



Proposta de metodologia analítica para determinação de Arsênio e Selênio em sacarina sódica dihidratada pela técnica de HG-ICP OES


Proposal for an analytical methodology for the determination of Arsenic and Selenium in sodium saccharin dihydrate by the HG-ICP OES technique

 DOI: 10.5281/zenodo.8028618

 ARK: 57118/JRG.v6i13.607

Recebido: 14/05/2023 | Aceito: 12/06/2023 | Publicado: 01/07/2023

Lucinéia de Oliveira Grobs Zimmermann¹


 <https://orcid.org/0009-0006-0105-7270>


 <http://lattes.cnpq.br/5860251516768475>

Uniamérica Polo Biopark, PR, Brasil

E-mail: luzimmermann@hotmail.com

Daniele Cristina da Silva²


 <https://orcid.org/0009-0004-0161-2364>


 <http://lattes.cnpq.br/7190217681111999>

Uniamérica Polo Biopark, PR, Brasil

E-mail: daniele.silva.dany@gmail.com

Marcos Roberto de Lima Costa³


 <https://orcid.org/0009-0009-2875-1918>

 <http://lattes.cnpq.br/2818313943011541>

Pontifícia Universidade Católica do Paraná PUC, PR, Brasil

E-mail: mrlima1@hotmail.com

Hugo Mauricio Tiggemann⁴

 <https://orcid.org/0009-0006-4235-9152>

 <http://lattes.cnpq.br/1714209789117128>

Universidade Federal do Rio Grande do Sul UFRGS, RS, Brasil

E-mail: hugo.tiggemann@biopark.com.br



Resumo

O interesse na determinação de impurezas elementares em produtos farmacêuticos aumentou nos últimos anos devido às mudanças nas exigências regulatórias e à necessidade de atualizar os testes de limite atuais recomendados nas farmacopeias. A espectrometria de emissão óptica de plasma acoplado indutivamente (ICP) é uma alternativa adequada para a análise multielementar. O objetivo deste artigo é harmonizar a análise implementada pelo fabricante e pela indústria farmacêutica para o controle de qualidade da matéria-prima sacarina sódica dihidratada; por meio do

¹ Especialização em Controle de Qualidade; graduação em Ciências Biológicas com ênfase em Biotecnologia e Graduação em Farmácia. Experiência no controle de qualidade em análises instrumentais e físico-químicas em insumos farmacêuticos e produto acabado, transferências de métodos analíticos, validação de limpeza e de processos.

² Graduação em Farmácia. Experiência na pesquisa e desenvolvimento, criação e validação de novas metodologias analíticas em insumos farmacêuticos e produto acabado, análises instrumentais e físico-químicas, validação de limpeza e de processos, transferências de métodos analíticos.

³ Engenheiro Químico com Especialização em Gestão Empresarial e Inovação. Experiência na pesquisa e desenvolvimento, criação e validação de novas metodologias analíticas em insumos farmacêuticos e produto acabado, para determinação de impurezas metálicas por ICP-OES, HG ICP-OES, FAAS, HG-FAAS, e solventes por CG e HPLC, validações de limpeza. Coordenação e gestão de pessoas e processos.

⁴ Professor na Faculdade Biopark. Possui graduação em Química Industrial, mestrado e doutorado em Química (PPGQ-UFRGS). Tem experiência em Polímeros e Coloides, Processos e Operações Unitária. Atuando nos temas: polímeros, indústria, biodegradável, agroquímicos e análises instrumentais.

desenvolvimento de uma metodologia analítica na técnica de geração de hidretos por ICP OES quantificando Arsênio (As) e Selênio (Se) na matriz de estudo. Foi necessário o emprego de diferentes etapas de redução dos analitos para a formação dos respectivos hidretos voláteis. Por esse motivo, optou-se por realizar as análises separadamente. Para As, a reação foi realizada em meio ácido, utilizando iodeto de potássio e ácido ascórbico, enquanto que Se, a redução do Se+6 para se+4 foi realizado através de aquecimento em meio ácido. Foram obtidos resultados para Precisão e Exatidão dentro dos critérios de aceitação descrito pela USP<730>, desta forma o teste demonstrou ser promissor, apresentando desvio padrão relativo de 2,0% e 2,6%, para As e Se respectivamente, e a linearidade expressou coeficiente de correlação de 0,99. Em estudos futuros, pretende-se dar continuidade à fase de validação analítica, que será avaliada pelos parâmetros descritos na RDC 166/2017, atendendo aos requisitos estabelecidos pela legislação vigente e demais diretrizes internacionais.

Palavras-chave: Geração de hidretos. Impurezas elementares. Insumos farmacêuticos. Medicamentos.

Abstract

Interest in the determination of elemental impurities in pharmaceuticals has increased in recent years due to changes in regulatory requirements and the need to update current limit tests recommended in pharmacopoeias. Inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP) is a suitable alternative for multielement analysis. The objective of this article is to harmonize the analysis implemented by the manufacturer and the pharmaceutical industry for the quality control of the raw material saccharin sodium dihydrate; through the development of an analytical methodology in the hydride generation technique by ICP OES quantifying Arsenic (As) and Selenium (Se) in the study matrix. It was necessary to use different analyte reduction steps to form the respective volatile hydrides. For this reason, it was decided to carry out the analyzes separately. For As, the reaction was carried out in an acid medium, using potassium iodide and ascorbic acid, while for Se, the reduction of Se+6 to Se+4 was carried out by heating in an acid medium. Results were obtained for Precision and Accuracy within the acceptance criteria described by USP<730>, thus the test proved to be promising, presenting a relative standard deviation of 2.0% and 2.6%, for As and Se respectively, and the linearity expressed correlation coefficient of 0.99. In future studies, it is intended to continue the analytical validation phase, which will be evaluated by the parameters described in RDC 166/2017, meeting the requirements established by current legislation and other international guidelines.

Keywords: Generation of hydrides. Elemental impurities. Pharmaceutical supplies. Medicines.

1. Introdução

No processo de fabricação os medicamentos acabam por carregar catalisadores e contaminantes oriundos da síntese dos insumos farmacêuticos, os quais são conhecidos por interferir na eficácia dos medicamentos ou causar efeitos tóxicos nos pacientes. A fim de regulamentar a produção de medicamentos e estabelecer padrões de qualidade para os produtos finais, organizações internacionais juntamente com a ICH (International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use)

estabeleceram regulamentos para maximizar a exposição a elementos-alvo e também para elementos conhecidos por serem tóxicos para os seres humanos (ICH, 2009; USP, 2012; POHL et al., 2018; PINHEIRO et al., 2019).

A matéria prima sacarina sódica dihidratada é um edulcorante artificial de alta intensidade, produzido em escala industrial e o mais consumido mundialmente. Comercialmente é disponível em sais de sódio, cálcio e potássio, sendo comumente usados na indústria alimentícia e farmacêutica como agente antimicrobiano, intensificador de sabor, adjuvante, solvente ou veículo de transporte (WHITEHOUSE, et al., 2008; GUILLEM-LLOBAT, 2012). A preferência pela sacarina sódica dihidratada se deve ao fato de que ela é solúvel em água e álcool, contudo esta substância pode apresentar impurezas como o Arsênio e/ou Selênio, classificados com Classe 1 e Classe 2 respectivamente segundo a USP (United States Pharmacopeia) (WHITEHOUSE, et al., 2008; USP, 2016; RIBEIRO et al., 2020; ICH, 2022).

O Arsênio inorgânico tem se mostrado genotóxico, mas não mutagênico e tem sido reconhecido como um carcinógeno humano (MANDAL & SUZUKI, 2002; PATACA et al., 2005; IARC, 2012; ICH, 2022). A exposição diária permitida (PDE do inglês Permitted Daily Exposure) oral é baseada nos efeitos crônicos do Arsênio na pele e estabelece o limite em 15 µg.dia com base na Agência para Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSDR) (ATSDR, 2007; WHO, 2011; ICH, 2022).

Já o Selênio (Se) é um oligoelemento essencial para muitas espécies, incluindo humanos. De acordo com a EPA (United States Environmental Protection Agency), o sulfeto de selênio pertence ao Grupo B2 (provável carcinógeno humano) (US EPA, 2002). A toxicidade mais significativa observada com a exposição excessiva em humanos ao Se é a selenose, caracterizada principalmente por efeitos dérmicos e neurológicos, incluindo marcha instável e paralisia (ATSDR, 2003). A exposição a níveis excessivos de Selênio na dieta gera preocupação e com o objetivo de limitar a exposição total ao Se, várias organizações estabeleceram um limite para a PDE oral de 170 µg.dia (ATSDR, 2003, OMS, 2011; ICH, 2022).

As análises destes elementos devem ser realizadas no fabricante do insumo e no controle de qualidade da indústria farmacêutica em que se faz necessária a concordância entre os valores. Uma técnica promissora e vantajosa para a detecção de Arsênio e Selênio é a espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente com geração de hidretos (HG-ICP OES), utilizando a conversão de amostra sólida da sacarina sódica dihidratada em solução, para a quantificação de ambos os elementos.

A fim de assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos, foi empregado o estudo de linearidade no método proposto utilizando o Software para avaliação estatística, ACTION.

2. Metodologia

O desenvolvimento do método ocorreu por meio de conversão de amostra sólida em solução, com posterior análise de ambos os analitos empregando a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado com geração de hidretos (HG- ICP OES).

As especificações para impurezas Arsênio e Selênio foram baseadas nas descritas no CoA (*Certificate of analysis* - Certificado de Análises) do fabricante da matéria prima sacarina sódica dihidratada; com valores de Arsênio $\leq 3,0 \mu\text{g.g}^{-1}$ e Selênio $\leq 30 \mu\text{g.g}^{-1}$.

Com o intuito de evitar erros ou contaminações durante o desenvolvimento do método; foram empregados reagentes, equipamentos que dispõem de qualidade analítica, e as vidrarias e utensílios devidamente higienizados e calibrados (Tabela 1).

Tabela 1 - Amostras, padrão e equipamentos utilizados para os testes.

Amostras / Padrões / Equipamentos	Fabricante
Padrão de Arsênio 1000mg.L ⁻¹	Sigma-Aldrich
Padrão de Selênio 1000mg.L ⁻¹	Sigma-Aldrich
Iodeto de Potássio	Merck
Ácido Ascórbico	Neon
Ácido Nítrico, >65%	Merck
Ácido Clorídrico, >30%	Merck
Borohidreto de Sódio	Sigma-Aldrich
Hidróxido de Sódio	Neon
Sacarina Sódica Dihidratada	Tinanjin Notrh Food
Balança Analítica	Mettler Toledo
Pipetador automático	Eppendorf
Chapa de Aquecimento	IKA
Termômetro	IKA
Banho Ultrassônico	Elitech
Sistema de Preparo de Amostras (Microondas)	Milestone
Espectrômetro de Emissão Ótica	Perkin Elmer

Fonte: Autores, 2023.

Teste de Solubilidade

A sacarina sódica dihidratada possui solubilidade de pelo menos 10,0 mg.mL⁻¹ em água a 20 °C (PUBCHEM, 2023). Os testes iniciais foram realizados com a finalidade de solubilizar quantidade de amostra necessária para a realização de análises empregando a geração química de vapor (Chemical Vapor Generation, CVG) ou geração de hidretos (HG), tentando assim evitar interferências causadas pela presença de carbono, já que as linhas de emissão atômicas para Arsênio e Selênio são influenciadas fortemente pela presença do mesmo (BORGES, 2005; POTES, 2018).

Os cálculos iniciais para a solubilização foram realizados para o analito Arsênio, por ter uma especificação de 3 µg.g⁻¹, que é na ordem 10 vezes inferior que do analito Selênio, tendo como limite de quantificação para Arsênio, na análise em solução, de 4,0 a 5,0 µg.L⁻¹. Empregando-se a concentração de 4,5 µg.L⁻¹ (concentração do analito em solução amostra), sendo que a concentração de 0,9 µg.g⁻¹ (concentração do analito em amostra de sacarina), utilizando-se um volume de 0,015 L e o fator de diluição de 1, a massa a ser utilizada será de 75 mg de sacarina sódica dihidratada.

As concentrações de sacarina sódica dihidratada utilizadas nos testes de solubilidade teve como base os cálculos iniciais, empregando 50, 75 e 100 mg da matéria prima; sendo preparadas as amostras em triplicata para cada concentração. A partir do trabalho de SERBAN et al., 2020, foi empregada a solução Redutora mais comumente utilizada no método de determinação de Arsênio. A solução Redutora I foi preparada (m/v) usando 5% de iodeto de potássio e 5% de ácido ascórbico em água ultrapura.

No Teste 1 de solubilidade as amostras foram preparadas em tubo tipo Falcon de 15 mL contendo 20% de Ácido Clorídrico (>30% m/m, grau traço) e 13,3% da Solução Redutora I, completando o volume do frasco com água ultrapura aplicando agitação em ultrassom por 3 minutos.

No Teste 2 de solubilidade utilizou-se somente a Solução Redutora I, em tubo tipo Falcon de 15 mL com água ultrapura sob agitação por 3 minutos em ultrassom. No Teste 3 de solubilidade foram também preparadas outras três amostras de concentrações já mencionadas com 6,6% de Ácido Nítrico (> 65% m/m grau traço), em ultrassom aquecido por 1 hora à 95 °C com agitação a cada 15 minutos.

Teste de Formação de Hidretos

Após a solubilidade iniciou-se a verificação da formação de hidretos de Selênio e Arsênio contemplando duas soluções Redutoras I e II para diminuição de interferentes durante o emprego da técnica HG-ICP OES (SEBAN, et al., 2020). A solução Redutora II foi preparada (m/v) usando 0,2% de Borohidreto de Sódio e 0,05% de Hidróxido de Sódio.

Para solução estoque dos padrões de Selênio e Arsênio foi utilizada 37,5 µL da **Solução Padrão de Arsênio 1000 mg.L⁻¹** e 250 µL da **Solução Padrão de Selênio 1000 mg.L⁻¹** em frasco do tipo Falcon de 50 mL completando o volume com água ultrapura. [As] = 0,75 mg.L⁻¹; [Se] = 5 mg.L⁻¹.

As Soluções Branco, Amostra Teste e Referência 100% foram preparadas com duas réplicas em tubo tipo Falcon de 15 mL e adição de 13,3% da Solução Redutora I, completando o volume do frasco com água ultrapura e agitação de 3 minutos em ultrassom.

A Solução Amostra foi preparada com aproximadamente 75 mg de sacarina sódica dihidratada; Solução Teste com aproximadamente 75 mg de sacarina sódica dihidratada e 300 µL da solução estoque dos padrões Arsênio e Selênio; já a Solução Referência 100% foi preparada utilizando 300 µL da solução estoque dos padrões de Arsênio e Selênio.

As amostras Solução Branco, Solução Referência 100%, Solução Amostra e Solução Teste foram analisadas no Espectrômetro de emissão ótica da marca Perkin Elmer, empregando os parâmetros descritos na Tabela 2.

O Teste de Formação de Hidretos teve por finalidade avaliar a semelhança entre os sinais analíticos de Arsênio e Selênio quando estes estão na presença ou não da matriz da amostra.

Tabela 2 - Parâmetros instrumentais para determinação em ICP OES.

Parâmetro do instrumento	Condição operacional
Introdução de amostra	Cont.flow hydride generation apparatus
Posição da Tocha (mm)	-2
Element	As / Se
Wavelength (nm)	193.696 / 196.026
Function	Analyte
Purge gas flow	High
Read time (sec)	Auto
Read delay time (sec)	70
Replicates	3
Measured by	Element
Source equilibration delay (sec)	10
Monitor nebulizer back pressure	Yes

Nebulizer back pressure upper limit (%)	10
Plasma gas flow (L.mim ⁻¹)	12
Auxiliar gas flow (L.mim ⁻¹)	0,5
Nebulizer gas flow (L.mim ⁻¹)	0,60
Power (W)	1400
View dist. (mm)	15.0
Sample flow rate (mL.mim ⁻¹)	1,25
Sample flush time (sec)	0
Tubulação para descarte (mm)	3,14 preta/branca
Tubulação para amostra (mm)	0,76 preta/preta
Tubulação para solução Redutora II	1,14 vermelha/vermelha
<hr/>	
Parâmetros do Amostrador Automático	Condição operacional
<hr/>	
Autosampler wash	Between samples
Wash location	0
Normal time (sec)	70
Solução de lavagem	Ácido nítrico 2% v/v

Fonte: Autores, 2023.

Foi verificado que não houve a formação de hidretos de Selênio, desse modo foi preciso realizar novos ensaios com alterações e aumento das proporções das massas das amostras e na adição das Soluções estoque.

No decorrer do desenvolvimento metodológico também houve a necessidade de realizar alterações em alguns parâmetros do espectrômetro de acordo com as Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Alterações realizadas em Spectrometer / Read Parameters / Auto Integration.

Read parameters		Min. Time (sec)	Max. Time (sec)
As 193.696	Time (sec)= AUTO	1.000	5.000 →15.000
Se 196.026	Time (sec)= AUTO	1.000	5.000 →15.000

Fonte: Autores, 2023.

As alterações foram realizadas visando a melhora da reprodutividade dos resultados.

Tabela 4 - Alterações realizadas em Spectrometer / Read Parameters.

Purge gas flow	
Purge gas flow	High→Normal

Fonte: Autores, 2023.



Após verificar que no teste de geração de hidretos não foi eficaz para quantificação de selênio, optou-se por desenvolver métodos individuais para Selênio e Arsênio, realizando a decomposição por irradiação de microondas das amostras com adição de 2 mL de Ácido Nítrico (>65% m/m grau traço) e 3 mL de água ultrapura com posterior pré-redução com solução Redutora I (Iodeto de Potássio 5% e Ácido ascórbico 5% (m/v)) e gerando a formação de hidretos para o analito Arsênio (WELNA, et al., 2014).

A Solução estoque dos padrões Arsênio e Selênio 1 foi preparada com concentração de 12 mg.L⁻¹ da **Solução Padrão de Arsênio 1000 mg.L⁻¹** e 80 mg.L⁻¹ da **Solução Padrão de Selênio 1000 mg.L⁻¹** em água ultrapura para frasco Falcon. Para a solução estoque dos padrões Arsênio e Selênio 2 foi transferido 16,6% da Solução estoque dos padrões Arsênio e Selênio 1 para um tubo Falcon de 15 mL e completado o volume com água ultrapura. [As] = 2,0 mg.L⁻¹; [Se] = 13,3 mg.L⁻¹.

As Soluções Branco Estoque, Amostra Estoque, Teste Estoque foram preparadas em frascos de PTFE do sistema de preparo de amostras (Microondas Milestone) com 2 mL de Ácido Nítrico (>65% m/m grau traço) e 3 mL de água ultrapura. A Solução Amostra Estoque, foi utilizado aproximadamente 500 mg de sacarina sódica dihidratada; para a Solução Teste Estoque aproximadamente 500 mg de sacarina sódica dihidratada e 125 µL da Solução estoque dos padrões Arsênio e Selênio 1.

A decomposição das soluções contidas nos frascos de PTFE se deu no Microondas marca Milestone, com programação de 20 minutos, temperatura de 220 °C e MW em 1800. Após a etapa de decomposição e resfriamento do sistema, as soluções obtidas foram transferidas para frascos tipo Falcon de 15 mL, completando o volume com água ultrapura.

Para a análise do analito Arsênio foi transferido 16,6% das soluções para os tubos, 20% de Ácido Clorídrico traço (> 30% m/m) e 13,3% mL de Solução Redutora I, deixando-as em repouso por 60 minutos antes de serem analisadas.

Para análise de Selênio utilizou-se o mesmo preparo da decomposição das amostras conforme supra citado. Acrescentando ao preparo o aquecimento das soluções em banho térmico (> 80 °C) por 60 minutos. Após o aquecimento as amostras foram deixadas à temperatura ambiente até resfriamento, completando-se o volume do frasco com água ultrapura antes de serem analisadas.

As Soluções para calibração do espectrômetro (curva de calibração) para o analito Arsênio foram preparadas utilizando os volumes da Solução estoque dos padrões Arsênio e Selênio 1 descritos conforme Tabela 5. Utilizou-se frascos tipo Falcon contendo 20% de Ácido Clorídrico traço (> 30% m/m) e 13,3% mL de Solução Redutora I, completando o volume do frasco com água ultrapura.

As Soluções para a curva de calibração do analito Selênio foram preparadas a partir da solução estoque dos padrões Arsênio e Selênio 2. Os volumes utilizados para o preparo estão descritos na Tabela 5. Utilizou-se frascos tipo Falcon contendo 20% de Ácido Clorídrico traço (> 30% m/m); acrescentando ao preparo aquecimento em banho térmico (> 80 °C) por 60 minutos. Após o aquecimento resfriado em temperatura ambiente e completando o volume do frasco com água ultrapura.

Tabela 5 – Curva de calibração.

Soluções referência	Conc. relativa,%	[Arsênio], $\mu\text{g.L}^{-1}$	[Selênio], $\mu\text{g.L}^{-1}$	Volume, μL
SP0	0	0,00	0,00	0
SP1	30	4,50	33,3	37,5
SP2	50	7,50	55,6	62,5
SP3	75	11,25	83,3	93,8
SP4	100	15,00	111,1	125,0
SP5	125	18,75	138,9	156,3
SP6	150	22,50	166,7	187,5

Fonte: Autores, 2023.

Após estabilização do equipamento este foi ajustado nas condições especificadas na Tabela 2, junto com as modificações descritas nas Tabelas 3 e 4, foi conectado o sistema de geração de hidretos e a Solução Redutora II (0,2% de Boroidreto de Sódio e 0,05% de Hidróxido de Sódio em água ultrapura). Realizado a calibração do equipamento empregando as soluções das curvas de calibração de Arsênio e Selênio descritas na Tabela 5; e analisando as soluções Branco, Amostra e Teste. Os controles de 30% e 60% também foram verificados. Utilizada solução de lavagem de HNO_3 2% v/v.

3. Resultados e Discussão

Teste de Solubilidade

Inicialmente avaliou-se a solubilidade da amostra em meio aquoso contendo reagentes (Ácido Clorídrico e Solução Redutora I) tipicamente empregados na análise por CVG. Esta avaliação foi realizada tendo em vista que os analitos Arsênio e Selênio podem ser quantificados empregando a CVG como modo de introdução de amostras para a técnica de ICP OES, e desta forma evitando problemas de interferências causadas pelo Carbono (BORGES, 2005; POTES, 2018).

Após o preparo das soluções amostra de 50 mg e 75 mg de sacarina sódica dihidratada, constatou-se que estas foram completamente solubilizadas, já a amostra de 100 mg de sacarina sódica dihidratada, não apresentou solubilização completa. Posteriormente, todas as amostras foram submetidas a agitação e aquecimento, 40 °C, em um banho ultrassônico por 3 min. Sob agitação, houve a formação de mais material insolúvel para as amostras 50 mg e 75 mg de, demonstrando que o excipiente não é completamente solúvel em meio aquoso em presença de ácido e solução redutora I.

No Teste 2 de solubilidade da sacarina sódica dihidratada utilizando meio neutro, apresentaram resultados satisfatórios do ponto de vista da solubilidade da amostra. As amostras, independentemente da massa empregada, demonstraram boa solubilidade em presença de água ultrapura e Solução Redutora I. As amostras foram completamente solubilizadas sob temperatura ambiente apenas com agitação manual. A utilização de banho ultrassônico não provocou a precipitação da amostra indicando assim que a solução possui estabilidade.

As amostras misturadas com 1 mL de ácido nítrico foram completamente solubilizadas neste volume quando submetidas ao aquecimento de 95 °C por 1 h.

Após resfriamento as amostras que foram preparadas com 100 mg de sacarina sódica dihidratada que foram adicionados 3 mL de Ácido Clorídrico e 2 mL de solução redutora I, uma das amostras apresentaram material sólido em suspensão, para a demais não haviam apresentado formação de material sólido após a diluição com água ultrapura. As amostras foram submetidas a agitação em banho ultrassônico, onde todas as amostras apresentaram formação de material sólido, desta forma demonstrando a instabilidade da solução amostra em meio ácido. Vale ressaltar que após a adição de ácido e solução redutora I na solução amostra, já resfriada, após procedimento de digestão, a etapa de aquecimento para facilitar a solubilização não foi testada devido a ocorrência da reação do ácido ascórbico e iodeto de potássio em meio ácido sob aquecimento. Isso acarreta na conversão de Arsênio III para Arsênio V, o que acarreta na formação ineficiente de hidreto de arsina (SANTOS, 2016).

Teste de Formação de Hidretos

Durante o Teste de formação de Hidretos, as amostras foram preparadas apenas em solução aquosa e solução redutora I, sem a presença de ácido clorídrico, devido à insolubilidade das amostras em meio ácido. A Figura 1 demonstra o sinal analítico para Arsênio em soluções contendo quantidade adicionada de analito para obtenção de concentração de $15,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ e soluções sem adição de analito. Assim, pode-se constatar a formação de hidreto de Arsênio em meio aquoso sem a adição de ácidos. É importante ressaltar que o uso de soluções aquosas com presença de ácidos em análises visando a quantificação de espécies na forma de hidretos é prática comum (BORGES, 2005; POTES, 2018).

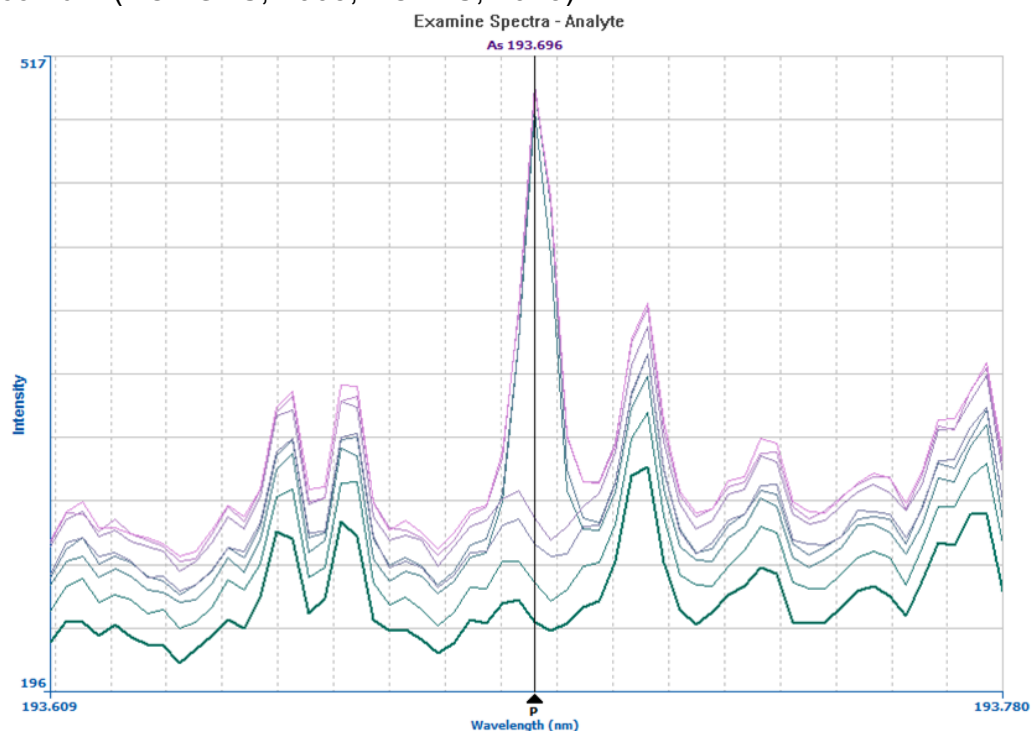


Figura 1 – Espectros de emissão de Arsênio em 193.696 nm.

A Figura 2 apresenta o sinal analítico para Selênio em soluções contendo quantidade adicionada de analito para obtenção de concentração de $100,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ e soluções sem a adição. Como observado não há diferença entre os sinais obtidos entre as soluções branco, referência, amostra e teste, um indicativo de que não há formação significativa de Selênio na forma de hidreto nas condições descritas pelo ensaio.

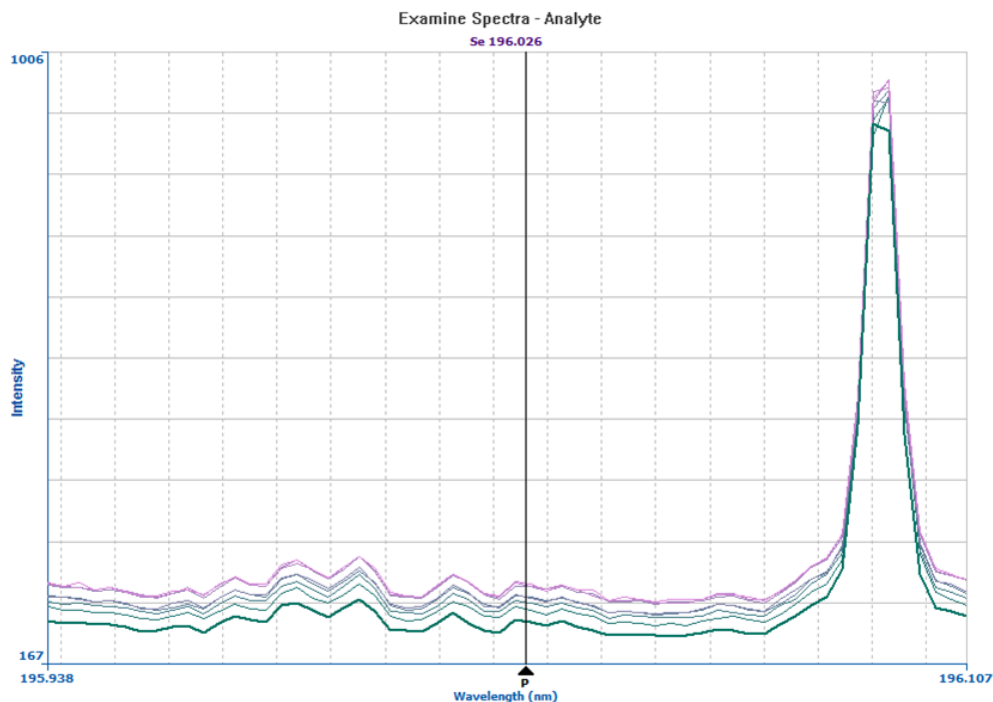


Figura 2 – Espectros de emissão Selênio em 196.026 nm.

A Figura 3 apresenta os espectros de emissão para Arsênio e Selênio, como pode ser verificado a diferença significativa entre as soluções branco e referência 100%.

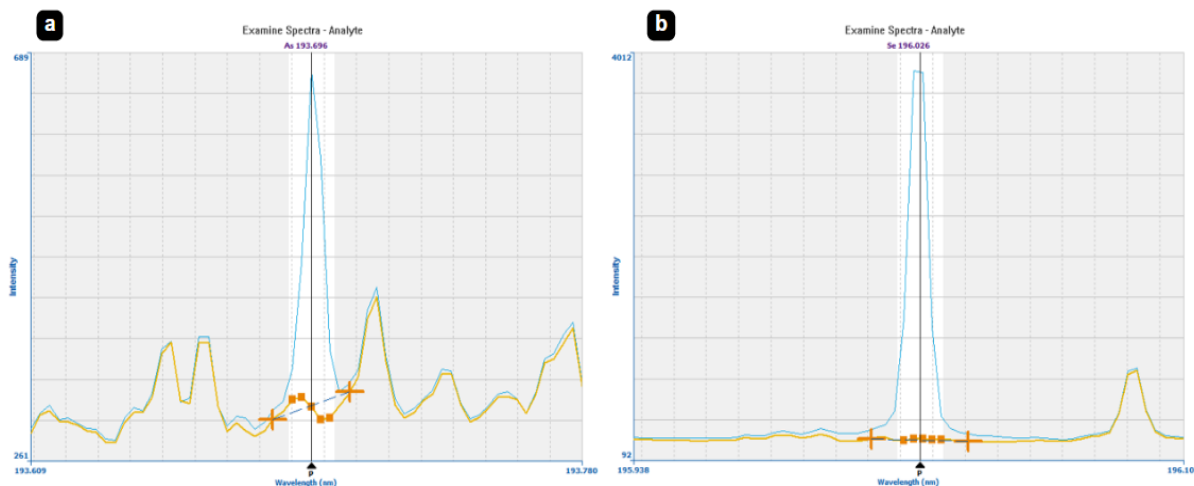


Figura 3 – Espectro de emissão para Solução Referência 100% e Solução Branco (a) em Arsênio 193.696 nm e (b) Selênio em 196.026 nm.

No teste de irradiação por microondas foram realizadas as análises de Arsênio e Selênio separadamente, uma vez que foi necessário o emprego de diferentes etapas de redução dos analitos para a formação dos respectivos hidretos voláteis. Para Arsênio foi empregado a reação empregando meio ácido, iodeto de potássio e ácido ascórbico enquanto que para Selênio a redução do Se^{+6} para Se^{+4} foi realizado através de aquecimento em meio ácido.

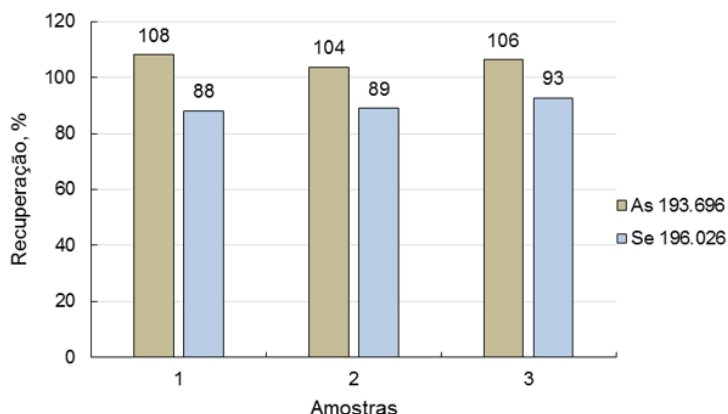


Figura 4– Teste de recuperação.

A Figura 4 representa os resultados obtidos das recuperações para os testes. Para este teste foram obtidos resultados para Precisão e Exatidão dentro dos critérios de aceitação descrito pela USP<730> (USP, 2022), desta forma o teste demonstrou ser promissor e por isso novos testes serão realizados para a validação do método proposto. O desvio padrão relativo da precisão para Arsênio foi de 2,0%, enquanto que para Selênio foi de 2,6%.

Durante o estudo foi realizada a linearidade para Arsênio e Selênio; as concentrações das soluções padrão de Arsênio e Selênio foram ajustadas ([As] = 2 mg.L⁻¹; [Se] = 20 mg.L⁻¹). Cinco réplicas foram preparadas e os resultados obtidos foram avaliados pelo software de avaliação estatística ACTION. As Tabelas 6 e 7 apresentam resumos dessas avaliações.

Tabela 6 - Resumo das Conclusões do estudo de Linearidade de Arsênio (Método dos Mínimos Quadrados Ordinários).

Teste	Conclusão
Teste F da ANOVA	Não rejeitamos a significância do modelo linear
Teste do Intercepto	Intercepto igual a zero
Coeficiente de Correlação de Pearson	R = 0.9991 que é maior que o proposto (0,99)
Teste de Normalidade dos Resíduos	Não rejeitamos a hipótese de normalidade dos resíduos
Teste de Homocedasticidade	Não rejeitamos a homocedasticidade da variância
Valores extremos na resposta	Não detectamos pontos extremos
Teste de independência das observações	Não detectado dependência das observações

Fonte: Autores, 2023.

Tabela 7 - Resumo das Conclusões do estudo de Linearidade de Selênio (Método dos Mínimos Quadrados Ordinários).

Teste	Conclusão
Teste F da ANOVA	Não rejeitamos a significância do modelo linear
Teste do Intercepto	Intercepto igual a zero
Coeficiente de Correlação de Pearson	R = 0.9997 que é maior que o proposto (0,99)
Teste de Normalidade dos Resíduos	Não rejeitamos a hipótese de normalidade dos resíduos
Teste de Homocedasticidade	Não rejeitamos a homocedasticidade da variância
Valores extremos na resposta	Não detectamos pontos extremos
Teste de independência das observações	Não detectado dependência das observações

Fonte: Autores, 2023.

As avaliações estatísticas realizadas no ACTION demonstraram que as faixas de trabalho utilizadas para Arsênio e Selênio podem ser representadas, de forma segura, por um modelo linear e o mesmo pode ser utilizado para predição de dados interpolados.

4. Considerações Finais

Nos estudos realizados, foi possível constatar que a sacarina sódica dihidratada adicionada à solução ácida é insolúvel, mas em solução neutra com adição da solução Redutora I apresentou resultados satisfatórios em relação a solubilidade da amostra, independentemente da concentração empregada. Porém, quando realizado o teste de formação de hidretos, não houve formação significativa de Selênio na forma de hidreto nas condições descritas pelo ensaio.

A decomposição ácida com ácido nítrico diluído assistida por irradiação de microondas mostrou-se mais eficiente para a decomposição das amostras e assim incorporada à versão final do método, com o intuito de evitar contaminações e perda dos analitos. Também foi necessário o emprego de diferentes etapas de redução dos analitos para a formação dos respectivos hidretos voláteis. Por esse motivo, optou-se por realizar as análises para As e Se separadamente.

A metodologia analítica desenvolvida na técnica de geração de hidretos por ICP OES apresentou grande eficiência na quantificação de Selênio e Arsênio, comprovados por meio dos resultados obtidos no teste de linearidade que apresentou um coeficiente de correlação de 0,99. Desta forma, o método pode ser aplicado na criação do protocolo de validação da metodologia analítica para a quantificação de Arsênio e Selênio na matéria-prima sacarina sódica dihidratada.

A fim de comprovar a efetividade dos ensaios realizados, é pretendido seguir com a etapa de validação analítica, a qual será avaliada em estudos futuros por meio dos parâmetros descritos na RDC 166/2017, no qual serão adotados testes de seletividade, linearidade, limite de quantificação, faixa de trabalho, precisão (repetibilidade), precisão intermediária, exatidão e robustez para quantificação de Arsênio e Selênio na matéria-prima a fim de atender aos requisitos estipulados pela legislação vigente e outras diretrizes internacionais.

Referências

ATSDR. Toxicological profile for selenium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, **Public Health Service**, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA. 2003

ATSDR. Toxicological profile for arsenic. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, **Public Health Service**, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA. 2007.

BORGES, ELISA MOURA. **Metodologia para determinação de arsênio, antimônio e bismuto por espectrometria de emissão óptica com fonte de plasma acoplado indutivamente (icpoes) e geração de hidretos aplicada à rochas**. 2005. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista - USP, Rio Claro, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 166 de 24 de julho de 2017.

GUILLEM-LLOBAT X. Defining, regulating and using saccharin at the outset of the industrial food era (1888-1914). **Appetite**. 2012 Dec;59(3):905-11. doi: 10.1016/j.appet.2012.09.003. Epub 2012 Sep 8. PMID: 22967818.

IARC. Arsenic, metals, fibres, and dusts: a review of human carcinogens. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. **International Agency for Research on Cancer, World Health Organization**, Lyon. 2012;100C.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. ICH. **Final Concept Paper Q3D: Impurities: Guideline for elemental impurities**. 2009. Disponível em: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q3D%20Concept%20Paper.pdf>. Acesso: 18 de março, 2023.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **ICH guideline Q3D (R2) on elemental impurities**. EMA/CHMP/ICH/353369/2013. 2022. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use_en-16.pdf Acesso: 18 de março, 2023.

MANDAL BK, SUZUKI KT. Arsenic around the world: a review. **Talanta** 2002; 58:201–35.PMID: 18968746.

PATACA, L. C. M.; BORTOLETO, G. G.; BUENO, M. I. M. S. Determinação de arsênio em águas contaminadas usando fluorescências de raios-X por energia dispersiva. **Quim. Nova**. Vol. 28. nov. 4 pág. 579-582. 2005.

PINHEIRO, FC, BARROS, AI, NÓBREGA, JA. Evaluation of dilute-and-shoot procedure for determination of inorganic impurities in liquid pharmaceutical samples by ICP OES. **Microchemical Journal** 146. 948–956. 2019.

POHL, P.; BIELAWSKA-POHL, A. DZIMITROWICZ, A.; JAMROZ, P. & WELNA, M. “Impact and practicability of recently introduced requirements on elemental impurities”. **TrAC Trends Anal. Chem.**, 101: 43-55, 2018.

POTES, MARIANA DA LUZ. **Desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de mercúrio e selênio utilizando técnicas de geração de vapor acopladas à espectrometria de absorção atômica com forno de grafite.** 120 f. Dissertação (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2018.

RIBEIRO, T. R.; PIROLLA, N. F. F. NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M. Adoçantes Artificiais e Naturais: Propriedades Químicas e Biológicas, Processos de Produção e Potenciais Efeitos Nocivos. **Rev. Virtual Quim.**, 12 (5), 1278-1318. ISSN 1984-6835. 2020.

SANTOS, GREICE MAGALHÃES. **Quantificação de As inorgânico em alimentos derivados de arroz mediante geração de hidretos e espectrometria de absorção atômica.** 82 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio grande do Sul, 2016.

SERBAN, ECATERINA ANCA; VASILE, GABRIELA; GALAON, TOMA; ENE, CORINA; PASCU, LUOANA FLORENTINA. HG-ICP-OES Technique, a Useful Tool for Arsenic Determination in Soft Water. **Revist Chimie**, vol. 71, n. 7, p. 379-390, julho. 2020.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION, THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 35a edição, **USP**, Rockville, Maryland, 2012 (Heavy Metals pág 145).

THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. USP. Saccharin Sodium. Stage 6. **Harmonization Official**. May 1, 2016. Disponível em: https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/usp-nf-notices/m74200.pdf Acesso em 05 de fevereiro de 2023.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. USP. 41. <730> Plasma Spectrochemistry, Rockville. **U.S. Pharmacopeia**. 2022. [Online]. Available: DocID: GUID-0547F508-697A-44F4-B2B0-C9C79A294503_2_en-US.

US EPA. **Selenium and compounds (CAS No. 7782-49-2). Integrated Risk.** Information System (IRIS).2002.

WELNA, M., SZYMCZYCHA-MADEJA, A. & POHL, P. Improvement of Determination of Trace Amounts of Arsenic and Selenium in Slim Coffee Products by HG-ICP-OES. **Food Anal. Methods** 7, 1016–1023. 2014.

WHITEHOUSE, C. R; BOULLATA, J.; MCCAULEY, L. A. The Potencial Toxicity of Artificial Sweeteners. **American Association of Occupational Health**. Nurses 2008, 56, 251.

WHO. Arsenic in drinking-water. Background document of development of WHO Guidelines for Drinking-water quality. **World Health Organization**, Geneva. 2011. WHO/SDE/WSH/03.04/75/Rev/1.

WHO. Selenium in Drinking-water; Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. **World Health Organization**, Geneva. 2011. WHO/HSE/WSH/10.01/14.