho.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela bolsa de estudos concedida.

A Prof. Dr^a **Rochele Sogari Picoloto**, pela orientação neste trabalho, pela amizade, pela paciência em transmitir seus conhecimentos, pela total disponibilidade em discutir as tarefas desenvolvidas, pelas oportunidades e também pelo incentivo de crescimento profissional e pessoal, principalmente por ser um exemplo de profissional.

Ao Prof. Dr. **Juliano Smanioto Barin** pela participação nas bancas de qualificação e defesa, pelas valiosas sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Éder Lisandro de Moraes Flores** pela participação nas bancas de qualificação e defesa, pelas valiosas sugestões e pelo acompanhamento durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores e colegas do **LAQIA/CEPETRO**, pelo convívio, amizade, colaboração e oportunidades de crescimento pessoal e profissional que a mim foram concebidas.

Aos funcionários da secretaria do PPGQ, **Ademir e Miguel**, pelo auxílio durante a execução deste trabalho.

Finalmente, a minha família e amigos, pelo carinho, incentivo, e por acreditarem em mim, sempre.

“Tente uma, duas, três e se possível tente a quarta, a quinta e quantas vezes for necessário. Só não desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga da conquista. Se você quer chegar aonde a maioria não chega. Faça o que a maioria não faz.”

Bill Gates

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO UTILIZANDO A MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA EM FASE REVERSA PARA DETERMINAÇÃO DE As, Cd, Hg, Pb, Co, Ni e V EM EXCIPIENTES FARMACÊUTICOS OLEOSOS

AUTOR: Cristian Rafael Andriolli
ORIENTADORA: Prof. Dr^a. Rochele Sogari Picoloto

Neste estudo foi desenvolvido um método de extração utilizando excipientes farmacêuticos oleosos, para a posterior determinação de impurezas elementares das classes 1 (As, Cd, Hg e Pb) e 2A (Co, Ni e V) segundo o ICH Q3D (Conferência internacional sobre harmonização de requerimentos técnicos para o registro de produtos farmacêuticos para uso humano). Foi avaliado como método de preparo de amostras a microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa (RP-DLLME). A determinação de As, Cd, Pb, Co, Ni e V foi feita por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e a determinação de Hg foi feita por geração de vapor frio (CVG) acoplado a ICP-MS. Para o preparo de amostras por RP-DLLME foi utilizada uma mistura de dois solventes, um dispersor e um extrator, sendo ambos adicionados diretamente sobre a amostra. Foram investigados alguns parâmetros que influenciam na eficiência da extração como o tipo de solvente dispersor, a proporção da mistura dos solventes dispersor e extrator, o tipo e a concentração do solvente extrator, volume total da solução de extração, a massa de amostra, a temperatura de aquecimento, o tempo de centrifugação, o tipo e o tempo de agitação. Estas avaliações foram feitas com a adição de $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$ de todos os analitos utilizando a amostra "A", sendo os resultados expressos em recuperação (%). Resultados quantitativos foram obtidos empregando as seguintes condições: *i*) solvente dispersor: *n*-propanol, *ii*) proporção da mistura dos solventes dispersor e extrator: 50:50% (v/v), *iii*) tipo e concentração do solvente extrator: $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ de HNO_3 (As, Cd, Pb, Co, Ni e V) ou $6,0 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl (Hg), *iv*) volume total da solução de extração: 2,0 mL, *v*) massa de amostra: 5 g, *vi*) temperatura: 85°C , *vii*) tempo de centrifugação: 10 min e *viii*) tipo e tempo de agitação: 1 min de agitação manual. A exatidão do método proposto foi avaliada pela comparação com os resultados obtidos após a digestão por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema de câmara única de reação (MAWD-SRC) e determinação por ICP-MS e CVG-ICP-MS. Não foram observadas diferenças significativas (teste *t*-student, nível de confiança de 95%) entre os resultados obtidos após os métodos da RP-DLLME e MAWD-SRC, para todas as impurezas elementares que compõem as classes 1 e 2A do ICH. A exatidão também foi avaliada, por ensaios de recuperação com adição de todos os analitos em três níveis de concentração (50, 100, e 150%) e também de acordo com as recomendações do ICH Q3D para a via de administração parenteral. Os valores obtidos para os ensaios de recuperação foram de 94 e 100% com RSDs inferiores a 5% para todos os analitos. Os limites de detecção para o método proposto foram $0,014, 0,002, 0,001, 0,006, 0,002, 0,012$ e $0,031 \mu\text{g g}^{-1}$ para As, Cd, Hg, Pb, Co, Ni e V, respectivamente. O método da RP-DLLME foi considerado adequado para a determinação dos elementos das classes 1 e 2A em excipientes farmacêuticos oleosos. Foi feita uma avaliação de acordo com os 12 princípios da Química Analítica Verde utilizando a métrica *Analytical GREENness*, a fim de avaliar o quão verde um método pode ser considerado, sendo cada princípio convertido em uma escala de 0 a 1 (a escala é representada pelas cores vermelho, amarelo e verde). Assim, para os métodos da RP-DLLME e MAWD-SRC foram obtidas como pontuações gerais, respectivamente de 0,49 e 0,35, sendo considerado o método da RP-DLLME mais verde devido ao menor impacto gerado ao ambiente. Como principais vantagens do método proposto, destacam-se a simplicidade de operação, menor geração de resíduos, uso de elevada massa de amostra e elevada frequência analítica. Este estudo é a primeira aplicação da RP-DLLME combinada com a determinação por ICP-MS e CVG-ICP-MS para amostras farmacêuticas.

Palavras-chave: Excipientes farmacêuticos oleosos. Preparo de amostra. RP-DLLME. ICP-MS. ICH Q3D.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A METHOD USING REVERSED-PHASE DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION FOR DETERMINATION OF As, Cd, Pb, Hg, Co, Ni, AND V IN OILY PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS

AUTHOR: Cristian Rafael Andriolli

ADVISOR: Prof. Dr^a. Rochele Sogari Picoloto

In this study, an extraction method using oily pharmaceutical excipients was developed for further determination of elemental impurity from classes 1 (As, Cd, Hg, and Pb) and 2A (Co, Ni, and V) according to ICH Q3D. The evaluated sample preparation method was reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction (RP-DLLME). The determination of As, Cd, Pb, Co, Ni, and V was performed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and the Hg determination was by cold vapor generation (CVG) coupled to ICP-MS. The RP-DLLME method was performed by using a mixture of dispersant and extractant solvents, which were added directly to the sample. Some parameters such as dispersant solvent, proportion of dispersant and extractant solvents, extractant solvent concentration, extraction solution volume, sample mass, temperature, heating time, centrifugation time, stirring type, and time were evaluated. For all parameters evaluated, sample "A" was spiked with $1.0 \mu\text{g g}^{-1}$ of all analytes using oil standard solutions and the results were expressed in recovery (%). The optimized conditions of the proposed RP-DLLME method were: *i*) dispersant solvent: *n*-propanol; *ii*) proportion of dispersant and extractant solvents: 50:50% (v/v); *iii*) extractant solvent concentration and type: 3.0 mol L^{-1} HNO₃ solution (As, Cd, Pb, Co, Ni e V) and 6.0 mol L^{-1} HCl solution (Hg); *iv*) extraction solution volume: 2.0 mL; *v*) sample mass: 5 g; *vi*) temperature: 85 °C; *vii*) centrifugation time: 10 min at 3450 rpm; *viii*) stirring type and time: 1.0 min by manual stirring. Accuracy was evaluated by comparing the results obtained by proposed method with those obtained by ICP-MS and CVG-ICP-MS after microwave-assisted wet digestion in a single reaction chamber (MAWD-SRC). No statistical difference (*t*-test, 95%) was observed between the results obtained for the elemental impurity from classes 1 and 2A after the RP-DLLME and MAWD-SRC methods. Accuracy was also evaluated by recovery experiments with the addition of all analytes at three concentrations levels (50, 100, and 150%) and according to the ICH Q3D recommendations for the parenteral route. The results for the analyte recovery experiments ranged from 94 to 100% with RSDs lower than 5%. The limits of detection for the proposed method were 0.014, 0.002, 0.001, 0.006, 0.002, 0.012, and 0.031 $\mu\text{g g}^{-1}$ for As, Cd, Hg, Pb, Co, Ni, and V, respectively. The developed method was considered suitable for the determination of the elements of classes 1 and 2A in oily pharmaceutical excipients. The evaluation was carried out according to the twelve green chemistry principles using an Analytical GREENness calculator, in order to evaluate how green a method can be considered. In this way, each variable is converted in a scale from 0 to 1 (resulting in a red, yellow, and green color scale). As a result, the proposed RP-DLLME method was considered greener than the MAWD-SRC method, obtaining as general scores 0.49 and 0.35, respectively. The main advantages of the proposed method include simplicity of operation, low amount of residues generation, use of high sample mass, and high throughput. The proposed approach is the first application of a RP-DLLME method combined with ICP-MS and CVG-ICP-MS determination for pharmaceutical samples.

Keywords: Oily pharmaceutical excipients. Sample preparation. RP-DLLME. ICP-MS. ICH Q3D.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Procedimento geral para o método da RP-DLLME.....	28
Figura 2 –	Etapas envolvidas no método da RP-DLLME: 1) pesagem da amostra; 2) aquecimento; 3) adição da mistura dos solventes dispersor e extrator; 4) agitação; 5) centrifugação e consequente separação das fases (orgânica e aquosa); 6) coleta da fase aquosa; 7) solução final (10 mL)	40
Figura 3 –	Fluxograma dos procedimentos experimentais desenvolvidos neste estudo.....	44
Figura 4 –	Avaliação do tipo de solvente dispersor utilizado no método de RP-DLLME. Recuperações para (■) As, (■) Cd, (■) Pb, (■) Co, (■) Ni e (■) V. Determinação dos analitos por ICP-MS (as barras representam a média \pm RSD, n= 5). A linha tracejada representa recuperação equivalente a 100%.....	49
Figura 5 –	Avaliação da proporção da mistura dos solventes dispersor:extrator utilizado no método de RP-DLLME. Recuperações para (■) As, (■) Cd, (■) Pb, (■) Co, (■) Ni e (■) V. Determinação dos analitos por ICP-MS (as barras representam a média \pm RSD, n= 5). A linha tracejada representa recuperação equivalente a 100%.....	50
Figura 6 –	Avaliação do tipo e da concentração do solvente extrator utilizado no método de RP-DLLME. Recuperações para (■) As, (■) Cd, (■) Pb, (■) Co, (■) Ni e (■) V. Determinação dos analitos por ICP-MS (as barras representam a média \pm RSD, n= 5). A linha tracejada representa recuperação equivalente a 100%	52
Figura 7 –	Avaliação do volume total da solução de extração utilizado no método de RP-DLLME. Recuperações para (■) As, (■) Cd, (■) Pb, (■) Co, (■) Ni e (■) V. Determinação dos analitos por ICP-MS (as barras representam a média \pm RSD, n= 5). A linha tracejada representa recuperação equivalente a 100%.....	53
Figura 8 –	Avaliação da massa de amostra utilizada no método de RP-DLLME. Recuperações para (■) As, (■) Cd, (■) Pb, (■) Co, (■) Ni e (■) V. Determinação dos analitos por ICP-MS (as barras representam a média \pm RSD, n= 5). A linha tracejada representa recuperação equivalente a 100%.	55
Figura 9 –	Avaliação da temperatura utilizada no método de RP-DLLME. Recuperações para (■) As, (■) Cd, (■) Pb, (■) Co, (■) Ni e (■) V. Determinação dos analitos por ICP-MS (as barras representam a média \pm RSD, n= 5). A linha tracejada representa recuperação equivalente a 100%.	56

- Figura 10 – Avaliação do tempo de centrifugação utilizado no método de RP-DLLME. Recuperações para (■) As, (■) Cd, (■) Pb, (■) Co, (■) Ni e (■) V. Determinação dos analitos por ICP-MS (as barras representam a média \pm RSD, n= 5). A linha tracejada representa recuperação equivalente a 100%..... 58
- Figura 11 – Avaliação dos métodos de preparo de amostras de acordo com a análise feita pelo software AGREE para (A) RP-DLLME e (B) MAWD-SRC com determinação dos analitos por ICP-MS e CVG-ICP-MS..... 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Exposições diárias máximas permitidas para as impurezas elementares das classes 1 e 2A em fármacos com via de administração parenteral.....	21
Tabela 2 –	Métodos de preparo de amostras geralmente empregados para produtos farmacêuticos.....	23
Tabela 3 –	Métodos de extração desenvolvidos utilizando a RP-DLLME para diferentes amostras oleosas, visando a determinação elementar empregando distintas técnicas de determinação.....	29
Tabela 4 –	Condições operacionais adotadas para a determinação de As, Cd, Pb, Co, Ni e V por ICP-MS e Hg por CVG-ICP-MS.....	35
Tabela 5 –	Resultados obtidos para As, Cd, Pb, Co, Ni e V por ICP-MS e Hg por CVG-ICP-MS após MAWD-SRC (média \pm desvio padrão, n= 5)	46
Tabela 6 –	Ensaio de recuperação conforme o ICH Q3D e em diferentes níveis de concentração dos analitos (valores em %, média \pm RSD, n= 5)	62
Tabela 7 –	Resultados obtidos para As, Cd, Pb, Co, Ni e V por ICP-MS e Hg por CVG-ICP-MS após a aplicação da RP-DLLME para excipientes farmacêuticos oleosos. Resultados em $\mu\text{g g}^{-1}$ (média \pm desvio padrão, n= 5)	63
Tabela 8 –	Comparação do método proposto com o método de referência para a posterior determinação de impurezas elementares em excipientes farmacêuticos oleosos.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ICH Q3D	Conferência internacional sobre harmonização de requerimentos técnicos para o registro de produtos farmacêuticos para uso humano, do inglês, <i>international council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use</i>
ICP-OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês, <i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês, <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
ETV-ICP-MS	Vaporização eletrotérmica acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês, <i>electrothermal vaporization coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
LA-ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado combinada à ablação a laser, do inglês <i>laser ablation coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
GF AAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês, <i>graphite furnace atomic absorption spectrometry</i>
F AAS	Espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês, <i>flame atomic absorption spectrometry</i>
LOQ	Limite de detecção, do inglês, <i>limit of detection</i>
LOD	Limite de quantificação, do inglês, <i>limit of quantification</i>
MAWD	Digestão por via úmida assistida por radiação micro-ondas, do inglês, <i>microwave-assisted wet digestion</i>
MAWD-SRC	Digestão por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema de câmara única de reação, do inglês, <i>microwave-assisted wet digestion in a single reaction chamber</i>
MIC	Combustão iniciada por micro-ondas, do inglês, <i>microwave-induced combustion</i>
RP-DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa, do inglês, <i>reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction</i>
RSD	Desvio padrão relativo, do inglês, <i>relative standard deviation</i>
CVG	Geração de vapor frio, do inglês, <i>cold vapor generation</i>
EDP	Exposição diária permitida, do inglês, <i>permitted daily exposures</i>
USP	Farmacopeia Americana, do inglês, <i>United States Pharmacopeia</i>
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva, do inglês, <i>dispersive liquid-liquid microextraction</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1	EXCIPIENTES FARMACÊUTICOS.....	19
2.2	EXCIPIENTES FARMACÊUTICOS OLEOSOS.....	19
2.3	IMPUREZAS ELEMENTARES EM EXCIPIENTES FARMACÊUTICOS.....	20
2.4	MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS.....	22
2.4.1	Métodos de digestão assistidos por radiação micro-ondas.....	25
2.4.2	Métodos de extração.....	26
2.4.2.1	<i>Microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa (RP-DLLME).....</i>	27
2.5	DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES EM EXCIPIENTES FARMACÊUTICOS.....	30
2.5.1	Técnicas para determinação multielementar: ICP-OES e ICP-MS..	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1	INSTRUMENTAÇÃO.....	34
3.2	REAGENTES, MATERIAIS E SOLUÇÕES DE REFERÊNCIA.....	36
3.3	AMOSTRAS.....	37
3.4	MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA PARA A POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES EM AMOSTRAS DE EXCIPIENTES FARMACÊUTICOS OLEOSOS.....	38
3.4.1	Digestão por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema de câmara única de reação (MAWD-SRC).....	38
3.4.2	Microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa (RP-DLLME).....	39
3.5	AVALIAÇÃO DE INTERFERÊNCIAS DE CARBONO NA DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES POR ICP-OES, ICP-MS E CVG-ICP-MS.....	41
3.6	VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES POR ICP-MS.....	42
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1	MÉTODO DE REFERÊNCIA: MAWD-SRC.....	46
4.2	MÉTODO PROPOSTO: RP-DLLME.....	47
4.2.1	Avaliação do tipo de solvente dispersor.....	48
4.2.2	Avaliação da proporção da mistura dos solventes dispersor e extrator.....	49

4.2.3	Avaliação do tipo e da concentração do solvente extrator.....	51
4.2.4	Avaliação do volume total da solução de extração.....	53
4.2.5	Avaliação da massa de amostra.....	54
4.2.6	Avaliação da temperatura.....	55
4.2.7	Avaliação do tempo de centrifugação.....	57
4.2.8	Avaliação do tipo e tempo de agitação.....	59
4.2.9	Estudos adicionais para Hg.....	60
4.3	VALIDAÇÃO DO MÉTODO DA RP-DLLME.....	60
4.4	DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES EM EXCIPIENTES FARMACÊUTICOS OLEOSOS APÓS RP-DLLME.....	62
4.5	COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS EMPREGADOS.....	64
5	CONCLUSÃO.....	68
	REFERÊNCIAS.....	69
	ANEXO.....	78

1 INTRODUÇÃO

Os excipientes farmacêuticos são ingredientes inativos que são incluídos nas formulações dos medicamentos para garantir a estabilidade dos produtos finais.^{1,2} Ainda, são empregados com o objetivo de melhorar o desempenho dos produtos e a biodisponibilidade dos princípios ativos, proporcionando um tratamento mais eficiente e seguro.^{1,2,3} A administração pode ser feita através da via oral, inalatória ou parenteral, dependendo do fármaco e do excipiente utilizado.⁴

Vários tipos de excipientes farmacêuticos estão disponíveis, tais como os diluentes, lubrificantes, sorventes, solventes, antioxidantes, solubilizantes, emolientes e veículos.^{1,5} Dentre os diversos tipos, os excipientes oleosos têm sido recomendados como diluentes e veículos para alguns medicamentos injetáveis oleosos. Para este fim, utilizam-se óleos de algodão, amendoim, canola, caroço de palma, gergelim, menta, milho, rícino e soja.^{3,6,7}

Apesar da origem botânica, é necessário verificar se os excipientes farmacêuticos oleosos apresentam elementos e substâncias considerados tóxicos, os quais, podem ser prejudiciais, causando problemas à saúde. Geralmente, esses contaminantes podem ser provenientes do solo, pesticidas e resíduos de catalisadores usados no processo de produção.^{8,9,10} Dentre os possíveis contaminantes, destacam-se as impurezas elementares que, quando presentes, podem acelerar a oxidação e a degradação do excipiente, prejudicando a qualidade do produto final.^{4,9} As impurezas elementares são divididas pelo guia ICH Q3D, em três classes (1, 2A, 2B e 3), de acordo com a toxicidade do elemento e a probabilidade de ocorrência do medicamento. O controle dos elementos das classes 1 (As, Cd, Hg e Pb) e 2A (Co, Ni e V) é necessário em medicamentos via parenteral, os quais são considerados elementos tóxicos e se administrados podem ocasionar efeitos adversos para a saúde.⁴

Para o controle das impurezas elementares, são utilizadas técnicas analíticas, tais como a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES)¹¹, espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)¹² acoplado à vaporização eletrotérmica (ETV)¹³ ou ablação a laser (LA)¹⁴, espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS)¹⁵ e espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS)¹⁵.

Dentre as técnicas analíticas mencionadas, a ICP-MS e ICP-OES têm sido recomendadas para o controle das impurezas elementares em fármacos, principalmente devido a sua análise rápida, capacidade de detecção multielementar, seletividade alta, bem como os limites de quantificação (LOQs) e detecção (LODs) baixos atribuídos a estas técnicas.^{9,16} Entretanto, como os excipientes usados em medicamentos injetáveis administrados pela via parental são líquidos oleosos, é necessária uma etapa de preparo de amostra, isso porque nestes equipamentos geralmente a introdução da amostra é feita na forma de suspensão ou solução aquosa.⁹

Alguns métodos de preparo de amostra têm sido empregados para esta finalidade, como a digestão por via úmida assistida por radiação micro-ondas (MAWD)¹¹, a digestão por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema de câmara única de reação (MAWD-SRC)¹² e a combustão iniciada por micro-ondas (MIC).¹⁷ Estes métodos têm por objetivo a decomposição da matéria orgânica e sua conversão em CO₂ e H₂O. Porém, métodos alternativos de preparo de amostras podem ser empregados, dentre os quais se destacam os que utilizam a extração, como a microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa (RP-DLLME), recentemente empregada para amostras com matrizes oleosas.^{18,19,20}

A RP-DLLME é um método de microextração onde a amostra orgânica é submetida a adição rápida de uma mistura de dois solventes, um dispersor (álcool) e um extrator (ácido diluído) que promovem a extração dos analitos. Esse método, geralmente, possibilita o uso de massas de amostra elevadas, soluções de extração diluídas, consumo reduzido de solventes e temperaturas brandas.^{19,20,21} Entretanto, não há relatos na literatura sobre o uso do método de RP-DLLME para produtos farmacêuticos oleosos. Além disso, nenhum dos estudos reportados na literatura utilizou a técnica de ICP-MS para a determinação dos analitos.

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de um método de preparo de amostras utilizando a RP-DLLME para posterior determinação dos elementos das classes 1 e 2A por ICP-MS.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesse capítulo será feita uma revisão da literatura, na qual serão abordados os aspectos gerais sobre os excipientes farmacêuticos, a presença de impurezas elementares, bem como a importância da determinação desses elementos em excipientes farmacêuticos oleosos. Posteriormente, serão descritos os principais métodos de preparo de amostras utilizados para produtos farmacêuticos e, ao final, serão apresentadas as principais técnicas de detecção utilizadas para a determinação de impurezas elementares.

2.1 EXCIPIENTES FARMACÊUTICOS

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define excipiente farmacêutico como qualquer componente, que não seja substância ativa, adicionado intencionalmente à uma formulação farmacêutica.²² Dessa forma, os excipientes farmacêuticos são considerados substâncias auxiliares que possuem propriedades diferentes daquelas presentes nos fármacos.^{23,24}

A administração de excipientes farmacêuticos pode ser feita pelas vias oral, parenteral e inalatória, sendo a forma administrada dependente do tipo de produto farmacêutico e sua devida finalidade.^{1,4} Os excipientes são utilizados para garantir a estabilidade dos produtos farmacêuticos, viabilizar formulações, melhorar o desempenho do produto, bem como melhorar a biodisponibilidade de ingredientes ativos. Além disso, normalmente são responsáveis pela maior porcentagem da composição do fármaco, ocupando maior volume ou massa do que o princípio ativo na composição final do produto.^{1,2,3}

Tendo em vista o uso dos excipientes, existem diferentes tipos desde antioxidantes, aromatizantes, conservantes, corantes, diluentes, edulcorantes, emolientes, emulsificantes, espessantes, estabilizantes, matrizes de liberação prolongada, promotores de absorção, solubilizantes, solventes, umectantes e até mesmo veículos oleosos, entre outros.^{1,5} Dentre os diversos tipos e finalidades de uso de excipientes disponíveis para a indústria farmacêutica, os excipientes oleosos têm sido recomendados como veículos e diluentes em alguns medicamentos injetáveis.^{3,5,6}

2.2 EXCIPIENTES FARMACÊUTICOS OLEOSOS

Alguns excipientes farmacêuticos oleosos são utilizados para solubilizar moléculas lipofílicas, não ionizáveis e apolares que estão presentes no princípio ativo e são de difícil formulação, devido à baixa solubilidade em água. Nestes casos, faz-se necessário o uso de soluções que são inteiramente orgânicas, normalmente de matriz oleosa, que geralmente são, mas nem sempre, utilizados para diluir os princípios ativos antes de serem administrados.^{25,26,27}

Para os casos em que são utilizadas soluções inteiramente orgânicas, as formas de administração comumente utilizadas são orais ou parenterais. Quanto à administração oral, a maioria das formulações são ingeridas na forma de cápsulas de

gelatina mole ou ainda como soluções orais.^{28,29} Enquanto que para a administração parenteral, é possível a diluição dos princípios ativos dos fármacos no momento da injeção, preparação de uma emulsão ou solubilização em óleo. Neste último caso, a formulação do óleo é usada como veículo para o fornecimento do medicamento, o qual é liberado ao longo do tempo (até meses) no corpo do paciente.^{3,30,31} Assim, o tempo e o órgão em que o medicamento injetável será metabolizado, dependerá do local da injeção, lipofilicidade do princípio ativo e também do tipo de veículo oleoso empregado.^{27,31}

Os excipientes oleosos comumente utilizados como solventes ou veículos em distintas formulações disponíveis são os óleos de algodão, amendoim, canola, cártamo, coco, gergelim, milho, oliva, rícino, semente de palma, soja, vegetais hidrogenados, triglicerídeos de cadeia longa, entre outros.^{3,6,7} Estes óleos são muitas vezes empregados em formulações de medicamentos injetáveis para o tratamento de pacientes com psicose crônica, deficiência na concentração de testosterona, terapias hormonais na prática veterinária e como método contraceptivo hormonal.³

Geralmente, os excipientes oleosos correspondem a maior porcentagem da composição dos medicamentos injetáveis. Como o uso destes medicamentos é feito pela via parenteral, é necessário que um controle de qualidade rigoroso dos excipientes utilizados, para impedir problemas de degradação do fármaco o que ocasionaria e/ou agravaria diversas doenças derivadas da presença de impurezas elementares. Ademais, evitar que seja feita a injeção de excipiente contendo impurezas elementares diretamente na via parenteral dos pacientes.⁹

2.3 IMPUREZAS ELEMENTARES EM EXCIPIENTES FARMACÊUTICOS

Considerando que as impurezas elementares podem estar presentes em excipientes, é necessário um controle de qualidade a fim de evitar os efeitos adversos que podem ser provocados elas. Algumas dessas impurezas elementares podem acelerar a oxidação e degradação dos excipientes, prejudicando a qualidade dos mesmos. As impurezas elementares geralmente são oriundas do solo, pesticidas e processos catalíticos durante a produção.^{8,9,10}

De acordo com o guia ICH Q3D (2019), as impurezas elementares podem ser divididas em três classes (1, 2A e 2B e 3) de acordo com a sua toxicidade e via de administração do produto farmacêutico, biodisponibilidade, estado de oxidação do

elemento, bem como a probabilidade de ocorrência do medicamento. A classe 1 é composta por As, Cd, Hg e Pb, enquanto que a classe 2 é subdividida em 2A (Co, Ni e V) e 2B (Ag, Au, Ir, Os, Pd, Pt, Rh, Ru, Se, Tl e Se) e a classe 3 é composta por Ba, Cr, Cu, Li, Mo, Sb e Sn.^{4,32} Os elementos das classes 1 e 2A precisam ser monitorados em fármacos que são administrados pela via parenteral, conforme previsto no ICH Q3D.⁴ As impurezas destas classes são monitoradas para todas as vias de administração, devido as baixas exposições diárias permitidas (EDPs). Enquanto a determinação dos elementos das classes 2B e 3 não é requerida. Na Tabela 1 estão apresentadas as EDPs para as classes 1 e 2A para a via de administração parenteral utilizada em medicamentos injetáveis oleosos.

Tabela 1 – Exposições diárias máximas permitidas para as impurezas elementares das classes 1 e 2A em fármacos com via de administração parenteral.

Classe	Elemento	EDP ($\mu\text{g dia}^{-1}$)
		Via parenteral
1	As	15
1	Cd	2
1	Hg	3
1	Pb	5
2A	Co	5
2A	Ni	20
2A	V	10

Como apresentado na Tabela 1, os elementos que compõe as classes 1 e 2A apresentam EDPs na faixa de 2 até 20 $\mu\text{g dia}^{-1}$ para a via parenteral de administração. Dessa forma, os elementos das classes 1 e 2A se estiverem presentes em fármacos mesmo que em concentrações baixas, podem ser considerados um risco a saúde.⁴ Diante da necessidade de um controle de qualidade das impurezas elementares em produtos farmacêuticos, a USP recomenda no capítulo *Elemental Impurities - Procedures 233* um método de preparo de amostra e as técnicas de determinação que devem ser empregadas. Neste método, as amostras são digeridas utilizando ácido concentrado (geralmente HNO_3) e a determinação é feita por ICP-MS ou ICP-OES.³³ No entanto, este método possui desvantagens como reduzida massa de amostra, maior geração de resíduos, possibilidade de contaminação durante o processo de digestão decorrente do uso de um volume elevado de ácido concentrado

(até 15 mL), o que contribui para o aumento dos valores de branco e dos LOQs.³⁴ Diante disso, existem estudos na literatura que utilizam outros métodos de preparo de amostras, destacando-se os com aquecimento por radiação micro-ondas e extração, os quais serão apresentados a seguir.^{9,11,12,17,35,36,37}

2.4 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS

Para a maioria dos equipamentos usados na determinação de impurezas elementares, ainda é preciso que a amostra seja convertida em uma solução compatível com a técnica de determinação. Diante disso, diferentes métodos de preparo de amostras são relatados para amostras com as mais variadas matrizes. A escolha do método de preparo de amostra, deve ser feita considerando a composição da amostra, os analitos e a técnica analítica de detecção a ser utilizada. A etapa de preparo de amostra é conhecida como a mais crítica da sequência analítica, pois é quando, comumente, ocorrem erros sistemáticos.^{34,38}

Quando se trata do preparo de amostra para a posterior determinação de impurezas elementares em fármacos, diversos métodos já foram desenvolvidos, como a dissolução, MIC, MAWD e MAWD-SRC.^{8,12,17,39} Na Tabela 2 estão apresentados alguns dos métodos mais recentes desenvolvidos para amostras de fármacos.

Tabela 2 – Métodos de preparo de amostras geralmente empregados para produtos farmacêuticos.

Amostras	Elementos	Método de preparo de amostra	Determinação	Referência
Cloridrato de metadona, com excipientes: sorbitol, glicerol, benzoato de sódio, ácido cítrico monohidratado e corantes diluídos em água purificada	As, Cd, Co, Hg, Ni, Pb e V	<u>MAWD</u> : 5 mL Solução digestora: 3 mL de HNO ₃ 14 mol L ⁻¹ + 5 mL de água. Programa de aquecimento: (i) rampa de 20 min até 210 °C; (ii) permanência de 15 min em 210 °C.	ICP-MS e ICP-OES	40
Substâncias farmacêuticas e excipientes em solução aquosa	Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl e V	<u>MAWD</u> : 200-300 mg Solução digestora: 2 mL HNO ₃ 14 mol L ⁻¹ + 2 mL HCl 12 mol L ⁻¹ (com adição de 1 mL de H ₂ O ₂ 30% e/ou 0,7 mL de HF 50%, dependendo da amostra). Programa de aquecimento: (i) rampa de 10 min até 190 °C; (ii) permanência de 20 min em 190 °C.	ICP-MS	41
Medicamentos de uso oral (levotiroxina sódica, dipirona de sódio, diclofenaco de sódio, cloridrato de metformina, e outros) e dois excipientes (carbonato de cálcio e maltodextrina).	As, Cd, Hg e Pb	<u>MAWD</u> : 500 mg Solução digestora: 5 mL de água régia Programa de aquecimento: (i) rampa de 2 min até 170 °C; (ii) permanência de 5 min em 170 °C; (iii) rampa de 2 min até 190 °C; (iv) permanência de 10 min em 190 °C; (v) rampa de 2 min até 210 °C; (vi) permanência de 20 min em 210 °C.	ICP-MS e ICP-OES	35
Pomada de aciclovir, aciclovir (princípio ativo), metilparabeno, edetato dissódico e cera emulsificante não iônica	As, Cr, Cu, Ni, Pb e V	<u>MAWD</u> : 200 mg Solução digestora: 6 mL de HNO ₃ 7 mol L ⁻¹ + 2 mL de H ₂ O ₂ 30% (v/v) Programa de aquecimento: (i) rampa de 20 min até 160 °C; (ii) permanência de 20 min em 160 °C.	ICP-MS	42
Medicamentos de uso oral (dipirona sódica, levotiroxina sódica, diclofenaco de sódio, cloridrato de metformina e outros) e suplemento alimentar	Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl e V.	<u>MAWD-SRC</u> : 100 ou 500 mg Solução digestora: 7 mL HNO ₃ 2 mol L ⁻¹ Programa de aquecimento: (i) rampa de 2,5 min até 140 °C; (ii) permanência de 2,5 min em 140 °C; (iii) rampa de 2,5 min até 180 °C; (iv) permanência de 2,5 min em 180 °C; (v) rampa de 10 min até 220 °C; (vi) permanência de 10 min em 220 °C.	ICP-MS e ICP-OES	11

Continuação da Tabela 2

Amostras	Elementos	Método de preparo de amostra	Determinação	Referência
Omeprazol	As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Li, Mo, Ni, Pb, Sb e V	<u>MAWD-SRC</u> : 500 mg Solução digestora: 7 mL de água régia invertida e 7 mL HNO ₃ 2 mol L ⁻¹ Programa de aquecimento: (i) rampa de 2,5 min até 140 °C; (ii) permanência de 2,5 min por 140 °C; (iii) rampa de 2,5 min até 180 °C; (iv) permanência de 2,5 min por 180 °C; (v) rampa de 10 min até 220 °C; (vi) permanência de 10 min em 220 °C.	ICP-MS	43
Levodopa, cloridrato de propranolol, difosfato de primaquina, sulfametoxazol	As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mo, Ni, Pb e V	<u>MAWD-SRC</u> : 500 mg Solução digestora: 6 mL HNO ₃ 14 mol L ⁻¹ Programa de aquecimento: (i) rampa de 10 min até 270 °C; (ii) permanência de 20 min em 270 °C.	ICP-MS	12
Princípio ativos (cloridrato de amitriptilina, carbamazepina, cloridrato de imipramina)	As, Cd, Hg e Pb	<u>MIC</u> : 500 mg Solução absorvedora: 6 mL de HNO ₃ 7 mol L ⁻¹ Programa de aquecimento: 1400 W por 10 min.	ICP-MS	17
Princípios ativos, intermediários e produtos farmacêuticos	Al, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pd, Pt, Rh, Ru, W, Zn e Zr	<u>Dissolução</u> : 10 mg ou 10 µL Solução: 5 mL de EDTA/DMF (2 g / 100 mL, aquecimento de 30 min em 120 °C)	ICP-OES	44
Princípio ativo	Ag, As, Bi, Cd, Cu, Hg, Mo, Pb, Sb e Sn	<u>Extração assistida por ultrassom</u> : 100 mg Solução extratora: 9 mL de dimetilsulfóxido acidificado (2:98% HCl:DMSO, v/v)	ICP-OES	36

MAWD: Digestão por via úmida assistida por micro-ondas; MAWD-SRC: Digestão por via úmida assistida por radiação micro-ondas em câmara única de reação; MIC: Combustão iniciada por micro-ondas; ICP-MS: Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado; ICP-OES: Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado; IC: Cromatografia de íons.

Como pode ser observado na Tabela 2, os principais métodos utilizados para o preparo de amostras farmacêuticas e posterior determinação de impurezas elementares são a MAWD e MAWD-SRC. Destaca-se também que praticamente todas as amostras empregadas nos métodos são princípios ativos de fármacos. Além disso, foram encontrados estudos que utilizam excipientes aquosos, mas nenhum estudo com excipientes oleosos.

Devido à complexidade das matrizes, existe uma dificuldade no desenvolvimento de um método único que seja capaz de abranger todos os tipos de fármacos e analitos, uma vez que as características físico-químicas e as formulações dos fármacos (princípio ativo, excipientes, comprimidos, cápsulas, entre outras) podem variar bastante. Dessa forma, existe um interesse no desenvolvimento de métodos de preparo de amostra que possibilitem a obtenção de uma solução adequada para a posterior determinação de impurezas elementares, além de atender as recomendações do guia ICH Q3D.^{7,9,20,45}

2.4.1 Métodos de digestão assistidos por radiação micro-ondas

Dentre os métodos já utilizados para o preparo de amostras farmacêuticas, cabe destacar a MAWD e a MIC, os quais utilizam a radiação micro-ondas como forma de aquecimento. No método de MAWD, a amostra é digerida pela ação de reagentes oxidantes, permitindo na maioria das vezes, a eliminação da matriz orgânica e a solubilização das impurezas elementares. Já no método de MIC, na presença de uma atmosfera de natureza oxidativa (geralmente O₂) a matriz orgânica da amostra é convertida, principalmente, em CO₂ e H₂O.³⁴ Para esses métodos são utilizados sistemas de forno micro-ondas que permitem o uso de temperaturas e pressões de 280 °C e 80 bar, respectivamente.⁴⁶ Nessas condições, a massa de amostra utilizada é limitada, em função do tamanho e resistência do frasco utilizado.^{39,47}

Como alternativa para amostras de difícil digestão, tem sido empregado fornos de micro-ondas capazes de operar em temperaturas e pressões na ordem de 300 °C e 199 bar, respectivamente.⁴⁸ Este sistema de digestão por via úmida permite o aquecimento através de radiação micro-ondas em uma câmara única de reação fechada (MAWD-SRC). A câmara por sua vez, é pressurizada com um gás inerte, onde devem ser adicionados água e ácido nítrico, ou outros reagentes que serão

responsáveis pela absorção das micro-ondas, em conjunto com os frascos que contém as amostras.^{34,48}

Embora o uso de métodos empregando radiação micro-ondas tem sido amplamente empregados no preparo de amostras, algumas desvantagens são inerentes a eles, tais como o uso de fornos com custo elevado, treinamento e experiência do analista, consumo relativamente alto de reagentes o que contribui para a geração de resíduos e massa de amostra limitada para sistemas fechados.

2.4.2 Métodos de extração

Atualmente, existe um crescente interesse pelo desenvolvimento de métodos de preparo de amostra que priorizem a miniaturização e que atendam aos princípios da química analítica verde.^{49,50} Nesse contexto, o uso de métodos de extração tem se destacado, na maioria das vezes, por serem empregados para a posterior determinação de compostos orgânicos e também para a análise de especiação química. No entanto, métodos de extração também podem ser aplicados para a posterior determinação de impurezas elementares em uma ampla variedade de amostras,^{50,51,52,53,54} dentre os quais se pode destacar a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e mais recentemente, a microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa (RP-DLLME).^{18,19,50,55,56,57}

A DLLME é um método de microextração, sendo descrito na literatura com ampla aplicação em amostras biológicas, alimentos e água.^{50,58,59,60,61} O procedimento da DLLME consiste no uso de uma mistura adequada de dois solventes o extrator (apolar, imiscível em água e tipicamente mais denso que a água) e o dispersor (um solvente orgânico miscível em água), sendo a mistura de solventes injetada sobre a amostra (solução aquosa) provocando de imediato, a turvação do meio (momento em que ocorre a extração). Em seguida, a dispersão é separada mediante a uma etapa de centrifugação, favorecendo o processo de sedimentação da fase orgânica extratora que possui o analito extraído.^{49,56,60}

Os solventes extratores mais comuns são os organoclorados, destacando-se o clorobenzeno, tetracloreto de carbono e clorofórmio, enquanto que os solventes dispersores mais comuns são a acetona, o metanol, o etanol e a acetonitrila. Cabe destacar que a formação de uma grande área superficial entre o solvente de extração e a fase aquosa, possibilita a rápida transferência dos analitos da fase aquosa para a

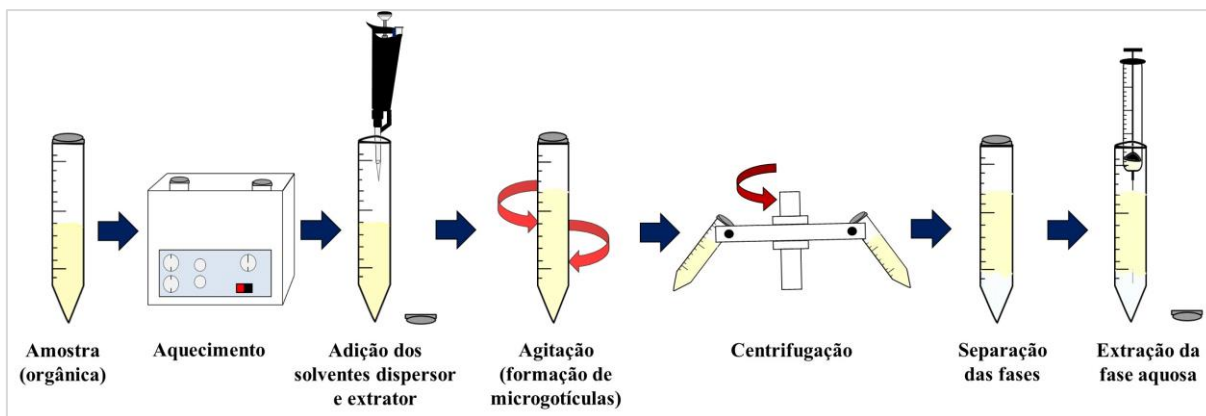
fase extratora.^{49,56,62} A DLLME tem como vantagens, baixo custo, simplicidade operacional, suscetível a miniaturização e rapidez. Diante disso, os aspectos negativos da DLLME estão relacionados com o uso de solventes orgânicos potencialmente tóxicos para os procedimentos de extração, o que não atende aos princípios da química analítica verde. E também, a incompatibilidade com as técnicas de ICP-OES e ICP-MS, uma vez que, a solução final, a qual contém os analitos, é orgânica.^{49,63}

2.4.2.1 Microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa (RP-DLLME)

A microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa diferencia-se do método da DLLME, justamente porque os analitos são extraídos de uma amostra de matriz oleosa (orgânica) e um solvente extrator é usado, sendo geralmente uma solução aquosa. Esse princípio de extração possibilita uma grande aplicação, pois os analitos que estão presentes na fase apolar (orgânica) são extraídos para a fase polar (aquosa), e a extração é feita de acordo com a seletividade baseada na polaridade do meio.^{20,21,45}

No método da RP-DLLME, uma mistura de solventes (dispersor e extrator) é empregada para promover a extração dos analitos para a fase aquosa. Na RP-DLLME, um solvente orgânico é utilizado como dispersor tendo como característica seu baixo peso molecular e um caráter anfifílico capaz de garantir a sua miscibilidade tanto na amostra orgânica quanto no meio extrator aquoso. Entre os solventes dispersores utilizados destacam-se o isopropanol, *n*-propanol, etanol e o metanol. Por outro lado, o solvente extrator é uma solução aquosa preparada a partir de uma solução ácida diluída (normalmente o HNO₃) ou ainda, apenas água.^{18,64} O procedimento geral utilizado em procedimentos da RP-DLLME é ilustrado na Figura 1.^{18,19}

Figura 1 – Procedimento geral para o método da RP-DLLME.



O uso da RP-DLLME apresenta diversas vantagens, como um alto fator de pré-concentração dos analitos, mesmo sendo um método simples, rápido e fácil, capaz de transferir os analitos de uma matriz oleosa para uma fase aquosa por meio do uso de um baixo volume de solventes. Além disso, apresenta uma eficiência de extração elevada e baixo custo associado à instrumentação. A RP-DLLME é considerado ainda, um método recente e que já foi aplicado para algumas amostras oleosas, embora não tenha sido para amostras de origem farmacêutica. Na Tabela 3, são mostradas as amostras já aplicadas utilizando o método da RP-DLLME e posterior determinação elementar por diferentes técnicas analíticas.^{18,19,64}

Tabela 3 – Métodos de extração desenvolvidos utilizando a RP-DLLME para diferentes amostras oleosas, visando a determinação elementar empregando distintas técnicas de determinação.

Amostra	Elementos	Massa de amostra (g)	Mistura de solventes (dispersor e extrator)	Determinação	Referência
Biodiesel	Cr, Cu e Ni	3,5	400 µL de isopropanol e 100 µL de HNO ₃ 5% (v/v)	GF AAS	65
Biodiesel	Ca, K, Mg e Na	10,0	650 µL de isopropanol e 350 µL de 1 mol L ⁻¹ HNO ₃	F AAS	20
Biodiesel	Ca, K, Mg e Na	3,0	585 µL de isopropanol e 195 µL HNO ₃ 5% (v/v)	F AAS	66
Gordura vegetal hidrogenada	Ni	5,0	700 µL de <i>n</i> -propanol e 300 µL de 2 mol L ⁻¹ HNO ₃	F AAS GF AAS	19
Óleo comestível	Cd e Pb	10,0	300 µL de isopropanol e HNO ₃ 3% (v/v) (1:4)	ET AAS	45
Óleo de peixe	Cd, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn	10,0	700 µL de <i>n</i> -propanol e 300 µL de 2 mol L ⁻¹ HNO ₃	ICP-OES	18
Óleo de peixe e manteiga	Cd e Zn	2,0	750 µL de DES e 400 µL de HNO ₃ 3% (v/v)	F AAS	67
Óleo de peixe e oliva	Cd	3,0	300 µL de <i>n</i> -propanol e 150 µL de água	SQT-F AAS	21
Óleo diesel	Al, Cd, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn	8,5	700 µL de isopropanol e 300 µL de 2 mol L ⁻¹ de HNO ₃ (v/v)	ICP-OES	68
Óleos vegetais	Fe, Mg e Zn	5,0	500 µL de isopropanol e 500 µL de HNO ₃ 1% (v/v)	F AAS	69

DES: Solvente eutético profundo, do inglês, *deep eutectic solvent*; ET AAS: Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica; F AAS: Espectrometria de absorção atômica com chama; ICP-OES: Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado; GF AAS: Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite; SQT-F AAS: Espectrometria de absorção atômica com chama utilizando um sistema de tubo de quartzo com fenda.

Como pode ser observado na Tabela 3, poucos são os artigos publicados empregando o método da RP-DLLME, uma vez que, suas pesquisas na área ainda precisam ser exploradas. Além disso, amostras farmacêuticas não foram utilizadas em métodos envolvendo a RP-DLLME, até o momento. E geralmente, quando a RP-DLLME foi usada, esteve combinada com a técnica de determinação por F AAS ou ICP-OES. Ainda, é importante destacar que, nenhum estudo foi reportado utilizando a técnica de ICP-MS.

2.5 DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES EM EXCIPIENTES FARMACÊUTICOS

Dentre as técnicas analíticas utilizadas para a determinação de impurezas elementares em produtos farmacêuticos, pode-se citar a GF AAS⁷⁰, F AAS¹⁵, ICP-OES^{11,35,70,71}, ICP-MS^{8,17,35,41,70,72} acoplado a ETV¹³, LA¹⁴ ou a CVG^{9,12}. Porém, as técnicas de determinação com capacidade multielementar tem sido utilizadas com maior frequência pela indústria farmacêutica.

2.5.1 Técnicas para determinação multielementar: ICP-OES e ICP-MS

As técnicas com plasma (ICP-OES e ICP-MS) se destacam, uma vez que, possuem capacidade de detecção multielementar, seletividade elevada, faixa linear ampla, bem como limites de detecção e quantificação baixos.^{4,9,34} A técnica de ICP-OES tem como princípio a emissão da radiação eletromagnética pelos átomos ou íons gerados e excitados no plasma. A técnica de ICP-MS, por sua vez, se baseia na separação de acordo com a relação massa-carga (m/z), dos íons que são formados no plasma.

Quando comparadas, as técnicas de ICP-OES e ICP-MS os LOQs da técnica de ICP-MS são menores, o que a torna uma técnica adequada à quantificação de impurezas elementares de maior toxicidade, geralmente presentes em concentrações baixas (As, Cd, Pb e outros).^{12,17} Por outro lado, a técnica de ICP-OES possibilita maior versatilidade e aplicação para a determinação de elementos presentes em concentrações mais elevadas na maioria das amostras (Ca, Mg, Na e P).^{73,74}

Alguns estudos têm mostrado problemas na etapa de determinação por ICP-OES e ICP-MS, principalmente devido as interferências que os elementos podem

sofrer durante a introdução e o transporte da amostra até o detector. Além disso, ambas as técnicas estão suscetíveis a interferências causadas por soluções muito ácidas ou com teores de carbono elevados, sendo na maioria das vezes necessário uma etapa de diluição prévia das amostras para minimizar estes efeitos.^{75,76,77}

Com relação as interferências causadas pelo uso de soluções ácidas, alguns estudos têm relatado problemas. Os ácidos são responsáveis por modificar algumas propriedades físicas, como por exemplo, a tensão superficial, densidade e viscosidade, além de causar o aumento da volatilidade de alguns elementos, como o Hg. Assim, elementos voláteis podem permanecer no sistema de nebulização resultando em efeitos de memória durante a etapa de medida. Nesses casos, o uso de longos períodos de lavagem do sistema entre as medidas das amostras pode ser necessário, ou ainda o uso de um sistema de geração de vapor frio pode ser uma alternativa a ser adotada.^{9,12,34}

Além das interferências oriundas do efeito da concentração do ácido, o teor de carbono em solução também pode ocasionar interferências (espectrais e não espectrais) na determinação por ICP-OES e ICP-MS. As interferências não espectrais causadas pelo efeito do teor de carbono em solução são decorrentes, principalmente, dos depósitos de carbono na interface e das mudanças nas propriedades físico-químicas das soluções a serem determinadas, tais como a viscosidade, tensão superficial, densidade e mudanças nas condições do plasma (atomização, excitação e ionização). Além dessas, as interferências espectrais, como a sobreposição de linhas de emissão de espécies atômicas ou moleculares e alterações na linha base podem afetar a determinação por ICP-OES. Enquanto que para a técnica de ICP-MS, podem ser observadas interferências espectrais como as decorrentes da formação de íons poliatômicos, íons de carga dupla, hidróxidos e interferências isobáricas.^{9,77}

Cabe destacar ainda, que em um estudo prévio⁷⁷ utilizando como fonte de carbono soluções de referência preparadas a partir de glicerol, ácido cítrico, citrato de potássio e carbonato de amônio, foi verificado que em concentrações iguais ou superiores a 5000 mg L⁻¹ de carbono, ocorreu o aumento da intensidade relativa do sinal superior a 4% para os isótopos ⁷⁵As, ¹⁹⁷Au, ²⁰²Hg, ³¹P, ⁸²Se e ¹²⁸Te. Além disso, nesse mesmo estudo⁷⁷ foram observadas supressões nas intensidades relativas dos sinais ao utilizar concentrações de carbono iguais ou superiores a 30000 mg L⁻¹ para os isótopos ¹¹B, ¹³⁸Ba, ⁹Be, ¹¹⁴Cd, ⁵⁹Co, ¹¹⁵In, ¹⁹¹Ir, ⁹⁸Mo, ⁵⁵Mn, ¹⁸⁹Os, ²⁰⁸Pb, ¹⁰⁵Pd, ¹⁹⁵Pt, ⁸⁵Rb, ⁴⁵Sc, ²³⁸U, ¹⁸²W e ⁶⁴Zn.⁷⁷ Em um outro estudo¹², onde a fonte de carbono foi a

partir do ácido cítrico, os autores reportam um aumento na intensidade relativa do sinal de 25% para ^{75}As ao utilizar soluções de carbono superiores a 500 mg L^{-1} , e para soluções de carbono superiores a 1000 mg L^{-1} um aumento na intensidade relativa do sinal de 17% para ^{60}Ni . Dessa forma, é de grande importância a avaliação das possíveis interferências durante a etapa de determinação em técnicas de detecção com plasma indutivamente acoplado, a fim de evitar resultados não quantitativos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesse capítulo serão apresentados a instrumentação, materiais, reagentes e as amostras utilizadas para o desenvolvimento deste estudo. Além disso, também serão apresentados os procedimentos, bem como os parâmetros avaliados na otimização do método de preparo de amostras avaliado empregando a RP-DLLME para a posterior determinação dos elementos das classes 1 e 2A em excipientes farmacêuticos oleosos.

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Para o procedimento da RP-DLLME, foi utilizado um banho (modelo TI-H 10, Elmasonic, Alemanha) com capacidade de 9 L e ajuste de temperatura variável (até 85 °C). Para a etapa de separação, foi utilizada uma centrífuga (modelo Q-222T208, Quimis, Brasil) com capacidade máxima de 8 tubos de 15 mL. Foi avaliada a agitação em banho de ultrassom, com frequência de 37 kHz, amplitude variável (até 100%) e potência de 330 W (modelo P 120 H, Elmasonic, Alemanha). Além do ultrassom, foi utilizado uma incubadora do tipo shaker com agitação orbital (modelo TE-420, Tecnal) e um agitador multiplataformas também conhecido por vórtex, que opera na faixa de 300 a 3000 rpm (modelo K40-10208, Kasvi).

Quanto aos procedimentos de pesagens, foi utilizado uma balança analítica (modelo AY220, Shimadzu, Brasil) com resolução de 0,0001 g e capacidade máxima de 220 g. Para a coleta da fase aquosa após a extração, foi utilizado uma microseringa de 1,0 mL (modelo 1001.25 LTN Agulha fixa – Ponta Estilo 3, Hamilton, Estados Unidos). Quanto ao manuseio dos solventes e preparo de soluções de referência, foram utilizados micropipetadores automáticos (Eppendorf®, Hamburg, Alemanha), com volumes variáveis entre 10-100, 100-1000 e 1000-5000 µL.

Para a comparação dos resultados obtidos por RP-DLLME, as amostras de excipientes farmacêuticos oleosos foram digeridas por meio do método de MAWD-SRC (modelo UltraWave®, Milestone, Itália). O sistema é equipado com 5 frascos de quartzo com capacidade individual de 40 mL e por uma cavidade com capacidade de 1 L feita de aço inoxidável e coberta com um recipiente de politetrafluoretileno (PTFE). Esta cavidade é selada e pressurizada com 40 bar de gás argônio, antes de iniciar o programa de aquecimento. As condições máximas de temperatura, pressão e potência de 300 °C, 199 bar e 1500 W, respectivamente.

Para a determinação de As, Cd, Pb, Co, Ni e V foi utilizado um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (modelo Elan DRCII®, Perkin-Elmer-SCIEX, Canadá) equipado com um nebulizador pneumático (modelo TQ-30-A3, Meinhard, Estados Unidos) e câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion, Austrália). A determinação de Hg foi feita por CVG acoplado a ICP-MS. O sistema de geração de vapor frio foi desenvolvido no Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA) da UFSM, conforme descrito previamente.⁷⁸

Para a determinação de carbono nas soluções obtidas após a RP-DLLME, foi utilizado um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado com vista axial (modelo Ciros CCD®, Spectro Analytical Instruments, Alemanha). O espectrômetro é equipado com um nebulizador de fluxo cruzado (*cross flow*), uma câmara de nebulização duplo passo (tipo *Scott*), tocha e injetor de quartzo. Além disso, o gerador de radiofrequência possui uma potência de 1400 W com vazões de gás argônio principal, auxiliar e nebulização, respectivamente de 15,0, 1,0 e 1,00 L min⁻¹. Foram utilizadas as linhas de emissão 193,030 nm e 371,029 nm para a determinação de C e Y, respectivamente. Além da faixa espectral da região do visível, o sistema óptico do equipamento é selado e purgado com gás argônio.

Para o estudo das interferências de carbono por ICP-OES, foram utilizadas todas as linhas de emissão disponíveis no equipamento para os elementos avaliados, sendo para As (189,042, 193,759, 197,262 e 228,812 nm), Cd (214,438, 226,502, 228,802 e 361,051 nm), Pb (167,153, 168,215, 172,680, 220,353, 261,418, 283,305 e 405,778 nm), Co (228,616, 230, 786, 237,862 e 238,892 nm), Ni (174,828, 221,648, 227,021, 231,604, 232,003, 300,249 e 341,476 nm) e V (292,402, 292,464, 309,311 e 311,071 nm). Enquanto que para os estudos das interferências de carbono por ICP-MS e CVG-ICP-MS, todos os isótopos avaliados estão apresentados na Tabela 4. Ademais, também estão apresentadas na Tabela 4, as condições operacionais adotadas para a determinação das impurezas elementares nas soluções obtidas após o método proposto e o método de referência.

Tabela 4 - Condições operacionais adotadas para a determinação de As, Cd, Pb, Co, Ni e V por ICP-MS e Hg por CVG-ICP-MS.

Parâmetro	ICP-MS	CVG-ICP-MS
Potência do gerador de radiofrequência, W	1300	1300
Vazão de argônio principal, L min ⁻¹	15,0	15,0
Vazão de argônio auxiliar, L min ⁻¹	1,2	1,2
Vazão de argônio nebulizador, L min ⁻¹	1,05	1,05
	Isótopos, m/z	Isótopos, m/z
	⁷⁵ As, ¹¹¹ Cd, ¹¹⁴ Cd, ⁵⁹ Co, ⁶⁰ Ni, ⁶² Ni,	²⁰⁰ Hg e ²⁰² Hg
	²⁰⁷ Pb, ²⁰⁸ Pb e ⁵¹ V	

Para a análise estatística dos resultados, foi utilizado o software GraphPad InStat versão 3.0, 1997 (GraphPad InStat Software, Estados Unidos). Para isso, foram

aplicados os testes *t* de *student* ou análise de variância ANOVA, ambos com nível de confiança de 95%, a fim de comparar as médias. Além disso, foi feita a avaliação das condições utilizadas pelos métodos da RP-DLLME e MAWD-SRC de acordo com os 12 princípios da química analítica verde. Para isso, foi utilizado o software AGREE (*Analytical GREENness Metric*), uma ferramenta recente que permite avaliar métodos analíticos desde a coleta da amostra até a determinação dos analitos, incluindo as etapas de preparo de amostra e o descarte de resíduos gerados.⁷⁹

3.2 REAGENTES, MATERIAIS E SOLUÇÕES DE REFERÊNCIA

A água utilizada em todos os experimentos foi, previamente, destilada e desionizada em uma coluna de troca iônica convencional e purificada em um sistema Milli-Q® (modelo Milli-Q®, Millipore, Estados Unidos), apresentando máxima resistividade final de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ e condutividade de $0,6 \mu\text{S cm}^{-1}$. O HNO_3 P.A (65%, Merck, Brasil) utilizado nos métodos da MAWD-SRC e da RP-DLLME, bem como o HCl P.A (37%, Merck, Brasil) utilizado no método da RP-DLLME foram previamente destilados em um sistema de destilação *sub-boiling* (modelo duoPUR® 2.01E, Milestone, Itália). Para a realização da descontaminação dos materiais empregados em todas as etapas dos procedimentos, foi usado o HNO_3 (concentrado ou uma solução 5%, v/v).

Para a determinação de As, Cd, Hg, Pb, Co, Ni e V por ICP-MS foram utilizadas soluções de calibração ($0,025$ a $5 \mu\text{g L}^{-1}$, em HNO_3 5% v/v) que foram preparadas a partir de sucessivas diluições de uma solução de referência multielementar na concentração de 10 mg L^{-1} (SCP33MS, PlasmaCAL, Canadá). Quanto a determinação de Hg por CVG-ICP-MS, foram utilizadas soluções de calibração ($0,025$ a $5 \mu\text{g L}^{-1}$, em HNO_3 5% v/v) que foram preparadas mediante a sucessivas diluições de uma solução de referência monoelementar na concentração de 1000 mg L^{-1} (Hg, Merck IV, Alemanha). Além disso, foram preparadas soluções de NaBH_4 0,05% (99,5%, Vetec, Brasil) em NaOH 0,1% (97%, Vetec, Brasil) e HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Para a determinação de carbono por ICP-OES nas soluções finais obtidas após a RP-DLLME, as soluções de calibração (10 a 500 mg L^{-1} , em HNO_3 5% v/v) foram preparadas a partir da diluição sucessiva de uma solução na concentração de 10000 mg L^{-1} de carbono, obtida por meio da dissolução de ácido cítrico P.A (Merck, Alemanha) em HNO_3 5% (v/v). Ítrio foi utilizado como padrão interno na determinação

de carbono, sendo adicionado a partir de uma solução de referência monoelementar na concentração de 1000 mg L^{-1} (Spex, Estados Unidos). Tanto as amostras e brancos como as soluções de calibração, foram preparadas em HNO_3 5% (v/v), sendo adicionada $10 \text{ }\mu\text{L}$ da solução contendo $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ítrio. Previamente a etapa de determinação, as amostras já diluídas, brancos e soluções de calibração foram purgadas com gás argônio em um fluxo de $0,1 \text{ L min}^{-1}$ durante 2 min, para a eliminação de possíveis vestígios de CO_2 . Ao término do tempo de purga, foram feitas as determinações de carbono por ICP-OES. Os valores obtidos foram expressos em solução, considerando o fator de diluição das leituras.

Argônio de elevada pureza (pureza de 99,998%, White Martins, Brasil) foi utilizado para a geração do plasma dos espectrômetros de ICP-MS e ICP-OES, sendo o mesmo também utilizado como gás principal, auxiliar e de nebulização. E também, foi utilizado argônio (pureza de 99,5%, White Martins, Brasil) para a pressurização da cavidade do sistema de micro-ondas empregado na MAWD-SRC.

Quanto ao método da RP-DLLME, foram utilizados os seguintes solventes como dispersores: metanol (99,8%, $d = 0,792 \text{ g mL}^{-1}$, Merck, Alemanha), etanol (99,9%, $d = 0,788 \text{ g mL}^{-1}$, Vetec, Brasil), isopropanol (99,5%, $d = 0,786 \text{ g mL}^{-1}$, Vetec, Brasil) e *n*-propanol (99,5%, $d = 0,803 \text{ g mL}^{-1}$, Vetec, Brasil). Além disso, foi utilizado tolueno (99,9%, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) para a diluição das soluções de referência monoelementares orgânicas de As, Hg e Co.

Uma solução de referência multielementar em matriz oleosa (VHG-V21+K, LGC, Estados Unidos) na concentração de $50 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ contendo Cd, Ni, Pb e V e três soluções de referência monoelementares em matriz oleosa de As ($1000 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$, VHG-OAS-1000, LGC, Estados Unidos), Co ($1000 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$, VHG-OCO-1000, LGC, Estados Unidos) e Hg ($100 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$, OMHG100, SpecSol, Brasil), foram utilizadas para os experimentos de adição de analito durante a otimização e avaliação da exatidão do método da RP-DLLME.

Foram também utilizados, tubos de polipropileno com tampa e capacidade máxima de 15 e 50 mL (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha).

3.3 AMOSTRAS

Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizadas cinco amostras de excipientes farmacêuticos oleosos obtidos em mercado local. As amostras foram

arbitrariamente nomeadas como "A" (óleo de milho), "B" (óleo de rícino), "C" (óleo de soja), "D" (óleo de soja) e "E" (óleo de soja). A amostra "A" foi usada para o desenvolvimento do método proposto da RP-DLLME. Para os procedimentos da RP-DLLME e MAWD-SRC, previamente à avaliação de todos os procedimentos, cada amostra foi homogeneizada durante 5 min de agitação manual.

3.4 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA PARA A POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES EM AMOSTRAS DE EXCIPIENTES FARMACÊUTICOS OLEOSOS

Neste estudo, um método de preparo de amostra foi desenvolvido empregando a RP-DLLME para a posterior determinação dos elementos das classes 1 e 2A em excipientes farmacêuticos oleosos. Como método de referência foi utilizado a MAWD-SRC. Os procedimentos utilizados para cada método serão descritos a seguir.

3.4.1 Digestão por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema de câmara única de reação (MAWD-SRC)

O procedimento de digestão de excipientes farmacêuticos oleosos por MAWD-SRC foi adaptado de condições experimentais utilizadas em estudos prévios.^{12,80} O método da MAWD-SRC foi usado para a obtenção dos valores de referência para As, Cd, Hg, Pb, Co, Ni e V para fins de comparação aos valores obtidos pelo método de preparo de amostra desenvolvido. Além disso, foi utilizada para a digestão das soluções de referência orgânica multielementar (Cd, Pb, Ni e V) e monoelementares (As, Hg e Co).

Para a digestão das amostras por MAWD-SRC, aproximadamente 0,4 g de amostra foram pesados diretamente no interior dos frascos de quartzo com o auxílio de uma seringa e foi feita a adição de 6 mL de HNO₃ concentrado. Após, o rotor com os frascos foi inserido em um compartimento apropriado no forno de micro-ondas, que por sua vez, já possuía um copo reacional, o qual estava preenchido com uma solução composta por 130 mL de água e 5 mL de HNO₃ concentrado. Em seguida, a cavidade do forno micro-ondas foi fechada e pressurizada com gás argônio até 40 bar. O programa de aquecimento utilizado foi o seguinte: *i*) rampa de 15 min até 250 °C; *ii*) permanência por 15 min à 250 °C. Após o resfriamento (65 °C), o sistema de câmara

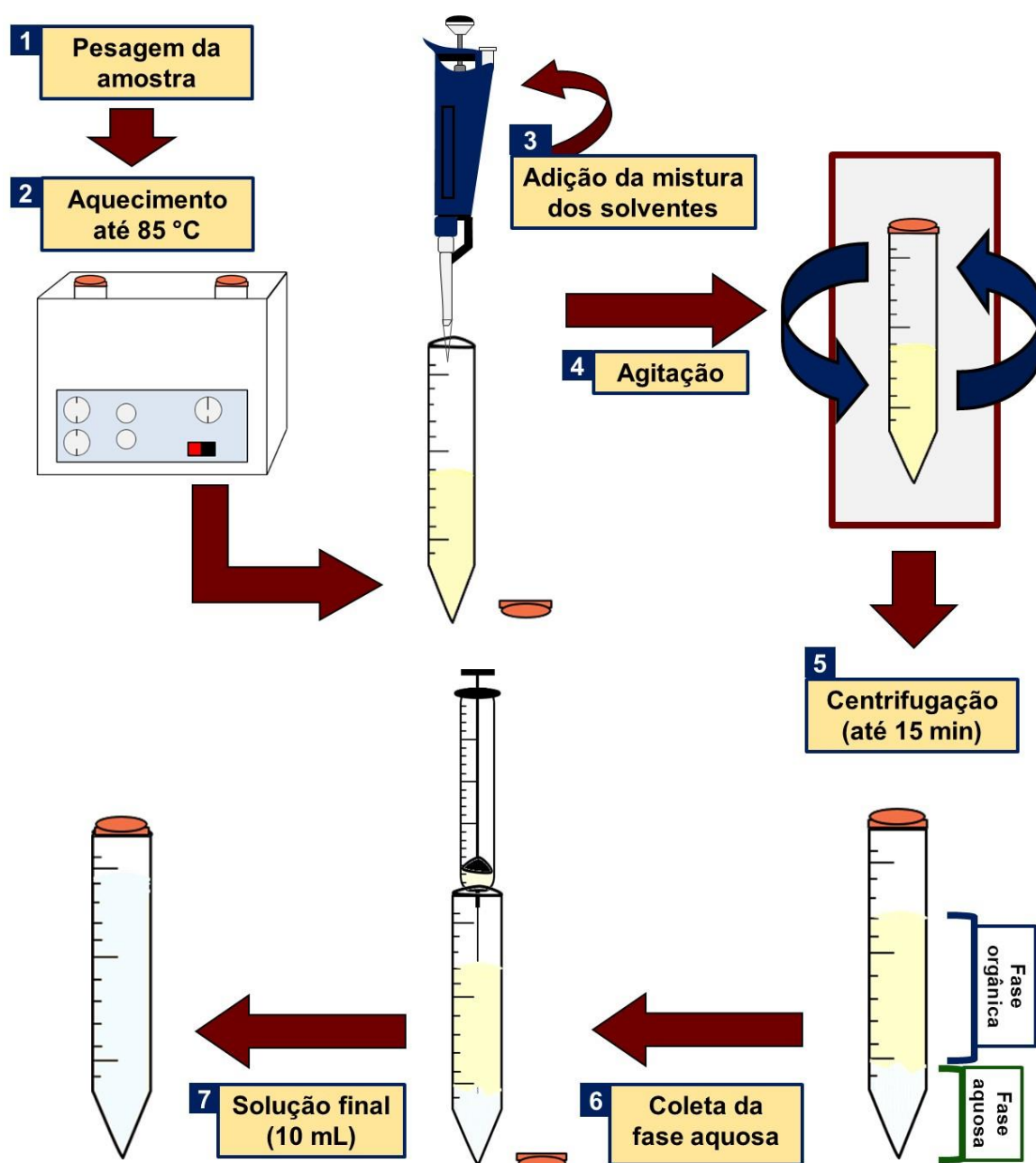
única de reação (SRC) foi despressurizado, os digeridos foram coletados e diluídos para 25 mL com água, para a posterior determinação de As, Cd, Pb, Co, Ni e V por ICP-MS e Hg por CVG-ICP-MS. Após a digestão da amostra, os frascos de quartzo foram descontaminados com 6 mL de HNO₃ concentrado e o seguinte programa de aquecimento foi utilizado: *i*) rampa de 10 min até 250 °C; *ii*) permanência por 15 min à 250 °C; e *iii*) resfriamento até atingir 65 °C. Posteriormente, os frascos foram lavados com água e secos com ar comprimido.

3.4.2 Microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa (RP-DLLME)

Estudos iniciais para o método da RP-DLLME foram feitos com base em dois trabalhos prévios reportados na literatura, dos quais foram feitas algumas adaptações. O primeiro trabalho empregado para a extração de metais alcalinos e alcalinos-terrosos em amostras de biodiesel, enquanto que o segundo trabalho foi utilizado para a extração de Cd, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn em amostras de óleo de peixe.^{18,20}

Dessa forma, aproximadamente 5 g de excipiente farmacêutico oleoso foram pesadas diretamente em frascos de polipropileno com capacidade máxima de 15 mL e com tampa. Em seguida, os frascos contendo a amostra foram aquecidos em banho de água quente sob temperatura controlada a 85 °C. Após, com o uso de um micropipetador, foi feita a adição de 1,0 mL da mistura dos solventes dispersor (isopropanol) e do extrator (1,0 mol L⁻¹ de HNO₃) utilizando a proporção dos solventes dispersor:extrator de 65:35% (v/v). Na sequência, a mistura foi então agitada manualmente por 1,0 min e centrifugada durante 15 min sob temperatura ambiente a 3450 rpm para a separação das fases. Em seguida, a fase aquosa (sedimentada) foi recolhida utilizando uma microsseringa, sendo a mesma transferida para outro frasco de polipropileno com capacidade máxima de 15 mL e avolumado a 10 mL com água. Todas as etapas envolvidas no método da RP-DLLME estão apresentadas na Figura 2.

Figura 2 – Etapas envolvidas no método da RP-DLLME: 1) pesagem da amostra; 2) aquecimento; 3) adição da mistura dos solventes dispersor e extrator; 4) agitação; 5) centrifugação e consequente separação das fases (orgânica e aquosa); 6) coleta da fase aquosa; 7) solução final (10 mL).



Para a otimização do método da RP-DLLME, foram feitos ensaios de recuperação com adição de $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$ de As, Cd, Hg, Pb, Co, Ni e V utilizando soluções de referência em matriz orgânica (como descrito na sessão 3.2 dos *Materiais e Métodos*). A amostra “A” foi usada para todas as avaliações dos parâmetros experimentais do método proposto. Para o desenvolvimento do método da RP-DLLME

e posterior determinação dos elementos das classes 1 e 2A em excipientes farmacêuticos oleosos por ICP-MS, foram avaliados os seguintes parâmetros experimentais: *i*) tipo de solvente dispersor (metanol, etanol, isopropanol e *n*-propanol); *ii*) proporção da mistura dos solventes dispersor e extrator (65:35, 50:50, 35:65 e 15:85% v/v, respectivamente); *iii*) tipo e concentração do solvente extrator (0,5, 1,0, 2,0 e 3,0 mol L⁻¹ de HNO₃, água); *iv*) volume total da solução de extração (1,0, 1,5 e 2,0 mL); *v*) massa de excipiente farmacêutico oleoso (5, 7,5 e 10 g); *vi*) temperatura (65, 75 e 85 °C) de aquecimento; *vii*) tempo de centrifugação (5, 10, 15 e 30 min de centrifugação e também sem centrifugação); e *viii*) tipo de agitação (ultrassom, orbital, vórtex e manual) e tempo de agitação (0,5, 1,0 e 2,0 min).

Além dos parâmetros e suas condições experimentais mencionadas, para Hg, foram feitos experimentos adicionais para avaliar o HCl como solvente extrator, sendo avaliado a concentração de HCl (2, 4, 6, 8 e 10 mol L⁻¹). Após a otimização das condições, o método da RP-DLLME foi aplicado para a extração de As, Cd, Pb, Co, Ni e V e posterior determinação por ICP-MS e Hg por CVG-ICP-MS em outras quatro amostras de excipientes farmacêuticos oleosos ("B", "C", "D" e "E").

3.5 AVALIAÇÃO DE INTERFERÊNCIAS DE CARBONO NA DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES POR ICP-OES, ICP-MS E CVG-ICP-MS

A avaliação do efeito da concentração de carbono foi investigada na determinação de As, Cd, Pb, Co, Ni e V por ICP-OES. Nesse estudo, foram preparadas soluções de referência contendo 20 ou 50 µg L⁻¹ de As, Cd, Pb, Co, Ni e V sem e com a adição de carbono nas concentrações de 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 mg L⁻¹ em HNO₃ 5% (v/v). Foi utilizado como fonte de carbono o *n*-propanol, usado como solvente dispersor no método de RP-DLLME. Esse estudo foi desenvolvido utilizando as mesmas condições experimentais do ICP-OES apresentadas na sessão 3.1 (*Materiais e Métodos*).

Posteriormente, o efeito da concentração de carbono foi investigado durante a determinação de As, Cd, Pb, Co, Ni e V por ICP-MS e Hg por CVG-ICP-MS. Para esse estudo, *n*-propanol também foi usado como fonte de carbono. As soluções de referência foram preparadas com 0,1, 0,5, 1,0 e 2,5 µg L⁻¹ de As, Cd, Pb, Co, Ni e V, e carbono nas concentrações de 25, 50, 100, 250 e 500 mg L⁻¹ em HNO₃ 5% (v/v). Além disso, foram preparadas soluções de referência contendo 1,0 µg L⁻¹ de Hg sem

e com adição de carbono nas concentrações de 25 até 500 mg L⁻¹ em HNO₃ 5% (v/v), para a posterior avaliação da interferência de carbono por CVG-ICP-MS. Esses estudos foram feitos usando as mesmas condições experimentais dos equipamentos de ICP-MS e CVG-ICP-MS apresentadas na sessão 3.1 (*Materiais e Métodos*).

3.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES POR ICP-MS

A validação do método da RP-DLLME foi conduzida de acordo com as recomendações da Eurachem.⁸¹ Para isso, os seguintes parâmetros foram avaliados: linearidade, precisão (intermediária e repetibilidade), robustez, exatidão, LOD e LOQ.

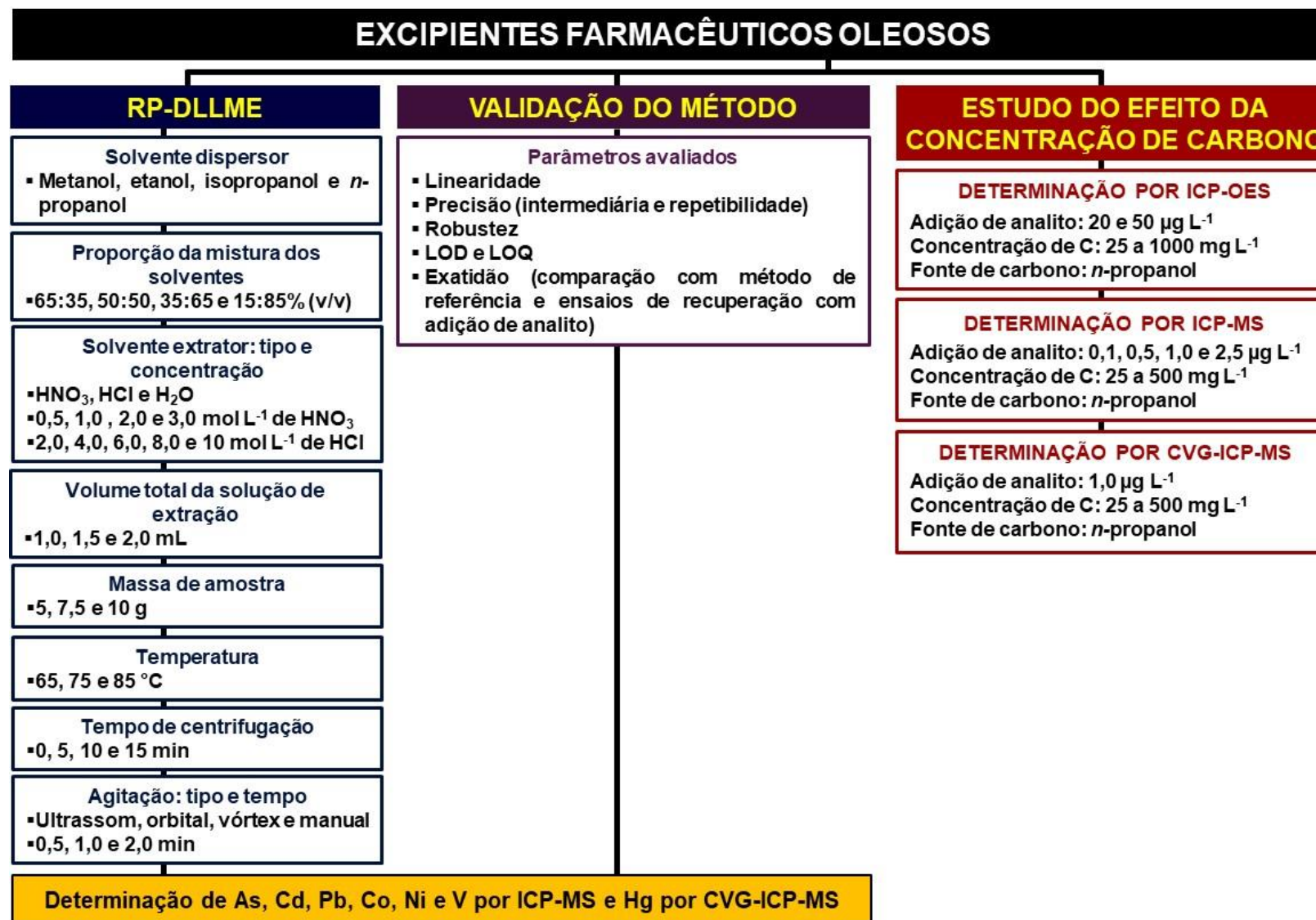
A linearidade foi avaliada usando o coeficiente de determinação (R²) das curvas analíticas obtidas por ICP-MS, sendo o valor mínimo aceitável para o R² de 0,9995. A precisão foi estimada com base no desvio padrão relativo obtido pela análise da amostra “A” em cinco dias diferentes em triplicata. Para isso, foi feita a adição de 1,0 µg g⁻¹ de todos os analitos utilizando as condições otimizadas para o método proposto. A robustez foi investigada usando a amostra “A” e adicionando 1,0 µg g⁻¹ de todos os analitos. Assim, foram feitas variações de 20%³³ (para mais e para menos) nas condições experimentais otimizadas dos seguintes parâmetros: proporção da mistura dos solventes dispersor e extrator, concentração do solvente extrator, volume total da mistura dos solventes, massa de amostra e tempo de centrifugação.

A fim de avaliar a exatidão do método desenvolvido, foi feita a comparação dos resultados obtidos por RP-DLLME e MAWD-SRC. Além disso, a exatidão foi também avaliada após a otimização do método da RP-DLLME, por ensaios de recuperação com adição de analito em diferentes níveis de concentração utilizando soluções de referência orgânica e também, conforme as recomendações do ICH Q3D. Os ensaios de recuperação foram feitos utilizando a amostra “A” adicionando As, Cd, Hg, Pb, Co, Ni e V na concentração máxima permitida em µg g⁻¹ de acordo com as recomendações previstas pelo ICH Q3D para a via de administração parental. Assim, a concentração dos elementos foi calculada da seguinte forma: $C = EDP / \text{dose diária do medicamento}$ (C = concentração do elemento, em µg g⁻¹; EDP = exposição diária permitida do elemento, em µg dia⁻¹; dose diária do medicamento = quantidade máxima do mesmo, em g que pode ser ingerida por dia). Dessa forma, a exatidão foi avaliada por ensaios de recuperação utilizando como 10 g a (maior dosagem diária de excipiente

farmacêutico oleoso), adicionando as seguintes concentrações para cada analito: As ($1,5 \mu\text{g g}^{-1}$), Cd ($0,2 \mu\text{g g}^{-1}$), Hg ($0,3 \mu\text{g g}^{-1}$), Pb ($0,5 \mu\text{g g}^{-1}$) Co ($0,5 \mu\text{g g}^{-1}$), Ni ($2,0 \mu\text{g g}^{-1}$) e V ($1,0 \mu\text{g g}^{-1}$). Além disso, foram feitos ensaios de recuperação com a adição de todos os analitos em diferentes níveis, a metade e o dobro dos valores recomendados pelo ICH Q3D. Esses ensaios foram adaptados para reduzir a quantidade de experimentos.

Por último, os cálculos dos LODs e LOQs (expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$) foram feitos da seguinte forma: $\text{LOD} = x + k \cdot \text{SD}$ e $\text{LOQ} = x + k \cdot \text{SD}$ (x = a média do branco medido; k = um fator numérico escolhido de acordo com o nível de confiança desejado, que era 3 para o LOD e 10 para o LOQ; SD = o desvio padrão do branco medido).⁸¹ Os brancos da RP-DLLME foram preparados utilizando o mesmo procedimento e reagentes conforme está descrito na sessão 3.4.2 (*Materiais e Métodos*). Para o cálculo dos LODs e LOQs, foram considerados a massa de amostra, o volume de aferição, bem como a diluição adequada para a medida por ICP-MS (RP-DLLME: 5 g e 10 mL; MAWD-SRC: 0,4 g e 25 mL). Na Figura 3 é mostrado um esquema geral dos parâmetros que foram avaliados no desenvolvimento desse estudo.

Figura 3 – Fluxograma dos procedimentos experimentais desenvolvidos neste estudo.



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, serão apresentados e discutidos os resultados obtidos ao longo do desenvolvimento do método de preparo de amostra proposto (RP-DLLME) para a posterior determinação de As, Cd, Pb, Co, Ni e V em excipientes farmacêuticos oleosos por ICP-MS e Hg por CVG-ICP-MS. Além disso, serão apresentados os resultados para os estudos de interferência de carbono na determinação dos analitos por ICP-OES, ICP-MS e CVG-ICP-MS. Posteriormente, será feita uma comparação das principais características do método proposto e de referência de acordo com a química analítica verde.

4.1 MÉTODO DE REFERÊNCIA: MAWD-SRC

Para a obtenção de valores de referência para o desenvolvimento do método proposto, as amostras de excipientes farmacêuticos oleosos foram digeridas por MAWD-SRC e a determinação dos analitos foi feita por ICP-MS. Para o procedimento de digestão, aproximadamente 0,4 g foram pesados diretamente nos frascos de quartzo com o auxílio de uma seringa e, foram adicionados 6 mL de HNO₃ concentrado sobre a amostra. Após, os frascos foram fechados, posicionados no rotor e inseridos na cavidade do forno de micro-ondas em sistema SRC. Foi aplicado o programa de irradiação descrito no item 3.4.1 (*Materiais e Métodos*). Após o término do aquecimento e resfriamento do sistema, os digeridos foram coletados em frascos de polipropileno e diluídos com água até 25 mL, sendo então, conduzidos para a etapa de determinação.^{80,82} Os resultados obtidos para As, Cd, Pb, Co, Ni e V por ICP-MS e Hg por CVG-ICP-MS estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Resultados obtidos para As, Cd, Pb, Co, Ni e V por ICP-MS e Hg por CVG-ICP-MS após MAWD-SRC (média ± desvio padrão, n= 5)

Elemento	Concentração, µg g ⁻¹				
	A	B	C	D	E
As	< 0,022*	< 0,022*	0,075 ± 0,004	< 0,022*	0,103 ± 0,005
Cd	< 0,005*	< 0,005*	0,067 ± 0,003	0,065 ± 0,003	< 0,005*
Hg	< 0,008*	< 0,008*	0,079 ± 0,003	< 0,008*	0,105 ± 0,005
Pb	< 0,075*	0,257 ± 0,009	< 0,075*	0,445 ± 0,019	0,463 ± 0,022
Co	< 0,004*	< 0,004*	< 0,004*	0,072 ± 0,002	< 0,004*
Ni	< 0,035*	0,137 ± 0,006	< 0,035*	< 0,035*	< 0,035*
V	< 0,051*	< 0,051*	< 0,051*	< 0,051*	< 0,051*

* Resultados inferiores ao LOD.

De acordo com a Tabela 5, para a amostra "A" os resultados foram inferiores aos LODs para todos os elementos. Em contrapartida, a amostra "E" foi a que apresentou as maiores concentrações de As e Pb. Além disso, apenas na amostra "B" foi possível a determinação de Ni, e o mesmo foi observado para Co na amostra "D". Para o V, os resultados foram inferiores ao LOD para todas as amostras. Enquanto que para Hg, apenas as amostras "C" e "E" tiveram resultados superiores ao LOD. É importante salientar que as soluções finais apresentaram aspecto límpido, sem a presença de resíduos de amostra mal decomposta.

Posteriormente, também foi feita a digestão das soluções de referência multielementar em meio orgânico (Cd, Pb, Ni e V) e monoelementares (As, Hg e Co) utilizadas para os ensaios de recuperação durante a otimização do método da RP-DLLME e na avaliação da exatidão do mesmo. Quanto aos resultados obtidos para As, Cd, Pb, Co, Ni e V por ICP-MS e Hg por CVG-ICP-MS, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os resultados obtidos (teste *t*-student, nível de confiança de 95%) e os valores certificados pelos fabricantes.

De acordo com o guia ICH Q3D, o desenvolvimento de métodos de preparo de amostras devem ser feitos com ensaios de recuperação com adição de analito. Por isso, a amostra "A" foi escolhida para a otimização do método da RP-DLLME, pois todos os analitos estão abaixo dos LODs.⁴

4.2 MÉTODO PROPOSTO: RP-DLLME

Inicialmente, foram adaptadas as condições experimentais usadas em métodos já reportados na literatura, os quais utilizam a RP-DLLME para a extração de Na, K, Ca e Mg em biodiesel e Ni em gordura vegetal hidrogenada.^{19,20} Para o método proposto neste estudo, aproximadamente 5 g de excipiente farmacêutico oleoso foram pesados diretamente em frascos de polipropileno (15 mL). Em seguida, os frascos contendo a amostra foram aquecidos em banho a 85 °C, foi adicionado 1,0 mL da mistura dos solventes dispersor:extrator na proporção de 65:35% (v/v). Após, a mistura foi então agitada por 1,0 min e centrifugada durante 15 min (3450 rpm), sob temperatura ambiente. Posteriormente, a fase aquosa foi coletada e transferida para outro frasco de polipropileno (15 mL) e o volume foi completado até 10 mL com água.

Para o desenvolvimento de um método eficiente empregando a RP-DLLME, faz-se necessário a avaliação das condições experimentais que afetam a extração das impurezas elementares presentes em excipientes farmacêuticos oleosos. Para isso, foram avaliados os seguintes parâmetros: tipo de solvente dispersor, proporção da mistura dos solventes dispersor e extrator, tipo e concentração do solvente extrator, volume total da solução de extração, massa de amostra, temperatura de aquecimento, tempo de centrifugação, tipo e tempo de agitação. A avaliação desses parâmetros foi feita utilizando a amostra "A" com adição de 1,0 µg g⁻¹ de As, Cd, Pb, Co, Ni e V. Os resultados obtidos nas avaliações envolvendo a determinação de Hg serão apresentados posteriormente. Além disso, no método da RP-DLLME é utilizado como

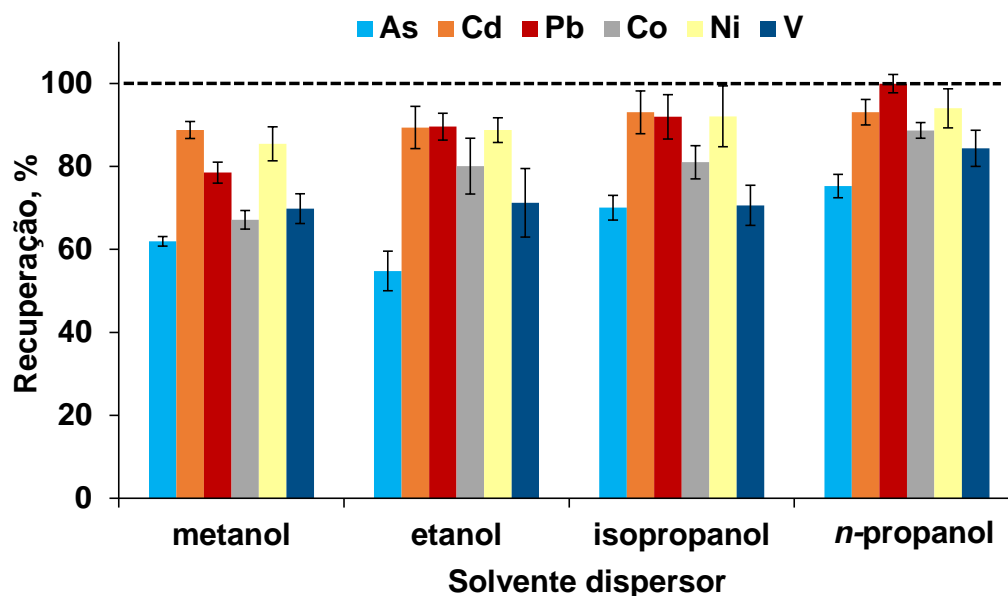
dispersar um solvente orgânico, sendo que o mesmo contribui para uma quantidade relativamente alta de carbono nas soluções finais. Por isso, foi feita a determinação de carbono, por ICP-OES nas soluções obtidas nas otimizações do método.

4.2.1 Avaliação do tipo de solvente dispersor

O solvente dispersor foi avaliado utilizando diferentes álcoois. O objetivo dessa avaliação foi escolher o dispersor que promovesse uma rápida e eficiente interação entre a amostra e o extrator. Para isso, foram avaliados estudos prévios reportados na literatura para conhecer os solventes dispersores já empregados nos procedimentos da microextração. Além dos estudos prévios, foi considerada a principal característica que o dispersor deveria apresentar, sendo a miscibilidade tanto na amostra orgânica quanto no solvente extrator, ocorrendo a dispersão do solvente extrator na amostra e conseqüente extração dos analitos.^{20,45,69}

A fim de investigar a influência do solvente dispersor nas recuperações dos analitos no método proposto, os seguintes solventes foram avaliados: metanol, etanol, isopropanol e *n*-propanol. Os experimentos foram conduzidos usando 5 g de excipiente farmacêutico oleoso "A" com adição de 1,0 µg g⁻¹ de As, Cd, Pb, Co, Ni e V e subsequente aquecimento da amostra em banho a 85 °C. Após, foi adicionada 1,0 mL da solução de extração composta por dispersor avaliado:HNO₃ 1,0 mol L⁻¹ (proporção 65:35% v/v, respectivamente), seguido de 1,0 min de agitação manual e 15 min de centrifugação. O procedimento experimental empregado está descrito no item 3.4.2 (*Materiais e Métodos*). As recuperações obtidas para As, Cd, Pb, Co, Ni e V usando os solventes dispersores avaliados, estão mostradas na Figura 4.

Figura 4 – Avaliação do tipo de solvente dispersor utilizado no método de RP-DLLME. Recuperações para (■) As, (■) Cd, (■) Pb, (■) Co, (■) Ni e (■) V. Determinação dos analitos por ICP-MS (as barras representam a média \pm RSD, n= 5). A linha tracejada representa recuperação equivalente a 100%.



De acordo com os resultados apresentados na Figura 4, foi possível observar que quando o metanol e o etanol foram utilizados, recuperações inferiores a 90% foram obtidas para todos os analitos. Com o uso de isopropanol, recuperações de 90 a 93% foram obtidas para Cd, Pb e Ni, enquanto que para As, Co e V as recuperações foram inferiores a 82%. Por outro lado, recuperações de 84 a 99% foram obtidas para Cd, Pb, Co, Ni e V, com exceção de As (75%) ao utilizar o *n*-propanol como solvente dispersor.

Além disso, a concentração de carbono presente nas soluções finais foi determinada por ICP-OES. Usando o metanol, etanol, isopropanol e *n*-propanol como solventes dispersores, as concentrações foram de 32,8, 37,6, 98,4 e 42,8 g L⁻¹ de carbono, respectivamente. Assim, *n*-propanol foi selecionado para a avaliação dos próximos parâmetros, uma vez que as recuperações obtidas foram superiores e o carbono presente nas soluções finais foi menor do que com o uso de isopropanol.

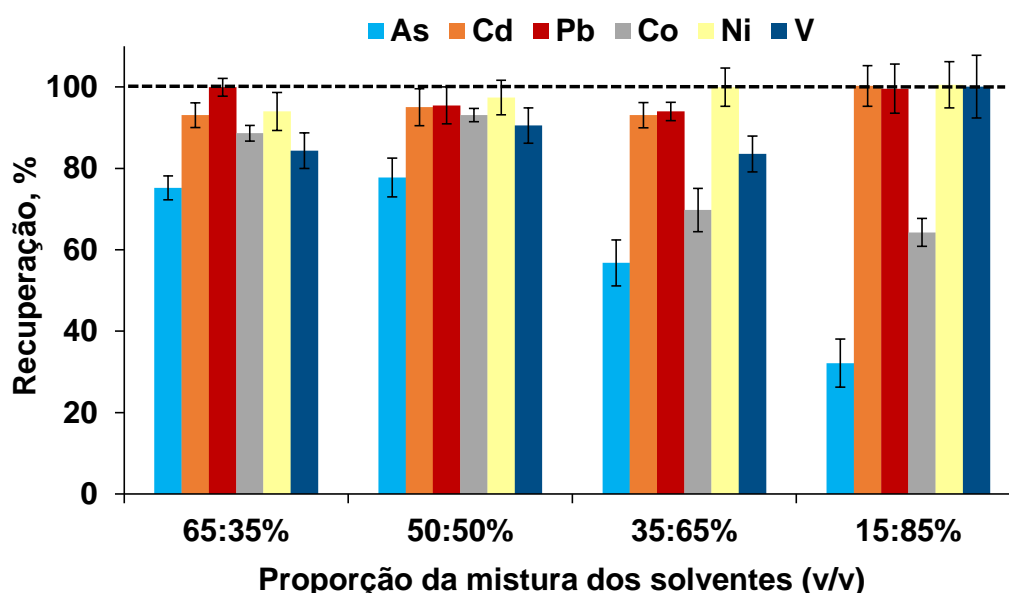
4.2.2 Avaliação da proporção da mistura dos solventes dispersor e extrator

A quantidade adicionada dos solventes dispersor e extrator é de grande importância para o processo de extração e pré-concentração dos analitos na RP-

DLLME. É importante salientar que, um excesso ou falta dos solventes pode acarretar na mudança da solubilidade do solvente extrator na amostra, afetando a eficiência da extração.^{19,20} A fim de obter recuperações quantitativas para todos os analitos e reduzir o carbono presente nas soluções finais, foi investigado a proporção adequada para a mistura dos solventes dispersor e extrator.

Dessa forma, no presente estudo foram avaliadas as proporções de 65:35, 50:50, 35:65 e 15:85% (v/v) de *n*-propanol:HNO₃ 1,0 mol L⁻¹, respectivamente, usando um volume total de 1,0 mL da solução de extração. Os experimentos foram feitos utilizando 5 g de amostra de excipiente farmacêutico oleoso "A" com adição de 1,0 µg g⁻¹ de As, Cd, Pb, Co, Ni e V, seguido do aquecimento a 85 °C. Após o aquecimento, foi feita a adição da solução de extração e subsequente agitação manual durante 1 min e centrifugação de 15 min. As recuperações obtidas para As, Cd, Pb, Co, Ni e V usando as proporções dos solventes dispersor e extrator avaliadas estão mostradas na Figura 5.

Figura 5 – Avaliação da proporção da mistura dos solventes dispersor:extrator utilizado no método de RP-DLLME. Recuperações para (■) As, (■) Cd, (■) Pb, (■) Co, (■) Ni e (■) V. Determinação dos analitos por ICP-MS (as barras representam a média ± RSD, n= 5). A linha tracejada representa recuperação equivalente a 100%.



Conforme os resultados apresentados na Figura 5, as recuperações de Cd, Pb e Ni foram superiores a 93% para todas as proporções da mistura de solventes dispersor e extrator avaliadas. Entretanto, ao utilizar uma menor quantidade de

solvente dispersor (proporções de 35:65 e 15:85%, v/v), foram obtidas baixas recuperações para As e Co (de 32,1 a 70,5%). Provavelmente, os volumes de 350 e 150 μL de solvente dispersor (proporções de 35:65 e 15:85%, v/v) foram ineficientes para promover uma dispersão adequada do solvente extrator com a amostra oleosa.

Por outro lado, ao utilizar uma solução contendo 650 μL de solvente dispersor (proporção de 65:35%, v/v), as recuperações foram superiores a 88% para Cd, Pb, Co e Ni (exceto para As e V que foram de 75 e 84%, respectivamente). Enquanto que ao utilizar 500 μL de solvente dispersor (proporção de 50:50%, v/v), as recuperações foram superiores a 90% para Cd, Pb, Co, Ni e V (exceto para As que foi de 78%). Dessa forma, esses resultados mostraram que o uso de volumes maiores de solvente dispersor é necessário para garantir uma maior dispersão do solvente extrator na amostra, isso já foi observado em estudos reportados na literatura.^{19,20}

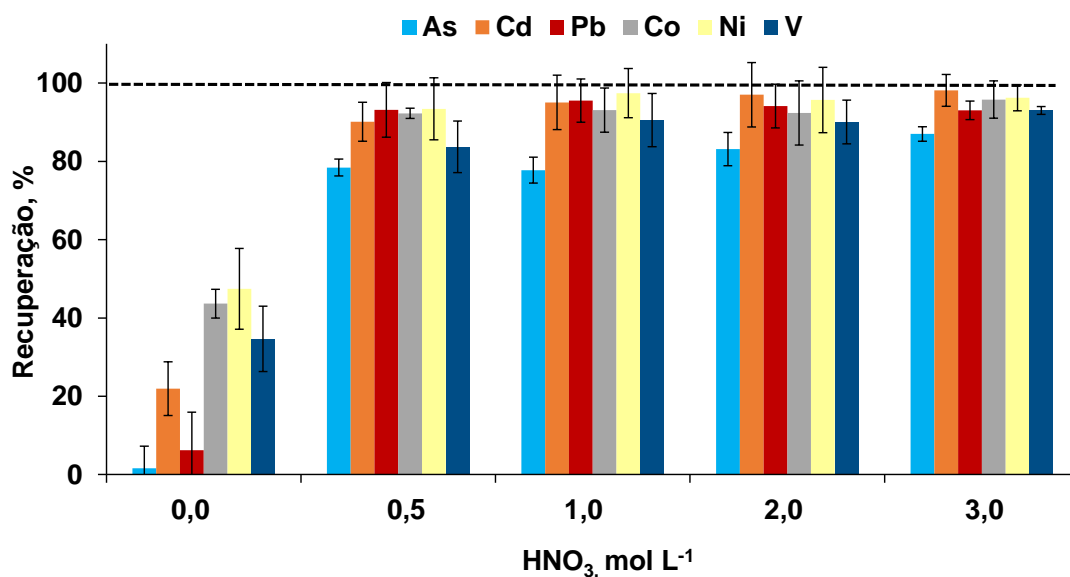
Assim, embora para as proporções 50:50 e 65:35% (v/v) as recuperações foram próximas a 100% para a maioria dos analitos, a condição de 50:50% (v/v) foi selecionada para os próximos experimentos, uma vez que a concentração de carbono em solução foi menor ($35,2 \text{ g L}^{-1}$) do que a proporção de 65:35% (v/v) ($42,8 \text{ g L}^{-1}$).

4.2.3 Avaliação do tipo e da concentração do solvente extrator

A fim de reduzir o consumo de reagentes, diminuir os valores de branco e ainda propor métodos de preparo de amostras mais verdes, a influência do tipo e da concentração do solvente extrator empregado foi avaliada. O solvente extrator geralmente utilizado em procedimentos de extração por RP-DLLME é o HNO_3 diluído, sendo que já foi avaliado $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ de HNO_3 para a extração de Al, Cd, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn em óleo diesel.⁶⁸

No presente estudo, foi avaliado como solvente extrator, a água e soluções de HNO_3 (0,5, 1,0, 2,0 e $3,0 \text{ mol L}^{-1}$). Os experimentos foram feitos usando 5 g de amostra de excipiente farmacêutico oleoso "A" com adição de $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$ de As, Cd, Pb, Co, Ni e V e subsequente aquecimento da amostra em banho a $85 \text{ }^\circ\text{C}$. Após, foi adicionada 1,0 mL da solução de extração composta por *n*-propanol:extrator avaliado (proporção 50:50% v/v, respectivamente), seguido de 1,0 min de agitação manual e 15 min de centrifugação. As recuperações obtidas para As, Cd, Pb, Co, Ni e V a partir da avaliação do tipo e da concentração do solvente extrator são mostradas na Figura 6.

Figura 6 – Avaliação do tipo e da concentração do solvente extrator utilizado no método de RP-DLLME. Recuperações para (■) As, (■) Cd, (■) Pb, (■) Co, (■) Ni e (■) V. Determinação dos analitos por ICP-MS (as barras representam a média \pm RSD, $n=5$). A linha tracejada representa recuperação equivalente a 100%.



De acordo com os resultados apresentados na Figura 6, quando a água foi usada como solvente extrator, recuperações muito baixas (1 a 48%) foram obtidas para todos os analitos. Além disso, para as soluções de HNO₃ 0,5 e 1,0 mol L⁻¹, foram obtidas recuperações inferiores a 78% para As, enquanto para Cd, Pb, Co, Ni e V as recuperações foram acima de 84%. Quanto à condição de 2,0 mol L⁻¹ de HNO₃, as recuperações variaram no intervalo de 83 a 97% para todos os analitos. Entretanto, recuperações de 92 a 98% foram obtidas para todos os analitos (com exceção de As, que foi de 87%) ao utilizar 3,0 mol L⁻¹ de HNO₃ como solvente extrator.

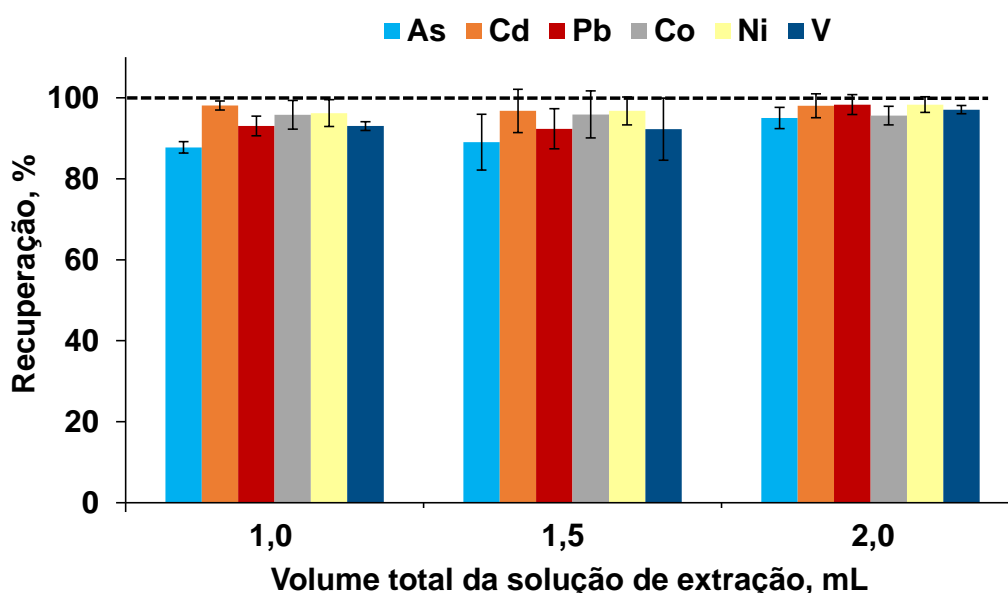
Esses resultados demonstraram que a concentração de HNO₃ influencia na eficiência da extração de todos os analitos investigados neste estudo, conforme já observado em estudos anteriores.^{18,19,68} Neste estudo, as soluções de HNO₃ muito diluídas (0,5, 1,0 e 2,0 mol L⁻¹) foram insuficientes para promover a completa extração dos analitos presentes na amostra. Portanto, a condição de 3,0 mol L⁻¹ de HNO₃ foi escolhida para a avaliação dos subseqüentes parâmetros devido às melhores recuperações e também menores RSDs ao comparar com a condição de 2,0 mol L⁻¹ de HNO₃ (5 e 8% para 3,0 e 2,0 mol L⁻¹, respectivamente).

4.2.4 Avaliação do volume total da solução de extração

A influência do volume total da solução de extração foi avaliada com o intuito de garantir que os solventes necessários para a extração estejam em quantidades apropriadas, favorecendo uma extração com maior eficiência. Além disso, com o objetivo de melhorar as recuperações dos analitos, principalmente para As e V.

Essa investigação foi feita avaliando os volumes de 1,0, 1,5 e 2,0 mL da solução de extração composta por *n*-propanol:HNO₃ 3,0 mol L⁻¹ (proporção 50:50% v/v, respectivamente). Os experimentos foram feitos usando 5 g de amostra de excipiente farmacêutico oleoso "A" com adição de 1,0 µg g⁻¹ de As, Cd, Pb, Co, Ni e V e subsequente aquecimento da amostra em banho a 85 °C. Após, foi adicionada a solução de extração, seguido de 1,0 min de agitação manual e 15 min de centrifugação. As recuperações obtidas para As, Cd, Pb, Co, Ni e V estão mostradas na Figura 7.

Figura 7 – Avaliação do volume total da solução de extração utilizado no método de RP-DLLLME. Recuperações para (■) As, (■) Cd, (■) Pb, (■) Co, (■) Ni e (■) V. Determinação dos analitos por ICP-MS (as barras representam a média ± RSD, n= 5). A linha tracejada representa recuperação equivalente a 100%.



É possível observar na Figura 7 que com o uso de 1,0 mL da solução de extração, as recuperações foram de 92 a 98% para Cd, Pb, Co, Ni e V e de 87% para As. Além disso, utilizando 1,5 mL, a recuperação de As foi de 89% e superior a 92%

para os demais analitos. Por outro lado, recuperações de 94 a 99% foram obtidas para todos os analitos quando utilizado 2,0 mL da solução de extração. Esses resultados podem ser atribuídos, à necessidade de uma maior quantidade dos solventes para garantir a extração dos analitos de forma eficiente. Assim, o volume total da solução de extração utilizado para as avaliações subsequentes foi de 2,0 mL.

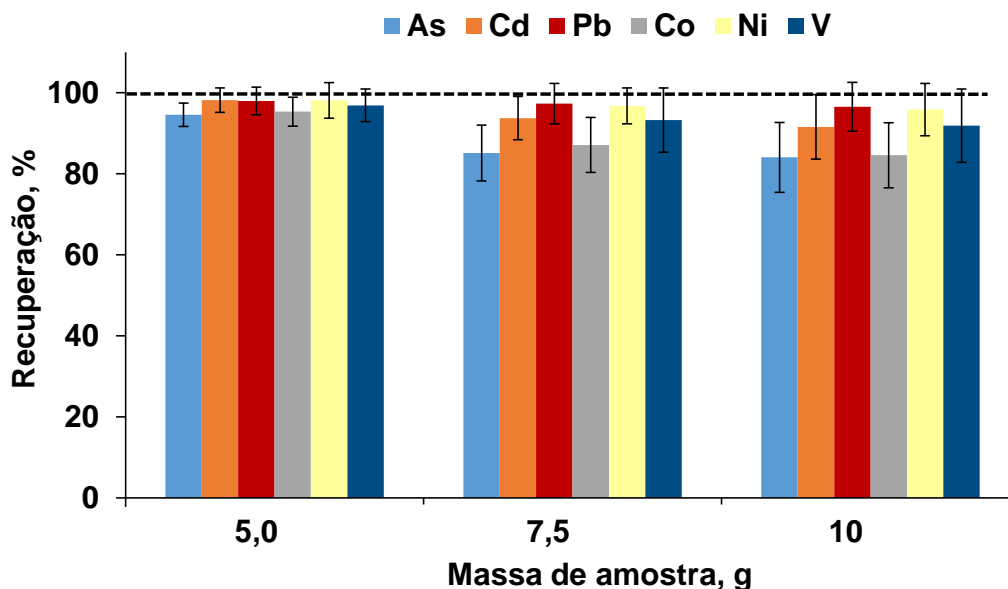
4.2.5 Avaliação da massa de amostra

Uma das principais vantagens do método da RP-DLLME é o uso de massas elevadas de amostra (até 10 g)^{18,20,45} ao comparar com outros métodos de preparo de amostras que utilizam sistemas fechados de digestão, que para estes o recomendado é geralmente até 0,5 g^{12,17} (dependendo da amostra). Assim, com o uso de elevada massa de amostra é possível obter LODs e LOQs menores, sendo uma das vantagens importantes para a determinação de impurezas elementares em concentrações baixas, como é o caso das amostras de excipientes farmacêuticos oleosos.^{9,18}

Nesse sentido, para o desenvolvimento do método proposto, foi avaliada a influência do uso de 5, 7,5 e 10 g de amostra. Cabe destacar que na maioria dos estudos que utilizam o método da RP-DLLME, foram empregadas massas de amostra iguais ou superiores a 5 g, por isso, neste estudo esta foi a menor massa avaliada.^{18,19,20,45,68}

Os experimentos foram conduzidos usando a amostra de excipiente farmacêutico oleoso "A" com adição de 1,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ de As, Cd, Pb, Co, Ni e V e subsequente aquecimento da amostra em banho a 85 °C. Após, foi adicionada 2,0 mL da solução de extração composta por *n*-propanol:HNO₃ 3,0 mol L⁻¹ (proporção 50:50% v/v, respectivamente). Em seguida, foi feita a agitação manual durante 1,0 min e a centrifugação por 15 min. As recuperações obtidas para As, Cd, Pb, Co, Ni e V usando as massas de amostra avaliadas estão mostradas na Figura 8.

Figura 8 – Avaliação da massa de amostra utilizada no método de RP-DLLME. Recuperações para (■) As, (■) Cd, (■) Pb, (■) Co, (■) Ni e (■) V. Determinação dos analitos por ICP-MS (as barras representam a média \pm RSD, n=5). A linha tracejada representa recuperação equivalente a 100%.



Conforme os resultados apresentados na Figura 8, quando 5 g de massa de amostra foram usados, as recuperações foram de 94 a 99% para As, Cd, Pb, Co, Ni e V. Para a massa de 7,5 g, as recuperações para As e Co foram de 85 e 87%, respectivamente, enquanto que para os demais analitos foi superior a 92%. Além disso, para 10 g de amostra, as recuperações para As, Cd, Pb, Co, Ni e V variaram de 84 a 97%. Esses resultados podem ser atribuídos a dificuldade de os solventes interagirem eficientemente com a amostra quando massas maiores são empregadas.

Por isso, quando 10 g de amostra foram empregadas, os RSDs para todos os analitos foram superiores (10%) aos obtidos com 5 g de amostra (até 5%). Desta forma, para garantir uma extração mais eficiente e consequentemente recuperações quantitativas para todos os analitos com menores RSDs, foi escolhido 5 g de excipiente farmacêutico oleoso como massa de amostra para os próximos experimentos.

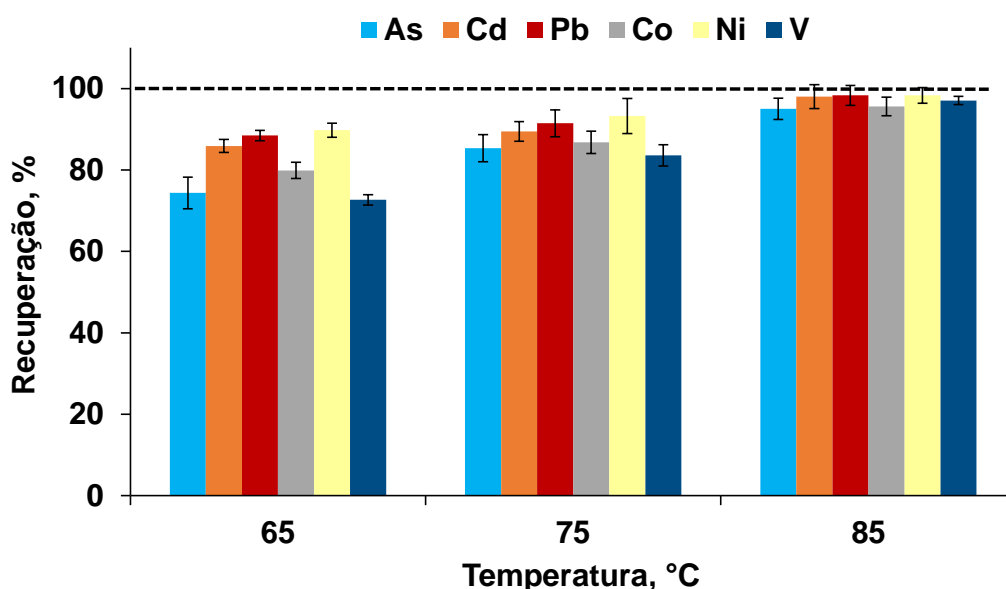
4.2.6 Avaliação da temperatura

Recentemente, alguns estudos reportaram a importância do controle da temperatura durante a etapa de aquecimento de amostras oleosas em métodos de

extração por RP-DLLME. Nesses estudos prévios, foram avaliadas temperaturas de 40 até 90 °C, sendo que as temperaturas maiores foram mais eficientes.^{20,21,68} No caso de excipientes farmacêuticos oleosos, em todos os experimentos feitos, a amostra permaneceu sob aquecimento a 85 °C. Porém, esse parâmetro foi investigado a fim de avaliar a possibilidade do emprego de temperaturas menores, que ainda assim, garantissem a eficiência de extração dos analitos.

Essa investigação foi feita avaliando as temperaturas de 65, 75 e 85 °C. Os experimentos foram feitos utilizando as condições experimentais, até então otimizadas: 5 g de excipiente farmacêutico oleoso “A” com adição de 1,0 µg g⁻¹ de As, Cd, Pb, Co, Ni e V, aquecimento da amostra em banho, subsequente adição de 2,0 mL da solução de extração composta por *n*-propanol:HNO₃ 3,0 mol L⁻¹ (proporção 50:50% v/v, respectivamente), seguido de 1,0 min de agitação e 15 min de centrifugação). As recuperações obtidas para As, Cd, Pb, Co, Ni e V estão mostradas na Figura 9.

Figura 9 – Avaliação da temperatura utilizada no método de RP-DLLME. Recuperações para (■) As, (■) Cd, (■) Pb, (■) Co, (■) Ni e (■) V. Determinação dos analitos por ICP-MS (as barras representam a média ± RSD, n= 5). A linha tracejada representa recuperação equivalente a 100%.



De acordo com os resultados apresentados na Figura 9, ao utilizar a temperatura de 65 °C foram obtidas recuperações inferiores a 80% para As, Co e V e superiores a 84% para Cd, Pb e Ni. Além disso, com o uso de 75 °C, recuperações de 83 a 93% com RSDs de até 8% foram obtidos para todos os analitos. Por último,

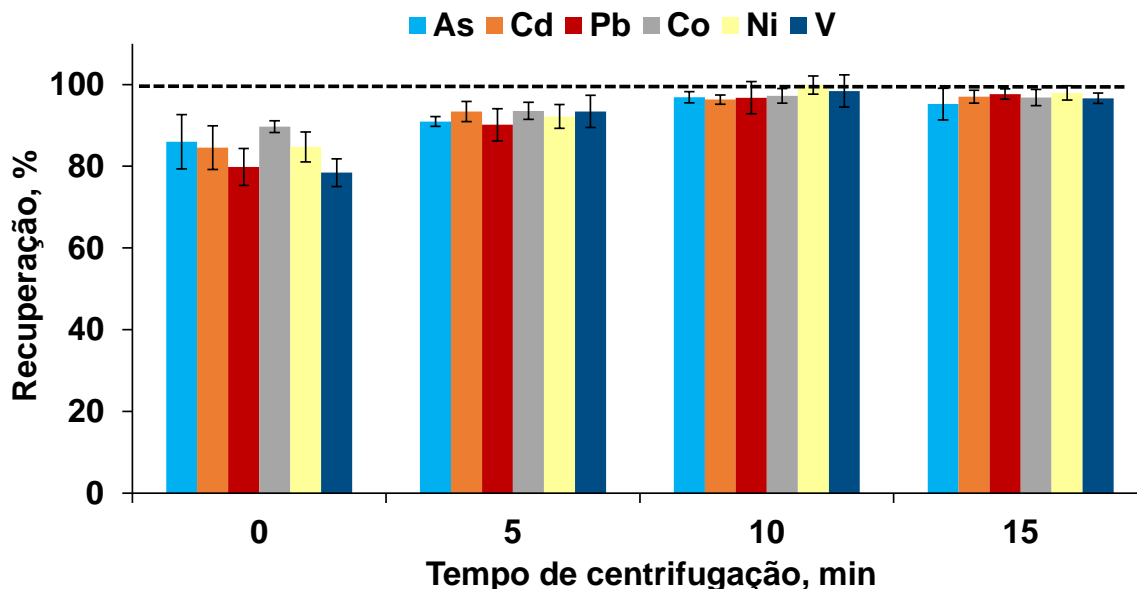
recuperações acima de 94% com RSDs inferiores a 5% foram obtidos para todos os analitos com o uso de 85 °C. Esses resultados estão concordantes com estudos reportados na literatura, nos quais temperaturas mais elevadas contribuíram para a eficiência da extração dos analitos.^{20,45} Provavelmente, temperaturas mais elevadas permitiram o aumento dos coeficientes de difusão dos analitos e, portanto, melhoraram a eficiência da extração.^{20,21} Assim, a fim de obter melhores recuperações e menores RSDs, a temperatura de 85 °C foi mantida para os próximos experimentos.

4.2.7 Avaliação do tempo de centrifugação

A centrifugação tem sido utilizada para a completa sedimentação da fase aquosa, fase esta que contém os analitos a serem determinados. Nesse sentido, o tempo de centrifugação foi avaliado a fim de diminuir o tempo de processamento das amostras garantindo ainda assim, a completa separação das fases e recuperação dos analitos.^{20,21,65}

No presente estudo, foram avaliados os tempos de 5, 10 e 15 min de centrifugação. Além disso, um experimento sem o uso da centrifugação também foi feito. Os experimentos foram feitos usando as condições experimentais, até então, otimizadas: 5 g de excipiente farmacêutico oleoso "A" com adição de 1,0 µg g⁻¹ de As, Cd, Pb, Co, Ni e V, aquecimento da amostra em banho a 85 °C, subsequente adição de 2,0 mL da solução de extração composta por *n*-propanol:HNO₃ 3,0 mol L⁻¹ (proporção 50:50% v/v, respectivamente), seguido de 1,0 min de agitação. As recuperações obtidas para As, Cd, Pb, Co, Ni e V estão mostradas na Figura 10.

Figura 10 – Avaliação do tempo de centrifugação utilizado no método de RP-DLLME. Recuperações para (■) As, (■) Cd, (■) Pb, (■) Co, (■) Ni e (■) V. Determinação dos analitos por ICP-MS (as barras representam a média \pm RSD, n=5). A linha tracejada representa recuperação equivalente a 100%.



Conforme os resultados apresentados na Figura 10, sem o uso da centrifugação, as recuperações foram inferiores a 90% para todos analitos. Em conformidade com estudos já reportados na literatura, a centrifugação é fundamental para a completa sedimentação da fase aquosa no método da RP-DLLME.^{18,21}

Neste estudo desenvolvido para excipientes farmacêuticos oleosos, quando foi avaliado 5 min de centrifugação, recuperações superiores a 89% foram obtidas para todos os analitos. Além disso, nos tempos de 10 e 15 min de centrifugação, foram atingidas recuperações de 94 a 99% para todos os analitos. Esses resultados podem ser atribuídos, à necessidade de um tempo maior de centrifugação para garantir que a separação das fases seja eficiente, a fim de promover a completa extração dos analitos para a fase aquosa. Assim, como não foram observadas diferenças estatísticas (teste *t*-student, nível de confiança de 95%) entre os resultados obtidos com 10 e 15 min de centrifugação, foi escolhido como tempo 10 min para as avaliações dos próximos parâmetros.

4.2.8 Avaliação do tipo e tempo de agitação

A agitação é importante para promover a interação dos solventes com a amostra, contribuindo para a extração dos analitos para a fase aquosa. Em estudos

recentes, diferentes formas de agitação têm sido avaliadas em métodos de RP-DLLME, desde o uso do ultrassom, orbital, vórtex e manual.^{19,21}

Neste estudo, foram avaliados os tempos de 0,5, 1,0 e 2,0 min de agitação com o ultrassom (frequência de 37 kHz), orbital (200 rpm), vórtex (1000 rpm) ou manual. Os experimentos foram feitos usando as condições, até então, otimizadas: 5 g de excipiente farmacêutico oleoso "A" com adição de 1,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ de As, Cd, Pb, Co, Ni e V, aquecimento da amostra em banho a 85 °C, subsequente adição de 2,0 mL da solução de extração composta por *n*-propanol: 3,0 mol L⁻¹ de HNO₃ (proporção de 50:50% v/v, respectivamente), seguido da agitação e centrifugação por 10 min.

Com a agitação manual de 0,5 min, recuperações inferiores a 93% para As, Co e V, e superiores a 95% para Cd, Pb e Ni foram obtidas. Nos tempos de 1,0 e 2,0 min de agitação manual, as recuperações foram superiores a 94% para todos os analitos.

Para os experimentos utilizando o ultrassom como uma forma de agitação após a injeção da mistura dos solventes dispersor e extrator sobre a amostra, os resultados para todos os tempos avaliados foram superiores a 90% para Cd, Pb e Ni, enquanto que para As, Co e V foram inferiores a 85%. Assim, os resultados obtidos ao usar o ultrassom como agitação foram insatisfatórios ao comparar com os obtidos pela agitação manual. Esses resultados estão de acordo com os estudos já reportados na literatura empregando a RP-DLLME, em que o ultrassom demonstrou não ser uma forma de agitação adequada em experimentos por RP-DLLME.^{20 21} O ultrassom foi eficiente em métodos de extração onde o solvente dispersor não foi utilizado.³⁶ Porém, no presente estudo, foi utilizado um solvente dispersor e possivelmente por isso, justifica-se ele não ter sido eficiente.

Além disso, foi avaliada a agitação manual, orbital e vórtex. Os resultados obtidos para as diferentes formas de agitação foram superiores a 94% para todos os analitos utilizando 1,0 min de agitação. Assim, tanto a agitação manual, orbital como por vórtex podem ser empregadas sem prejudicar os resultados, porém, para os subsequentes experimentos foi utilizada a agitação manual durante 1,0 min.

4.2.9 Estudos adicionais para Hg

Como a determinação de Hg foi feita por CVG-ICP-MS, a condição otimizada para os demais analitos foi, posteriormente, empregada para Hg. Para este analito, foi avaliado como solvente extrator as soluções de HNO₃ (3,0 mol L⁻¹) e o HCl (10 mol L⁻¹)

1). Cabe destacar que a concentração de HCl utilizada foi escolhida em conformidade com um estudo prévio reportado na literatura.⁸³

Para este estudo, os experimentos foram feitos usando 5 g de excipiente farmacêutico oleoso "A" com adição de $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$ de Hg, aquecimento da amostra em banho a $85 \text{ }^\circ\text{C}$, subsequente adição de 2,0 mL da solução de extração composta por *n*-propanol:dispersor avaliado (proporção de 50:50% v/v, respectivamente), seguido da agitação durante 1,0 min e centrifugação por 10 min.

Quanto aos resultados obtidos, empregando como solvente extrator o HNO_3 ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$) a recuperação de Hg foi extremamente baixa (inferior a 4%). Porém, utilizando o HCl (10 mol L^{-1}) como solvente extrator, foi obtido 94% de recuperação nas condições otimizadas para os demais analitos. Os resultados obtidos estão em concordância com estudos prévios para Hg em que o HCl foi empregado.^{83,84,85} Em seguida, foi feita a avaliação da concentração de HCl (2, 4, 6, 8 e 10 mol L^{-1}). Sendo que, para as concentrações de 4 e 2 mol L^{-1} as recuperações de Hg foram inferiores a 90%. Enquanto que as concentrações de 6, 8 e 10 mol L^{-1} resultaram em recuperações de Hg superiores a 94%. Assim, para os subsequentes experimentos foi utilizada a concentração de 6 mol L^{-1} de HCl.

Diante disso, a validação do método foi feita utilizando as condições escolhidas para a determinação As, Cd, Pb, Co, Ni e V por ICP-MS e Hg por CVG-ICP-MS.

4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DA RP-DLLME

Utilizando as condições otimizadas do método proposto, a validação do método foi feita de acordo com a Eurachem⁸¹ e os seguintes parâmetros foram avaliados: linearidade, precisão (intermediária e repetibilidade), robustez, exatidão (em três níveis), LOD e LOQ. Para a determinação por ICP-MS de As, Cd, Pb, Co, Ni e V e de Hg por CVG-ICP-MS, foram preparadas soluções em HNO_3 5% (v/v) contendo de 0,025 a $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Os R^2 obtidos para as curvas de calibração foram superiores a 0,9995 para todos os analitos, indicando uma adequada resposta linear. Quanto aos resultados para a precisão (intermediária e repetibilidade), esses foram considerados adequados, uma vez que apresentaram RSDs inferiores a 5% em todas as condições escolhidas.

Além disso, a robustez foi avaliada por meio de variações de 20% (para mais e para menos) nas condições experimentais otimizadas para a posterior determinação

dos analitos.³³ Sendo os seguintes parâmetros investigados: proporção da mistura dos solventes dispersor e extrator (40:60 e 60:40%, v/v), concentração do solvente extrator (HNO_3 2,4 e 3,6 mol L⁻¹ e HCl 4,8 e 7,2 mol L⁻¹), volume total da solução de extração (1,6 e 2,4 mL), massa de amostra (4,0 e 6,0 g) e tempo de centrifugação (8 e 12 min). Os resultados foram concordantes com os obtidos para as condições otimizadas, sendo observado uma variação inferior a 5%, por isso o método foi considerado robusto.

A exatidão do método proposto foi avaliada pela comparação dos resultados com os obtidos pelo método de referência. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas (teste *t*, nível de confiança de 95%) em comparação com os valores de referência para as impurezas elementares, sendo as concordâncias próximas a 100% e os RSDs inferiores a 5%. Posteriormente, a exatidão também foi avaliada por ensaios de recuperação com adição dos analitos. Os ensaios consistiram na adição dos analitos em sua concentração máxima permitida para a via de administração parenteral de acordo com o ICH Q3D. Para isso, foi considerado a dose diária máxima do excipiente (10 g) e as exposições máximas diárias permitidas para cada elemento, sendo para As (15 µg dia⁻¹), Cd (2 µg dia⁻¹), Hg (3 µg dia⁻¹), Pb (5 µg dia⁻¹), Co (5 µg dia⁻¹), Ni (20 µg dia⁻¹) e V (10 µg dia⁻¹).⁴ Assim, os ensaios foram conduzidos utilizando a amostra “A” com a adição de As, Cd, Hg, Pb, Co, Ni e V em diferentes níveis (0,2, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 µg) a partir de soluções de referência oleosas. Os resultados obtidos para este estudo estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Ensaio de recuperação conforme o ICH Q3D e em diferentes níveis de concentração dos analitos (valores em %, média ± RSD, n= 5).

Adição, µg g ⁻¹	Recuperação (%)						
	As	Cd	Hg	Pb	Co	Ni	V
0,2	95 ± 3	100 ± 3	95 ± 3	95 ± 2	97 ± 1	95 ± 4	95 ± 4
0,5	98 ± 3	99 ± 2	96 ± 4	98 ± 4	98 ± 2	95 ± 3	96 ± 2
1,0	97 ± 1	97 ± 3	94 ± 3	96 ± 3	96 ± 3	96 ± 3	96 ± 3
1,5	99 ± 2	97 ± 2	95 ± 3	96 ± 3	97 ± 2	97 ± 3	96 ± 3
2,0	99 ± 3	98 ± 2	94 ± 2	97 ± 3	96 ± 2	99 ± 3	97 ± 2

Conforme os resultados mostrados na Tabela 6, foram obtidas recuperações de 94 a 100% com RSDs inferiores a 5% para As, Cd, Hg, Pb, Co, Ni e V em diferentes níveis de concentração (0,2 a 2,0 µg g⁻¹), o que demonstrou a aplicabilidade do método

proposto para a extração das impurezas elementares em excipientes farmacêuticos oleosos mesmo quando presentes em concentrações distintas.

Com a utilização da técnica de ICP-MS e CVG-ICP-MS para a determinação das impurezas elementares, foram obtidos limites de detecção e quantificação baixos para o método proposto da RP-DLLME. Os LODs e LOQs obtidos foram expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ sendo calculados a partir do desvio padrão de 10 leituras do branco, levando ambos em consideração a massa de amostra utilizada, o volume final de aferição, bem como a diluição adequada na etapa de determinação. Os valores de LODs obtidos pelo método proposto foram 0,014, 0,002, 0,001, 0,006, 0,002, 0,012 e 0,031 $\mu\text{g g}^{-1}$ para As, Cd, Hg, Pb, Co, Ni e V, respectivamente. Enquanto que os valores para os LOQs foram 0,045, 0,006, 0,003, 0,020, 0,006, 0,040 e 0,102 $\mu\text{g g}^{-1}$ para As, Cd, Hg, Pb, Co, Ni e V, respectivamente. Os limites de detecção e quantificação obtidos viabilizam a determinação das impurezas elementares em níveis inferiores aos limites máximos recomendados pelo ICH Q3D.

4.4 DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES EM EXCIPIENTES FARMACÊUTICOS OLEOSOS APÓS RP-DLLME

Após todas as otimizações, o método da RP-DLLME foi aplicado para outras quatro amostras de excipientes farmacêuticos oleosos, sendo as amostras "B" (óleo de rícino), "C" (óleo de soja), "D" (óleo de soja) e "E" (óleo de soja), a fim de verificar a aplicabilidade do método proposto a possíveis variações na matriz da amostra. Além disso, para comparação dos resultados, todas as amostras empregadas no desenvolvimento do estudo foram digeridas usando a MAWD-SRC (método de referência). Na Tabela 7 estão apresentados os resultados obtidos por ICP-MS após RP-DLLME e MAWD-SRC.

Tabela 7 – Resultados obtidos para As, Cd, Pb, Co, Ni e V por ICP-MS e Hg por CVG-ICP-MS após a aplicação da RP-DLLME para excipientes farmacêuticos oleosos. Resultados em $\mu\text{g g}^{-1}$ (média \pm desvio padrão, n= 5).

Analito	Método	Amostra				
		A	B	C	D	E
As	RP-DLLME	< 0,014	< 0,014	0,074 \pm 0,003	< 0,014	0,107 \pm 0,003
	MAWD-SRC	< 0,022	< 0,022	0,075 \pm 0,004	< 0,022	0,103 \pm 0,005
Cd	RP-DLLME	< 0,002	< 0,002	0,065 \pm 0,002	0,063 \pm 0,003	< 0,002
	MAWD-SRC	< 0,005	< 0,005	0,067 \pm 0,003	0,065 \pm 0,003	< 0,005
Hg	RP-DLLME	< 0,001	< 0,001	0,081 \pm 0,004	< 0,001	0,102 \pm 0,004
	MAWD-SRC	< 0,008	< 0,008	0,079 \pm 0,003	< 0,008	0,105 \pm 0,005
Pb	RP-DLLME	< 0,006	0,261 \pm 0,008	0,076 \pm 0,003	0,455 \pm 0,021	0,476 \pm 0,017
	MAWD-SRC	< 0,075	0,257 \pm 0,009	< 0,075	0,445 \pm 0,019	0,463 \pm 0,022
Co	RP-DLLME	< 0,002	< 0,002	< 0,002	0,071 \pm 0,003	< 0,002
	MAWD-SRC	< 0,004	< 0,004	< 0,004	0,072 \pm 0,002	< 0,004
Ni	RP-DLLME	< 0,012	0,141 \pm 0,005	< 0,012	< 0,012	< 0,012
	MAWD-SRC	< 0,035	0,137 \pm 0,006	< 0,035	< 0,035	< 0,035
V	RP-DLLME	< 0,031	< 0,031	< 0,031	< 0,031	< 0,031
	MAWD-SRC	< 0,051	< 0,051	< 0,051	< 0,051	< 0,051

Conforme os resultados apresentados na Tabela 7, não houve diferença significativa (teste *t*, nível de confiança de 95%) entre os resultados obtidos para As, Cd, Hg, Pb, Co e Ni após os métodos da RP-DLLME e MAWD-SRC (determinação por ICP-MS). Os RSDs para o método proposto foram inferiores a 5%. Além disso, a concentração de V em todas as amostras avaliadas foi abaixo dos LODs para ambos os métodos (RP-DLLME e MAWD-SRC). A concentração de Pb na amostra "C" foi inferior ao LOD do método de referência (0,075 $\mu\text{g g}^{-1}$), mas superior ao LOD para RP-DLLME (0,006 $\mu\text{g g}^{-1}$), mostrando a aplicabilidade do método proposto. Os resultados obtidos para todos os analitos na amostra "A" foram abaixo dos LODs para ambos os métodos.

Os LODs obtidos para o método de referência foram de 0,022, 0,005, 0,008, 0,075, 0,004, 0,035 e 0,051 $\mu\text{g g}^{-1}$ para As, Cd, Hg, Pb, Co, Ni e V. Enquanto que os LOQs de 0,073, 0,016, 0,025, 0,255, 0,013, 0,117 e 0,168 $\mu\text{g g}^{-1}$ para As, Cd, Hg, Pb, Co, Ni e V, respectivamente.

4.5 COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS EMPREGADOS

Neste estudo, foi investigado a RP-DLLME como método de preparo de amostras de excipientes farmacêuticos oleosos e posterior determinação de As, Cd, Pb, Co, Ni e V por ICP-MS e Hg por CVG-ICP-MS. Ao final do desenvolvimento do método proposto, as condições foram comparadas com aquelas usadas no método de referência (MAWD-SRC). Na Tabela 8 é apresentado uma comparação geral do método da RP-DLLME e do método da MAWD-SRC.

Tabela 8 – Comparação do método proposto com o método de referência para a posterior determinação de impurezas elementares em excipientes farmacêuticos oleosos.

Parâmetro	Métodos de preparo de amostras empregados	
	MAWD-SRC	RP-DLLME
Massa de amostra, g	0,4	5,0
Aferição final das soluções, mL	25	10
Solução utilizada	6 mL HNO ₃ 14 mol L ⁻¹	1 mL de HNO ₃ 3 mol L ⁻¹ ou HCl 6 mol L ⁻¹
Temperatura, °C	270	85
Tempo de digestão/extração*	1 h e 50 min	20 min***
Frequência analítica, 2 h**	5 amostras	40 amostras
Adequabilidade das soluções finais obtidas para a determinação por ICP-MS	Diluição das amostras devido a acidez residual	Diluição das amostras devido a concentração de carbono em solução

*Considerando o tempo total de preparo, a etapa de descontaminação (no caso da MAWD-SRC) e manipulação da amostra.

**Considerando apenas uma replicata por amostra e o tempo de preparo da amostra (sem a determinação dos analitos).

***Não está considerado a etapa de centrifugação (a cada 10 min são 8 amostras processadas).

De acordo com a Tabela 8, como método de referência foi utilizado a MAWD-SRC, sendo digeridos 0,4 g de excipiente farmacêutico oleoso usando 6 mL de HNO₃ concentrado, 270 °C e 30 min. É importante ressaltar que, para este método são empregados frascos de quartzo e forno micro-ondas de custo elevado. Enquanto que para o método da RP-DLLME, foi utilizado uma instrumentação simples e de baixo custo. O método proposto, conferiu um alto fator de enriquecimento dos analitos, rapidez, simplicidade, consumo reduzido de reagentes o que consequentemente contribui para a menor geração de resíduos. O método da RP-DLLME foi adequado

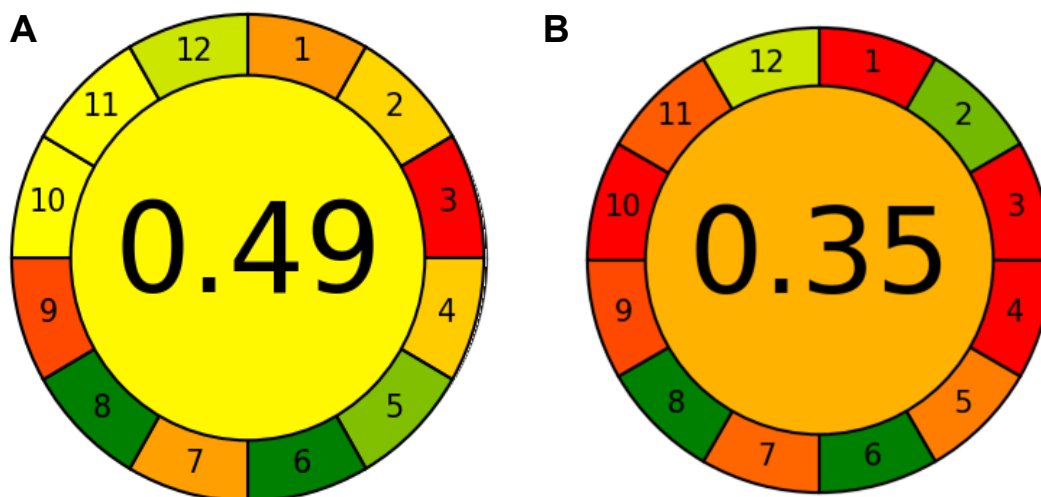
para posterior determinação de todos os analitos, porém não foi utilizado o mesmo solvente extrator para Hg.

Com o uso da RP-DLLME foi possível a utilização de elevada massa de amostra, levando a obtenção de menores LODs e LOQs, quando comparado ao método de referência usado neste estudo (MAWD-SRC). Ainda, não foi necessário o uso de ácidos concentrados para as extrações por RP-DLLME, sendo utilizado apenas um volume baixo de ácidos diluído, este é um aspecto importante relacionado a menor geração de resíduos e consumo de reagentes.

Todos estes aspectos podem ser avaliados mediante a uma investigação de quão o método pode ser considerado adequado em conformidade a química analítica verde. Para isso, foi utilizado um estudo prévio da literatura para realizar a comparação entre o método proposto e o método de referência, contabilizando aspectos da química analítica verde com base na métrica *Analytical GREENness* (software AGREE).

Esta ferramenta permite avaliar métodos analíticos desde a coleta da amostra até a determinação dos analitos, incluído as etapas de preparo de amostra e o descarte de resíduos. Existem os dados de entrada que são os 12 princípios da química verde, e cada dado informado é transformado em uma escala de 0 a 1 de acordo com a escalas de cores vermelha, amarela e verde. Em contrapartida, os dados de saída geram um gráfico no formato de um círculo, onde no centro é apresentado a pontuação geral e nas laterais ao redor as pontuações específicas para cada dado de entrada informado. As informações inseridas nos dados de entrada sobre o método proposto e de referência são apresentadas no *Anexo (item 4)*. Os resultados da comparação estão apresentados na Figura 11A para o método proposto e 11B para o método de referência.

Figura 11 – Avaliação dos métodos de preparo de amostras de acordo com a análise feita pelo software AGREE para **(A)** RP-DLLME e **(B)** MAWD-SRC com determinação dos analitos por ICP-MS e CVG-ICP-MS.



Conforme a Figura 11A, o método da RP-DLLME obteve uma pontuação geral de 0,49. Em contrapartida, o método da MAWD-SRC teve um desempenho inferior ao comparar com o método proposto, apresentado uma pontuação geral de 0,35 (Figura 11B). Dentre os 12 princípios da química analítica verde apresentados em um estudo recente⁷⁹, o desempenho do método proposto variou de bom a excelente em 4 princípios. Apenas os princípios 1, 3, 7 e 9 foram limitados, devido abordarem respectivamente o uso preferível da análise direta, a forma de análise (seja *in-line*, *on-line*, *at-line* e *off-line*), geração de resíduo e a técnica de determinação utilizada, não atendidos na RP-DLLME com ICP-MS. Porém, para determinar impurezas elementares a partir de técnicas espectrométricas, geralmente é preciso um tratamento prévio da amostra, uma vez que a montagem tradicional da maioria destes equipamentos exige a introdução da amostra na forma de suspensão ou solução aquosa.

Ao considerar o método de referência (Figura 11B), apenas o princípio 6 e 8 tiveram um desempenho excelente no que diz respeito a evitar o procedimento de derivatização e quanto ao número de amostras analisadas em 1 h. Além disso, os princípios 2 e 12 tiveram um desempenho bom quanto a quantidade de amostra utilizada (0,4 g) e a segurança do operador. Por outro lado, a pontuação para os outros princípios variou de amarelo a vermelho por se tratar de um método não miniaturizado,

requer diversas etapas durante o preparo de amostras e utiliza ácido concentrado, o que resulta na geração de resíduos com maior toxicidade.

O tratamento prévio da amostra e a análise *off-line* foram empregados em ambos os métodos, porém, outras vantagens foram observadas ao utilizar o método proposto. Em geral, o uso de ácido concentrado foi desnecessário e a geração de resíduo foi reduzida. A frequência analítica aumentou de 3 para 24 amostras por hora. Portanto, o método proposto pode ser considerado uma possível alternativa para cumprir os princípios da química analítica verde na determinação dos elementos das classes 1 e 2A em excipientes farmacêuticos oleosos de acordo com os princípios apresentados recentemente na literatura.⁷⁹

5 CONCLUSÃO

Neste estudo, um novo método de preparo de amostra foi desenvolvido utilizando a RP-DLLME para a posterior determinação de As, Cd, Pb, Co, Ni e V por ICP-MS e Hg por CVG-ICP-MS. Neste caso, com o método da RP-DLLME foi possível promover a análise de amostras de excipientes farmacêuticos oleosos utilizados em medicamentos injetáveis e subsequente determinação de impurezas elementares.

Durante o desenvolvimento do método, buscou-se a simplicidade, rapidez, reduzido uso de reagentes e, principalmente um método alternativo que atendesse aos princípios da química analítica verde. Neste estudo, foi possível a extração e pré-concentração dos elementos das classes 1 e 2A.

O método da RP-DLLME, por sua vez, foi aplicado para a determinação de As, Cd, Hg, Pb, Co, Ni e V em excipientes farmacêuticos oleosos, utilizando o aquecimento da amostra em banho a 85 °C, adicionando 1 mL de *n*-propanol (solvente dispersor) e 1 mL de HNO₃ 3 mol L⁻¹ ou 1 mL de HCl 6 mol L⁻¹ (solventes extratores), seguido de 1,0 min de agitação manual e 10 min de centrifugação. Cabe destacar que os resultados obtidos por RP-DLLME não apresentaram diferença significativa (teste *t*-student) quando comparados com os valores obtidos pelo método de referência (MAWD-SRC), demonstrando a exatidão do método proposto. Adicionalmente, ensaios de recuperação com adição de analito foram feitos em diferentes níveis de concentração conforme as recomendações do ICH Q3D. Os resultados obtidos para as recuperações foram entre 94 e 100% com RSDs entre 1 e 4%, o que demonstrou a aplicabilidade do método desenvolvido.

A utilização da RP-DLLME e a detecção por ICP-MS e CVG-ICP-MS, permitiu a obtenção de limites de detecção e quantificação que viabilizam a determinação das impurezas elementares em níveis inferiores aos limites máximos recomendados pelo ICH Q3D. Ademais, o método proposto pode ser considerado simples e rápido, uma vez que envolve poucas etapas e de fácil operação com o uso de uma instrumentação relativamente simples

REFERÊNCIAS

1. CHAUDHARI, S. P.; PATIL, P. S. Pharmaceutical excipients: a review. **International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 21-34, 2012.
2. ZARMPI, P.; FLANAGAN, T.; MEEHAN, E.; MANN, J.; FOTAKI, N. Biopharmaceutical aspects and implications of excipient variability in drug product performance. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 111, p. 1-15, 2017.
3. STRICKLEY, R. G. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. **Pharmaceutical research**, v. 21, n. 2, p. 201-230, 2004.
4. **Guideline for Elemental Impurities Q3D(R1). International Council For Harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use.**
<https://www.ich.org/products/guidelines/quality/qualitysingle/article/guideline-for-elemental-impurities-copy-1.html>: 2017.
5. PIFFERI, G.; RESTANI, P. The safety of pharmaceutical excipients. **Il Farmaco**, v. 58, n. 8, p. 541-550, 2003.
6. SIMS, E. E.; WORTHINGTON, H. E. C. Formulation studies on certain oily injection products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 24, n. 2, p. 287-296, 1985.
7. RAYMOND C ROWE, P. J. S. E. S. C. O. Handbook of pharmaceutical excipients. **APhA Publications**, 2006.
8. ANTES, F. G.; MESKO, M. F.; BARIN, J. S.; MOREIRA, C. M.; FLORES, É. M. M.; DRESSLER, V. L. Development of multi-elemental method for quality control of parenteral component solutions using ICP-MS. **Microchemical Journal**, v. 98, n. 1, p. 144-149, 2011.
9. BARIN, J. S.; MELLO, P. A.; MESKO, M. F.; DUARTE, F. A.; FLORES, E. M. M. Determination of elemental impurities in pharmaceutical products and related matrices by ICP-based methods: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 17, p. 4547-4566, 2016.
10. POHL, P.; DZIMITROWICZ, A.; JEDRYCZKO, D.; SZYMCZYCHA-MADEJA, A.; WELNA, M.; JAMROZ, P. The determination of elements in herbal teas and medicinal plant formulations and their tisanes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 130, p. 326-335, 2016.
11. PINHEIRO, F. C.; BARROS, A. I.; NOBREGA, J. A. Microwave-assisted sample preparation of medicines for determination of elemental impurities in compliance

- with United States Pharmacopeia: How simple can it be? **Analytica chimica acta**, v. 1065, p. 1-11, 2019.
12. MULLER, A. L. H.; OLIVEIRA, J. S. S.; MELLO, P. A.; MULLER, E. I.; FLORES, E. M. M. Study and determination of elemental impurities by ICP-MS in active pharmaceutical ingredients using single reaction chamber digestion in compliance with USP requirements. **Talanta**, v. 136, p. 161-169, 2015.
 13. LIN, M.-L.; JIANG, S.-J. Determination of trace Cr, Mo, Pd, Cd, Pt and Pb in drug tablets by ultrasonic slurry sampling electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 26, n. 9, p. 1813-1818, 2011.
 14. RUDOVICA, V.; VIKSNA, A.; ACTINS, A. Application of LA-ICP-MS as a rapid tool for analysis of elemental impurities in active pharmaceutical ingredients. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 91, p. 119-122, 2014.
 15. LEWEN, N. The use of atomic spectroscopy in the pharmaceutical industry for the determination of trace elements in pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 4, p. 653-661, 2011.
 16. USP. Elemental Impurities - Limits The United States Pharmacopeia, United States Pharmacopeial Convention Rockville, 2013.
 17. BARIN, J. S.; TISCHER, B.; PICOLOTO, R. S.; ANTES, F. G.; DA SILVA, F. E. B.; PAULA, F. R.; FLORES, E. M. M. Determination of toxic elements in tricyclic active pharmaceutical ingredients by ICP-MS: a critical study of digestion methods. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 29, n. 2, p. 352-358, 2014.
 18. KALSCHNE, D. L.; CANAN, C.; BARIN, J. S.; PICOLOTO, R. S.; LEITE, O. D.; FLORES, E. L. M. Reversed-Phase Dispersive Liquid-Liquid Microextraction (RP-DLLME) as a Green Sample Preparation Method for Multielement Determination in Fish Oil by ICP-OES. **Food Analytical Methods**, v. 13, n. 1, p. 230-237, 2020.
 19. KALSCHNE, D. L.; CANAN, C.; BEATO, M. O.; LEITE, O. D.; FLORES, E. L. M. A new and feasible analytical method using reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction (RP-DLLME) for further determination of Nickel in hydrogenated vegetable fat. **Talanta**, v. 208, p. 120409, 2020.
 20. LOURENÇO, E. C.; EYNG, E.; BITTENCOURT, P. R. S.; DUARTE, F. A.; PICOLOTO, R. S.; FLORES, E. L. M. A simple, rapid and low cost reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of Na, K, Ca and Mg in biodiesel. **Talanta**, v. 199, p. 1-7, 2019.
 21. OZZEYBEK, G.; SAHIN, I.; ERARPAT, S.; BAKIRDERE, S. Reverse phase dispersive liquid-liquid microextraction coupled to slotted quartz tube flame atomic absorption spectrometry as a new analytical strategy for trace

- determination of cadmium in fish and olive oil samples. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 90, p. 103486, 2020.
22. SANITÁRIA, A. N. D. V. Resolução - RDC N° 34. **Diário Oficial da União**, 2015.
 23. SENA, L. C. S.; DOS SANTOS, J. L. A.; ANDRADE, P. H. S.; BRITO, G. D. C.; LIRA, A. A. M.; LOBO, I. M. F. Excipientes farmacêuticos e seu risco à saúde: uma revisão da literatura. **Revista Brasileira de Farmácia Hospitalar e Serviços de Saúde**, v. 5, n. 4, 2014.
 24. APTE, S. P.; UGWU, S. O. **A review and classification of emerging excipients in parenteral medications**. *Pharmaceutical Technology*. 27: 46+ p. 2003.
 25. STRICKLEY, R. G.; ANDERSON, B. D. Solubilization and stabilization of an anti-HIV thiocarbamate, NSC 629243, for parenteral delivery, using extemporaneous emulsions. **Pharmaceutical research**, v. 10, n. 7, p. 1076-1082, 1993.
 26. FAST, J. P.; MECOZZI, S. Nanoemulsions for intravenous drug delivery. In: (Ed.). **Nanotechnology in drug delivery**: Springer, 2009. p.461-489.
 27. SCHULTZ, K.; MOLLGAARD, B.; FISHER, A. N.; ILLUM, L.; LARSEN, C. Intramuscular rate of disappearance of oily vehicles in rabbits investigated by gamma-scintigraphy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 169, n. 1, p. 121-126, 1998.
 28. CANNON, J. B.; LONG, M. A. 11 Emulsions, Microemulsions, and Lipid-Based Drug Delivery Systems for Drug Solubilization and Delivery—Part II: Oral Applications. **Water-Insoluble Drug Formulation**, 2018.
 29. KALEPU, S.; MANTHINA, M.; PADAVALA, V. Oral lipid-based drug delivery systems – an overview. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 3, n. 6, p. 361-372, 2013.
 30. PŁACZEK, M.; JACYNA, J.; SZNITOWSKA, M. Prolonged-release drug formulations for parenteral administration. Part I. Suspensions and oily solutions for injection. **Polski Merkuriusz Lekarski: Organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego**, v. 35, n. 210, p. 391-396, 2013.
 31. LARSEN, D. H.; FREDHOLT, K.; LARSEN, C. Assessment of rate of drug release from oil vehicle using a rotating dialysis cell. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 3, p. 223-229, 2000.
 32. BOETZEL, R.; CESZLAK, A.; DAY, C.; DRUMM, P.; BEJAR, J. G.; GLENNON, J.; HARRIS, L.; HEGHES, C. I.; HORGA, R.; JACOBS, P. L. An elemental impurities excipient database: a viable tool for ICH Q3D drug product risk assessment. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 107, n. 9, p. 2335-2340, 2018.

33. USP. Elemental Impurities - Procedures The United States Pharmacopeia, United States Pharmacopeial Convention Rockville, 2013.
34. KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. Métodos de preparo de amostras para análise elementar. **Sociedade Brasileira de Química, São Paulo**, 2016.
35. SILVA, C. S.; PINHEIRO, F. C.; AMARAL, C. D. B.; NOBREGA, J. A. Determination of As, Cd, Hg and Pb in continuous use drugs and excipients by plasma-based techniques in compliance with the United States Pharmacopeia requirements. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 138, p. 14-17, 2017.
36. SIMS, J.; SMITH, A.; PATEL, D.; BATCHELOR, R.; CARREIRA, J. Automated sample preparation for ICP analysis of active pharmaceutical ingredients and intermediates. **JALA: Journal of the Association for Laboratory Automation**, v. 16, n. 5, p. 377-380, 2011.
37. AGUIAR, G.; BATISTA, B.; DE PAULA, E.; CAMPIGLIA, A.; BARBOSA, F. A Fast Ultrasound-assisted Extraction Sample Preparation for Multi-elemental Determination of Contaminants in Pharmaceutical Ingredients by ICP-MS. **Atomic Spectroscopy**, v. 38, n. 6, p. 165-173, 2017.
38. ARRUDA, M. Trends in Sample Preparation, Nova Science Pub. Inc, **New York**, 2007.
39. FLORES, E. M. M. **Microwave-assisted sample preparation for trace element determination**. Newnes, 2014.
40. JANCHEVSKA, K.; STAFILOV, T.; MEMED-SEJFULAH, S.; BOGDANOSKA, M.; UGARKOVIC, S.; PETRUSHEVSKI, G. ICH Q3D based elemental impurities study in liquid pharmaceutical dosage form with high daily intake–comparative analysis by ICP-OES and ICP-MS. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 46, n. 3, p. 456-461, 2020.
41. LI, G.; SCHONEKER, D.; ULMAN, K. L.; STURM, J. J.; THACKERY, L. M.; KAUFFMAN, J. F. Elemental impurities in pharmaceutical excipients. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 12, p. 4197-4206, 2015.
42. GONZALEZ, M. H.; SILVA, C. S. D.; AMARAL, C. D.; BIANCHI, S. R.; DE OLIVEIRA, L. H.; COELHO, J. S.; OLIVEIRA, A.; NOGUEIRA, A. R. A. Determination of elemental impurities in acyclovir ointment and raw materials using microwave acid digestion (MW-AD) and ICP-MS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 1, p. 98-105, 2017.
43. PINHEIRO, F. C.; BARROS, A. I.; NOBREGA, J. A. Elemental impurities analysis in name-brand and generic omeprazole drug samples. **Heliyon**, v. 6, n. 2, p. e03359, 2020.
44. TU, Q.; WANG, T.; ANTONUCCI, V. High-efficiency sample preparation with dimethylformamide for multi-element determination in pharmaceutical materials

- by ICP-AES. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 52, n. 2, p. 311-315, 2010.
45. LOPEZ-GARCIA, I.; VICENTE-MARTINEZ, Y.; HERNANDEZ-CORDOBA, M. Determination of cadmium and lead in edible oils by electrothermal atomic absorption spectrometry after reverse dispersive liquid–liquid microextraction. **Talanta**, v. 124, p. 106-110, 2014.
46. PAAR, A. Anton Paar, Multiwave 3000, Operator Manual. Graz, 1998. **Anton Paar, Multiwave 3000, Operator Manual. Graz, 1998. Disponível em: <http://www.rofa.at/Leaflet/Apaar/MW3000.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2021,**
47. BARCLAY, D. Microwave digestion moves in to 21st century. **JACS**, p. 28-32, 2004.
48. MILESTONE. **Milestone, Srl UltraWave, Operator Manual**. Sorisole, 2013. Disponível em: <https://milestonesci.wpengine.com/wp-content/uploads/2019/09/ultraWAVE-brochure-single-pages-US-REV010419.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2021.,
49. REZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2342-2357, 2010.
50. ROSA, F. C.; DUARTE, F. A.; PANIZ, J. N. G.; HEIDRICH, G. M.; NUNES, M. A.; FLORES, E. M. M.; DRESSLER, V. L. Dispersive liquid–liquid microextraction: An efficient approach for the extraction of Cd and Pb from honey and determination by flame atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 123, p. 211-217, 2015.
51. SEEGER, T. S.; ROSA, F. C.; BIZZI, C. A.; DRESSLER, V. L.; FLORES, E. M. M.; DUARTE, F. A. Feasibility of dispersive liquid–liquid microextraction for extraction and preconcentration of Cu and Fe in red and white wine and determination by flame atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 105, p. 136-140, 2015.
52. FETTER, N.; BLICHERT-TOFT, J.; TÉLOUK, P.; ALBARÈDE, F. Extraction of Pb and Zn from crude oil for high-precision isotopic analysis by MC-ICP-MS. **Chemical Geology**, v. 511, p. 112-122, 2019.
53. TOKAY, F.; BAGDAT, S. Extraction of nickel from edible oils with a complexing agent prior to determination by FAAS. **Food chemistry**, v. 197, p. 445-449, 2016.
54. KHAJEH, M. Optimization of microwave-assisted extraction procedure for zinc and copper determination in food samples by Box-Behnken design. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, n. 4, p. 343-346, 2009.
55. QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para

- posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.
56. REZAEI, M.; ASSADI, Y.; HOSSEINI, M.-R. M.; AGHAEI, E.; AHMADI, F.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, n. 1-2, p. 1-9, 2006.
57. MDLULI, N. S.; NOMNGONGO, P. N.; MKETO, N. A Critical Review on Application of Extraction Methods Prior to Spectrometric Determination of Trace-Metals in Oily Matrices. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, p. 1-18, 2020.
58. KOCÚROVÁ, L.; BALOGH, I. S.; ŠANDREJOVÁ, J.; ANDRUCH, V. Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction using organic solvents lighter than water. A review. **Microchemical Journal**, v. 102, p. 11-17, 2012.
59. ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, A.; GRZEŚKOWIAK, T. Dispersive liquid-liquid microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 9, p. 1382-1399, 2011.
60. MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; BARBOSA, S. C.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) fundamentos e aplicações. 2012.
61. PSILLAKIS, E.; KALOGERAKIS, N. Developments in liquid-phase microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 9, p. 565-574, 2003.
62. CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011.
63. DADFARNIA, S.; SHABANI, A. M. H. Recent development in liquid phase microextraction for determination of trace level concentration of metals—A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 658, n. 2, p. 107-119, 2010.
64. HASHEMI, P.; RAEISI, F.; GHIASVAND, A. R.; RAHIMI, A. Reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction with central composite design optimization for preconcentration and HPLC determination of oleuropein. **Talanta**, v. 80, n. 5, p. 1926-1931, 2010.
65. TAKASHIMA, G. M. D. S. **Microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa para a determinação de cobre, cromo e níquel em biodiesel por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica**. Programa de pós-graduação em química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.

66. SILVA, K. R. N. **Avaliação da microextração líquido-líquido dispersiva reversa como estratégia para o preparo de amostra de biodiesel para determinação de Ca, Mg, Na e K por espectrometria atômica.** Programa de pós-graduação em química, Universidade Federal de Grande Dourados, 2017.
67. SOROURADDIN, S. M.; FARAJZADEH, M. A.; OKHRAVI, T. Application of deep eutectic solvent as a disperser in reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of Cd (II) and Zn (II) ions from oil samples. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 93, p. 103590, 2020.
68. DELPINO, I. S. **Determinação de contaminantes em óleo diesel por ICP-OES empregando a microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa.** Programa de pós-graduação em tecnologias ambientais, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2017.
69. REIS, P. K. **Microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa assistida por vórtex para determinação de Fe, Mg e Zn em óleos vegetais por espectrometria de absorção atômica.** 2018. Programa de pós-graduação em química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2018
70. WOLLEIN, U.; BAUER, B.; HABERNEGG, R.; SCHRAMEK, N. Potential metal impurities in active pharmaceutical substances and finished medicinal products—A market surveillance study. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 77, p. 100-105, 2015.
71. STOVING, C.; JENSEN, H.; GAMMELGAARD, B.; STURUP, S. Development and validation of an ICP-OES method for quantitation of elemental impurities in tablets according to coming US pharmacopeia chapters. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 84, p. 209-214, 2013.
72. CHAHROUR, O.; MALONE, J.; COLLINS, M.; SALMON, V.; GREENAN, C.; BOMBARDIER, A.; MA, Z.; DUNWOODY, N. Development and validation of an ICP-MS method for the determination of elemental impurities in TP-6076 active pharmaceutical ingredient (API) according to USP< 232>/< 233. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 145, p. 84-90, 2017.
73. KINGSTON, H. M., WALTER, P. J. The art and science of microwave sample preparations for trace and ultratrace elemental analysis, A. Montaser (Ed.) Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, John Wiley & Sons inc, Nova Iorque, 1998, pp. 33-83.
74. GINÉ, M. F. Espectroscopia de Emissão Atômica com Plasma Acoplado Indutivamente-ICP-AES. **Centro de Energia Nuclear na Agricultura-CENA/USP**, 1998.
75. LECLERCQ, A.; NONELL, A.; TORRO, J. L. T.; BRESSON, C.; VIO, L.; VERCOUTER, T.; CHARTIER, F. Introduction of organic/hydro-organic matrices in inductively coupled plasma optical emission spectrometry and mass spectrometry: A tutorial review. Part II. Practical considerations. **Analytica Chimica Acta**, v. 885, p. 57-91, 2015.

76. LECLERCQ, A.; NONELL, A.; TODOLI TORRO, J. L.; BRESSON, C.; VIO, L.; VERCOUTER, T.; CHARTIER, F. Introduction of organic/hydro-organic matrices in inductively coupled plasma optical emission spectrometry and mass spectrometry: A tutorial review. Part I. Theoretical considerations. **Analytica Chimica Acta**, v. 885, p. 33-56, 2015.
77. GRINDLAY, G.; MORA, J.; LOOS-VOLLEBREGT, M.; VANHAECKE, F. A systematic study on the influence of carbon on the behavior of hard-to-ionize elements in inductively coupled plasma–mass spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 86, p. 42-49, 2013.
78. MESKO, M. F.; POZEBON, D.; FLORES, E. M. M.; DRESSLER, V. L. Determination of tellurium in lead and lead alloy using flow injection-hydride generation atomic absorption spectrometry. **Analytica chimica acta**, v. 517, n. 1-2, p. 195-200, 2004.
79. PENA-PEREIRA, F.; WOJNOWSKI, W.; TOBISZEWSKI, M. AGREE—Analytical GREENness Metric Approach and Software. **Analytical Chemistry**, v. 92, n. 14, p. 10076-10082, 2020.
80. ANSCHAU, K. F. **Desenvolvimento de método de preparo de amostras de solução de nutrição enteral mediante sistema de digestão de alta pressão para posterior determinação multielementar**. Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, 2018.
81. EURACHEM. A adequação à finalidade dos métodos analíticos: um guia de laboratório para validação de método e tópicos relacionado, LGC (Teddington), 2014.
82. ANSCHAU, K. F.; ENDERS, M. S. P.; SENGER, C. M.; DUARTE, F. A.; DRESSLER, V. L.; MULLER, E. I. A novel strategy for medical foods digestion and subsequent elemental determination using inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 147, p. 1055-1060, 2019.
83. VICENTINO, P. O.; CASSELLA, R. J. Novel extraction induced by microemulsion breaking: a model study for Hg extraction from Brazilian gasoline. **Talanta**, v. 162, p. 249-255, 2017.
84. MANCINI, M. V.; SPRETI, N.; DI PROFIO, P.; GERMANI, R. Understanding mercury extraction mechanism in ionic liquids. **Separation and Purification Technology**, v. 116, p. 294-299, 2013.
85. VICENTINO, P.; BRUM, D. M.; CASSELLA, R. J. Development of a method for total Hg determination in oil samples by cold vapor atomic absorption spectrometry after its extraction induced by emulsion breaking. **Talanta**, v. 132, p. 733-738, 2015.

86. WILTSCHE, H.; WINKLER, M.; TIRK, P. Matrix effects of carbon and bromine in inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Journal of analytical atomic spectrometry**, v. 30, n. 10, p. 2223-2234, 2015.

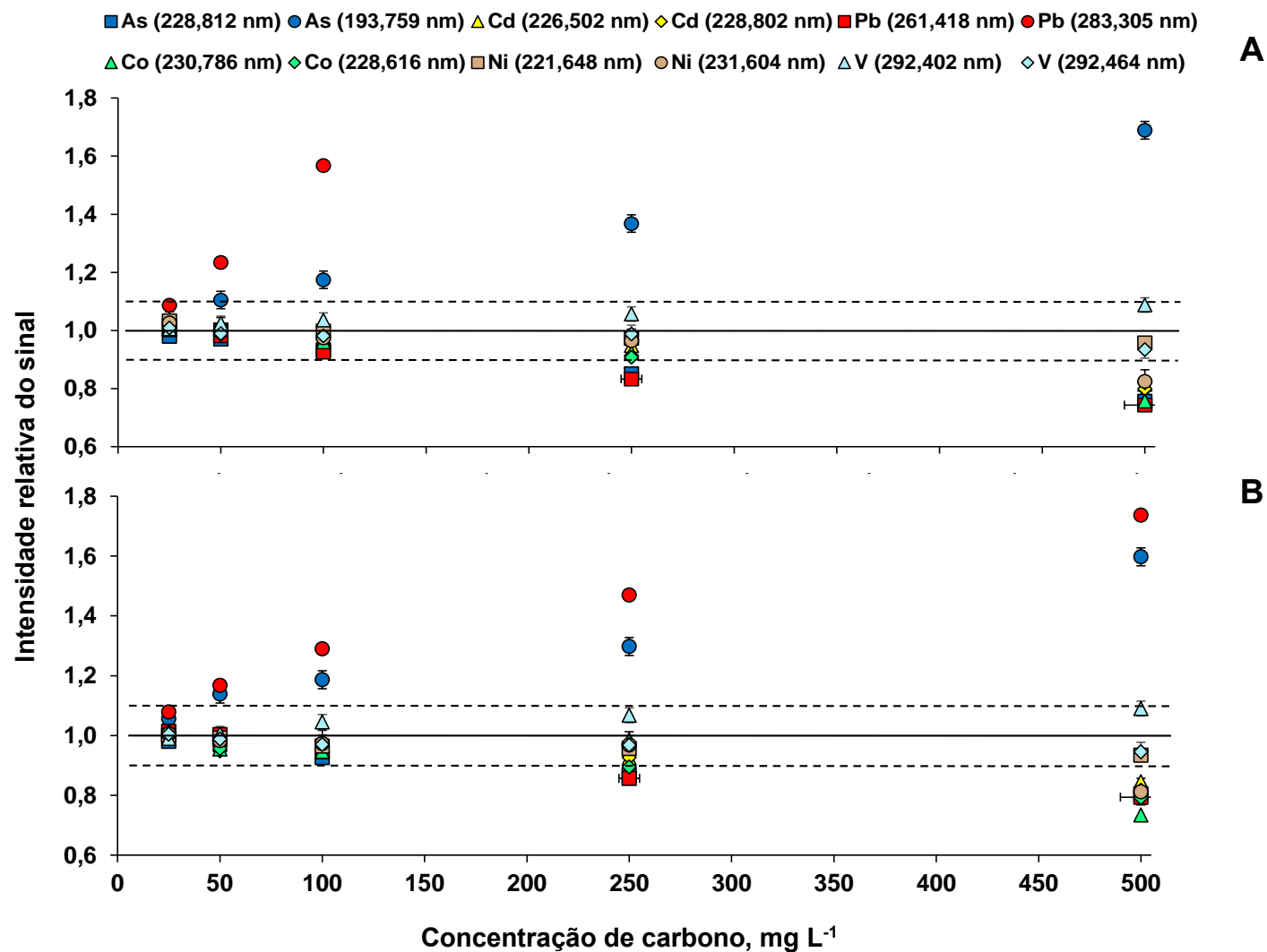
ANEXO

1. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE CARBONO NA DETERMINAÇÃO DE As, Cd, Pb, Co, Ni e V POR ICP-OES APÓS RP-DLLME

No método da RP-DLLME o solvente dispersor geralmente utilizado é um solvente orgânico, o que contribui para uma quantidade relativamente alta de carbono nas soluções finais. A presença de carbono pode interferir na determinação dos analitos em técnicas com plasma. Por isso, experimentos iniciais foram feitos para avaliar os efeitos de carbono na determinação de As, Cd, Pb, Co, Ni e V por ICP-OES após a RP-DLLME.

Para este estudo, soluções de referência contendo 20 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As, Cd, Pb, Co, Ni e V foram preparadas em HNO_3 5% com e sem adição de 25 a 1000 mg L^{-1} de carbono (fonte de carbono: *n*-propanol). Foram monitorados todos os comprimentos de onda disponíveis para cada analito. Os resultados obtidos para as avaliações foram expressos em intensidade relativa do sinal para cada analito. A intensidade foi calculada a partir da razão entre o valor da intensidade do sinal do analito usando uma solução de referência com e sem adição de carbono. Intensidade do sinal inferior a 0,90 foi considerada como supressão do sinal, enquanto que superior a 1,10 foi considerada como aumento do sinal. Os resultados são mostrados na Figura 1A para uma solução contendo 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 1B para uma solução contendo 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As, Cd, Pb, Co, Ni e V.

Figura 1 – Efeito de carbono na determinação de As, Cd, Pb, Co, Ni e V usando (A) 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ e (B) 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos (determinação por ICP-OES, $n = 3$). A linha sólida indica a intensidade do sinal sem carbono e as linhas tracejadas indicam os limites de supressão e aumento do sinal. Fonte de carbono: *n*-propanol.



De acordo com as Figuras 1A e 1B, foi possível observar para As (228,812 nm) e Pb (261,418 nm) supressões de sinal superiores a 15% a partir de 100 mg L⁻¹ de carbono para as concentrações de analito avaliadas (20 e 50 µg L⁻¹). No caso de Cd, Co e Ni, a partir de 250 mg L⁻¹ de carbono, foi observado supressão do sinal superior a 16% em ambas as concentrações de analito avaliadas. Além disso, para V (292,464 nm) foram observadas supressões de sinal superiores a 15% a partir de 500 mg L⁻¹ de carbono em solução para ambas as concentrações de analito avaliadas. Segundo um estudo já reportado na literatura⁷⁶, a supressão do sinal devido à presença de carbono pode estar associada ao processo de nebulização. Dependendo da volatilidade do solvente utilizado pode ocasionar a formação de gotículas maiores e em maior quantidade. Além disso, o depósito de carbono no sistema de introdução da amostra e na tocha pode gerar supressão de sinal dos analitos, uma vez que, ocorre a mudança no equilíbrio de ionização.⁷⁶

Por outro lado, para As (193,759 nm) e Pb (283,305 nm), a partir de 25 mg L⁻¹ de carbono e para V (292,402 nm) a partir de 500 mg L⁻¹ de carbono foram observados aumentos das intensidades dos sinais superiores a 15% com a presença de carbono nas soluções para as duas condições de analito investigadas (20 e 50 µg L⁻¹). O aumento de sinal devido à presença de carbono pode estar associado uma série de fatores como descrito em um estudo prévio, em que foi utilizado como fonte de carbono o metanol.⁸⁶ Nesse estudo, foram avaliados 36 elementos e 157 linhas de emissão sendo que os autores relataram que a partir dos dados experimentais obtidos, as interferências causadas por carbono podem estar associadas ao tipo de fonte de carbono que pode promover mudanças na nebulização da amostra, as reações de transferência de carga induzidas pelo carbono e o estado físico da fonte de carbono podem contribuir.⁸⁶

Os resultados para a condição de 1000 mg L⁻¹ de carbono assim como para os seguintes elementos e respectivas linhas de emissão: As (189,042 e 197,262 nm), Cd (214,438 e 361,051 nm), Pb (167,153, 168,215, 172,680, 220,353 e 405,778 nm), Co (237,862 e 238,892 nm), Ni (174,828, 227,021, 232,003, 300,249 e 341,476 nm) e V (309,311 e 311,071 nm) não estão mostrados nas Figuras 1A e 1B, pois os efeitos de carbono durante a determinação por ICP-OES foram extremamente pronunciados.

É importante mencionar que não foi observado efeito de carbono para As (228,812 nm) e Pb (261,418 nm) usando as soluções de carbono na concentração de até 100 mg L⁻¹ em todas as concentrações de analito avaliadas (20 e 50 µg L⁻¹). Além

disso, não foi observado efeito de carbono para a determinação de Cd (226,502 e 228,802 nm) e Co (228,616 e 230,786 nm) por ICP-OES usando todas as soluções nas concentrações de analito avaliadas de até 250 mg L⁻¹. Adicionalmente, efeitos de carbono não foram observados para Ni (221,648 e 231,604 nm) e V (292,402 e 292,464 nm) utilizando soluções contendo concentrações de carbono de até 500 mg L⁻¹ (para todas as condições de analito avaliadas).

Foi possível concluir que as linhas de emissão para As (228,812 nm), Cd (226,502 e 228,802 nm), Pb (261,418 nm), Co (228,616 e 230,786 nm), Ni (221,640 e 231,604 nm) e V (292,402 e 292,464 nm) estão menos suscetíveis a interferências de carbono. Ao final do estudo de interferência, foram escolhidas as linhas de emissão para cada elemento, sendo para As (228,812 nm), Cd (228,802 nm), Pb (261,418 nm), Co (230,786 nm), Ni (221,648 nm) e V (292,402 nm).

Considerando o uso do *n*-propanol como solvente dispersor em estudos iniciais para a RP-DLLME, foram obtidas soluções finais com concentração de carbono de aproximadamente 42,8 g L⁻¹. A partir disso, foi feito um estudo para avaliar qual a diluição adequada para cada analito em decorrência da interferência de carbono, visando atender aos valores dos limites máximos preconizados pelo ICH Q3D (para a administração parenteral). Para esse estudo, foram consideradas as condições de massa de amostra e volume final da solução (5 g e 10 mL) empregados no método da RP-DLLME. Os resultados desse estudo estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Avaliação da determinação por ICP-OES considerando as interferências de carbono.

Analito	Adição de analito (µg g⁻¹)^a	Valor obtido na determinação (µg L⁻¹)^b	Concentração de carbono (mg L⁻¹)^c	Diluição adequada^d	Valor obtido na determinação/ diluição adequada (µg L⁻¹)
As	1,5	750	100	430	1,74
Cd	0,2	100	250	170	0,58
Pb	0,5	250	100	430	0,58
Co	0,5	250	250	170	1,45
Ni	2,0	1000	500	85	11,63
V	1,0	500	500	85	5,81

^aSão as adições dos analitos calculadas a partir das recomendações do ICH Q3D para a via de administração parenteral; ^bValor calculado a partir da massa de amostra de 5 g e aferição final de 10 mL; ^cEfeito de carbono observado a partir da concentração de carbono informada; ^dDiluição adequada considerando o efeito de carbono na determinação de cada analito.

Na primeira coluna da Tabela 1 são mostrados os analitos estudados, na segunda, a massa de analito adicionada para os experimentos (conforme o ICH Q3D). Na terceira, o valor da concentração esperada para cada analito, na determinação por ICP-OES. Na quarta coluna, foram apresentados os valores máximos de carbono toleráveis em cada determinação. Na quinta coluna, a diluição requerida, visando eliminar interferências de carbono durante a determinação dos analitos (considerando a concentração de carbono de $42,8 \text{ g L}^{-1}$). Por último, na sexta coluna, é mostrado a concentração esperada, para cada analito após a aplicação da diluição adequada (quinta coluna).

De acordo com os resultados da Tabela 1, foi possível observar que o valor obtido na determinação por ICP-OES considerando a diluição necessária decorrente da interferência de carbono é inferior a faixa linear de calibração do equipamento ($2,5$ a $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) para os elementos As, Cd, Pb e Co. No caso de Ni e V, a faixa de trabalho, considerando a diluição necessária, ficaria próxima aos primeiros pontos da curva de calibração, o que dificultaria as determinações dos analitos. Assim, conforme o estudo de interferência de carbono, a técnica de ICP-OES não é adequada para a determinação dos analitos nos limites máximos preconizados pelo ICH Q3D (para a administração parenteral).

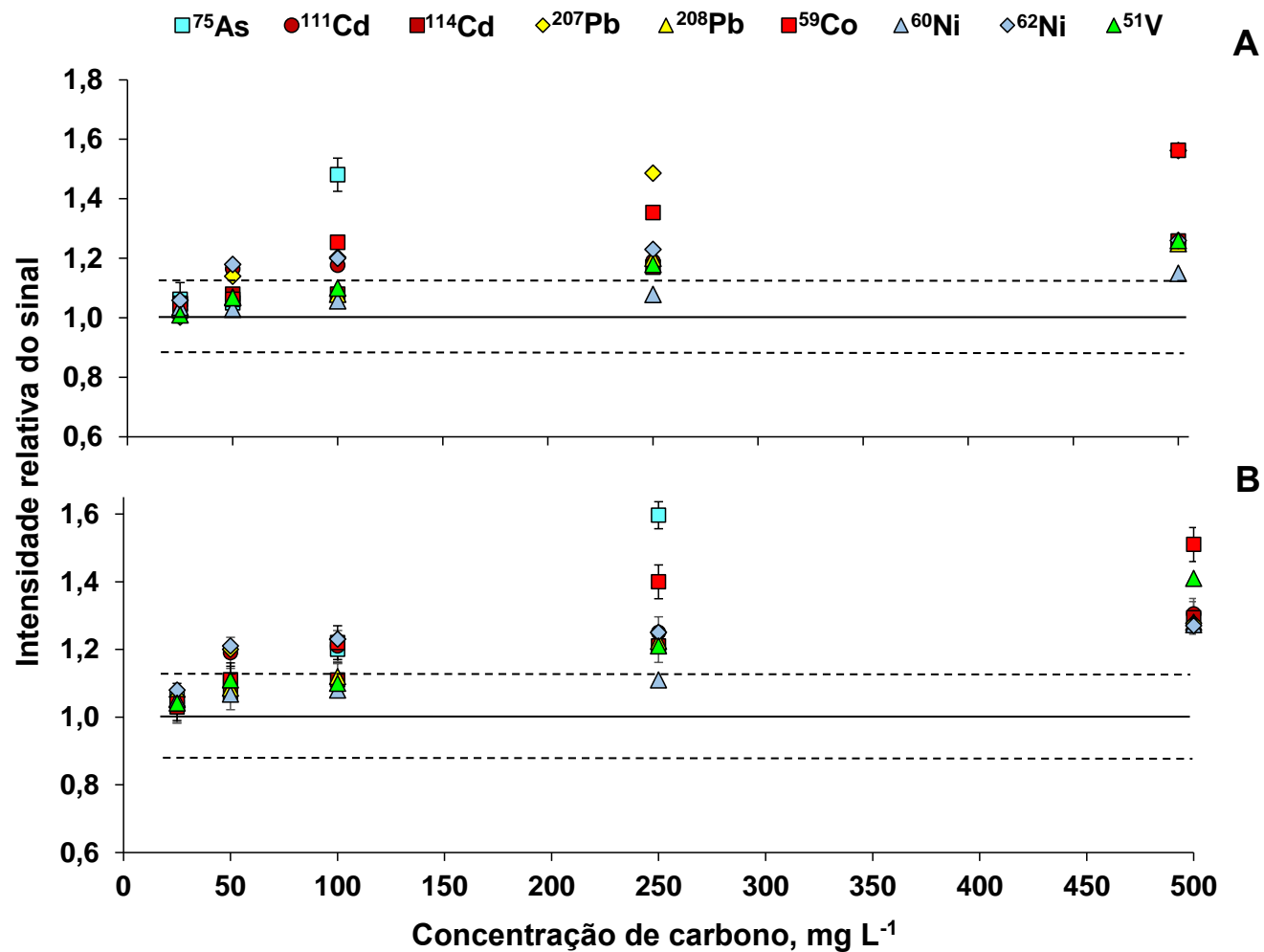
Por isso, um estudo de interferência de carbono foi também feito por ICP-MS, a fim de verificar se a diluição adequada neste equipamento possibilitaria a determinação dos analitos de acordo com os limites máximos calculados a partir das recomendações do ICH Q3D, para a via de administração parenteral.

2. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE CARBONO NA DETERMINAÇÃO DE As, Cd, Pb, Co, Ni e V POR ICP-MS APÓS RP-DLLME

Diante da impossibilidade de utilizar a técnica de ICP-OES para a determinação de As, Cd, Pb, Co, Ni e V nas soluções obtidas após a RP-DLLME (como reportado no item 1 deste anexo), um estudo foi desenvolvido para avaliar a possibilidade de determinação por ICP-MS. Para isso, foram preparadas soluções de referências de concentrações de $0,1$, $0,5$, $1,0$ e $2,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ contendo As, Cd, Pb, Co, Ni e V, com e sem a adição de carbono (fonte de carbono: *n*-propanol) nas concentrações de 25 a 500 mg L^{-1} em HNO_3 5%, conforme descrito no item 3.5 (*Materiais e Métodos*).

É importante destacar que os isótopos utilizados nesses experimentos foram mencionados na Tabela 4 no item 3.1 (*Materiais e Métodos*). Os resultados obtidos para as avaliações foram expressos em intensidade relativa do sinal para cada analito. A intensidade foi calculada de acordo com a razão entre o valor da intensidade do sinal do analito usando soluções de referência com e sem adição de carbono. Assim, as intensidades de sinal inferiores a 0,90 foram consideradas como supressão do sinal, enquanto que as intensidades superiores a 1,10 foram consideradas como aumento do sinal. Os resultados para o estudo das interferências de carbono são apresentados respectivamente nas Figuras 2A para a solução contendo $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ e 2B para a solução de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$.

Figura 2 – Efeito da concentração de C na intensidade do sinal de As, Cd, Pb, Co, Ni e V nas concentrações de adição dos analitos de (A) $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ e (B) $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ (determinação por ICP-MS, $n = 3$). A linha sólida indica a intensidade do sinal sem carbono e as linhas tracejadas indicam os limites de supressão e aumento do sinal. Fonte de carbono: *n*-propanol.



Como pode ser observado nas Figuras 2A e 2B, quando as soluções contendo 50 mg L⁻¹ de carbono e 0,1 e 0,5 µg L⁻¹ dos analitos foram avaliadas, um aumento da intensidade do sinal de 14 e 18% para ¹¹¹Cd, ²⁰⁷Pb e ⁶²Ni foi observado. Com o uso de maiores concentrações de carbono (100 a 500 mg L⁻¹), as interferências ainda permaneceram para ¹¹¹Cd, ²⁰⁷Pb e ⁶²Ni. Além disso, com 100 mg L⁻¹ de carbono, foi observado um aumento da intensidade do sinal entre 15 e 48% para ⁷⁵As e ⁵⁹Co em ambas as concentrações de analito avaliadas (0,1 e 0,5 µg L⁻¹). Quando as soluções contendo 250 mg L⁻¹ de carbono foram avaliadas, um aumento da intensidade do sinal de 16 e 20% foi observado para ¹¹⁴Cd, ²⁰⁸Pb e ⁵¹V, e os efeitos do carbono anteriormente observados ainda permaneceram para ⁷⁵As e ⁵⁹Co. Para ⁶⁰Ni, não foi observado efeito de carbono com soluções de até 250 mg L⁻¹. Porém, quando as soluções contendo 500 mg L⁻¹ de carbono foram avaliadas, um aumento superior a 14% na intensidade do sinal para ⁶⁰Ni foi observado. Além disso, os efeitos de carbono foram ainda mais acentuados para os isótopos ⁷⁵As, ¹¹¹Cd, ¹¹⁴Cd, ⁵⁹Co, ⁶²Ni, ²⁰⁷Pb, ²⁰⁸Pb e ⁵¹V em concentrações de carbono mais elevadas (500 mg L⁻¹ de C).

Os resultados para as soluções com 1,0 e 2,5 µg L⁻¹ dos analitos seguiram a mesma tendência dos obtidos para as soluções com 0,1 e 0,5 µg L⁻¹. Assim, este estudo enfatizou a importância do monitoramento da concentração de carbono nos extratos obtidos após o método RP-DLLME, mostrando ser necessário diluir os extratos antes da análise por ICP-MS, a fim de evitar resultados superestimados ou subestimados.

Conforme os resultados do estudo, efeitos de carbono não foram observados para a determinação de ¹¹¹Cd, ²⁰⁷Pb e ⁶²Ni por ICP-MS utilizando soluções nas concentrações de analito avaliadas de até 25 mg L⁻¹. É importante mencionar que não foi observado efeito de carbono para ⁷⁵As, e ⁵⁹Co usando as soluções de carbono na concentração de até 50 mg L⁻¹ em todas as concentrações de analito avaliadas (0,1, 0,5, 1,0 e 2,5 µg L⁻¹). Além disso, não foi observado efeito de carbono para a determinação de ¹¹⁴Cd, ²⁰⁸Pb e ⁵¹V por ICP-MS usando todas as soluções nas concentrações de analito avaliadas de até 100 mg L⁻¹. Adicionalmente, efeitos de carbono não foram observados para ⁶⁰Ni usando soluções contendo concentrações de carbono de até 250 mg L⁻¹ (para todas as condições de analito avaliadas). Foi possível concluir que os isótopos ¹¹¹Cd, ²⁰⁷Pb e ⁶²Ni nas concentrações de 0,1 e 0,5 µg L⁻¹ estão mais sujeitos a interferências de carbono durante as determinações por ICP-MS. Enquanto que os isótopos ¹¹⁴Cd, ⁶⁰Ni, ²⁰⁸Pb e ⁵¹V estão menos suscetíveis a

interferências de carbono. Esses resultados estão de acordo com os estudos já reportados na literatura.^{12,76,77} Com base nesses resultados, os isótopos escolhidos para a determinação por ICP-MS foram ⁷⁵As, ¹¹⁴Cd, ²⁰⁸Pb, ⁵⁹Co, ⁶⁰Ni e ⁵¹V.

Considerando que em estudos iniciais para a RP-DLLME, foram obtidas soluções finais com concentração de carbono de aproximadamente 42,8 g L⁻¹. O mesmo estudo feito por ICP-OES para avaliar a se a diluição necessária para cada elemento devido a interferência de carbono, seria compatível com os valores dos limites máximos conforme o ICH Q3D, foi feito por ICP-MS. Para isso, foram consideradas as condições empregadas no método da RP-DLLME (massa de amostra de 5 g e volume de aferição 10 mL). Os resultados desse estudo estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Avaliação da determinação por ICP-MS considerando as interferências de carbono.

Analito	Adição de analito (µg g⁻¹)^a	Valor obtido na determinação (µg L⁻¹)^b	Concentração de carbono (mg L⁻¹)^c	Diluição adequada^d	Valor obtido na determinação/ diluição adequada (µg L⁻¹)
As	1,5	750	50	855	0,876
Cd	0,2	100	100	425	0,234
Pb	0,5	250	100	425	0,583
Co	0,5	250	50	850	0,292
Ni	2,0	1000	250	170	5,81
V	1,0	500	100	430	1,17

^aSão as adições dos analitos calculadas a partir das recomendações do ICH Q3D para a via de administração parenteral; ^bValor calculado a partir da massa de amostra de 5 g e aferição final de 10 mL; ^cEfeito de carbono observado a partir da concentração de carbono informada; ^dDiluição adequada considerando o efeito de carbono na determinação de cada analito.

De acordo com a Tabela 2, na primeira coluna são mostrados os analitos estudados, na segunda, massa de analito adicionada para os experimentos (conforme o ICH Q3D). Na terceira, o valor da concentração esperada para cada analito, na determinação por ICP-MS. Na quarta coluna, foram apresentados os valores máximos de carbono toleráveis em cada determinação. Na quinta coluna, a diluição requerida, visando eliminar interferências de carbono durante a determinação dos analitos (considerando a concentração de carbono de 42,8 g L⁻¹). Por último, na sexta coluna, é mostrado a concentração esperada, para cada analito, após a aplicação da diluição adequada (quinta coluna).

Assim, aplicando a diluição necessária nos experimentos com adição de analito conforme as recomendações do guia ICH Q3D, foi possível determiná-los em níveis de concentração dentro da faixa linear do equipamento (0,025 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$). Por isso, os estudos para os parâmetros de influência do método da RP-DLLME foram avaliados utilizando a determinação por ICP-MS.

3. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE CARBONO NA DETERMINAÇÃO DE Hg POR CVG-ICP-MS APÓS RP-DLLME

Foi desenvolvido um estudo para avaliar as possíveis interferências decorrentes da presença de carbono na determinação de Hg por CVG-ICP-MS. Foram preparadas soluções de referência contendo 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Hg em HNO_3 5% (v/v) sem e com adição de carbono na faixa de 25 a 500 mg L^{-1} (fonte de carbono: *n*-propanol). Em seguida, as intensidades dos sinais para os isótopos ^{200}Hg e ^{202}Hg foram monitoradas. Para essa faixa de carbono avaliada, não foram observadas interferências causadas por carbono na determinação de Hg por CVG-ICP-MS.

4. COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS EMPREGADOS DE ACORDO COM A QUÍMICA ANALÍTICA VERDE

O método proposto utilizando a RP-DLLME e o método de referência por MAWD-SRC foram comparados de acordo com os 12 princípios da química analítica verde, sendo empregado uma recente métrica proposta chamada *Analytical GREENness* (software AGREE).⁷⁹ Para isso, os dados de entrada inseridos no software para a avaliação de ambos os métodos são apresentados na Tabela 3 de acordo com cada princípio.

Tabela 3 – Informações inseridas nos dados de entrada do software AGREE sobre os métodos de preparo de amostras empregados.

Princípio (nº)	Método de referência	Método proposto
1 – Uso preferível de técnicas de análise direta	Pré-tratamento externo da amostra e análise em lote (grande número de etapas)	Pré-tratamento externo da amostra e análise em lote (número reduzido de etapas)
2 – Quantidade de amostra utilizada (g ou mL)	0,4 g	5,0 g
3 – Devem ser realizadas medições in situ (off-line, at-line, on-line, in-line)	Off-line	Off-line
4 – Quantidade de etapas necessárias para o método de preparo de amostra	Mais de 8 etapas	6 etapas
5 – Grau de automatização do método/ Se o método é classificado como miniaturizado	Parcialmente automatizado/ Não miniaturizado	Parcialmente automatizado/ Miniaturizado
6 – Uso da derivatização	Não empregado	Não empregado
7 – Geração de resíduo por amostra (g ou mL)	37 mL	25 mL
8 – Número de analitos determinados em uma corrida/ amostras analisadas por hora	6 analitos/ 40 amostras	6 analitos/ 40 amostras
9 – Selecionar a técnica de determinação empregada/ consumo de energia gasto em kWh	ICP-MS/ 1,3 kWh	ICP-MS/ 1,3 kWh
10 – Tipo de reagente empregado	Nenhum reagente é de fonte biológica	Algum dos reagentes é de fonte biológica
11 – Uso de reagente tóxico/ Quantidade utilizada (g ou mL)	Sim/ 12 mL	Sim/ 2 mL
12 – Quanto a segurança do operador o método pode ser (tóxico para o ambiente aquático, bioacumulativo, persistente, altamente inflamável, altamente oxidável, explosivo ou corrosivo)	Tóxico para o ambiente aquático e corrosivo	Tóxico para o ambiente aquático e corrosivo

Como pode ser observado na Tabela 3, as principais diferenças entre os métodos estão nos princípios 1, 2, 4, 5, 7, 10 e 11. Enquanto que as mesmas informações foram inseridas para ambos os métodos nos princípios 3, 6, 8, 9 e 12. Diante disso, as pontuações gerais para o método proposto e o de referência foram respectivamente de 0,49 e 0,35.