

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MATEUS ARAÚJO CASTRO E SOUZA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS
PARA A DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA, EM PLASMA
HUMANO, DE FÁRMACOS USADOS NO TRATAMENTO DE
DOENÇAS CARDIOVASCULARES**

Belo Horizonte, MG

2020

MATEUS ARAÚJO CASTRO E SOUZA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA A
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA, EM PLASMA HUMANO, DE FÁRMACOS
USADOS NO TRATAMENTO DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Christian Fernandes

Coorientador: Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Beatriz de Abreu
Glória

Belo Horizonte, MG

2020

S729d Souza, Mateus Araújo Castro e.
Desenvolvimento de métodos cromatográficos para a determinação simultânea, em plasma humano, de fármacos usados no tratamento de doenças cardiovasculares / Mateus Araújo Castro e Souza. – 2020.
186 f. : il.

Orientador: Christian Fernandes.

Coorientador: Gerson Antônio Pianetti.

Coorientadora: Maria Beatriz de Abreu Glória.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Hipertensão – Teses. 2. Métodos analíticos de preparação de amostras – Teses. 3. Cromatografia líquida – Teses. 4. Espectrometria de massa – Teses. 5. Fluorescência – Teses. 6. Dislipidemias – Teses. 7. Fármacos – Teses. I. Fernandes, Christian. II. Pianetti, Gerson Antônio. III. Glória, Maria Beatriz de Abreu. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.

CDD:615.4

Elaborado por Darlene Teresinha Schuler – CRB-6/1759



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

Desenvolvimento de métodos cromatográficos para a determinação simultânea, em plasma humano, de fármacos usados no tratamento de doenças cardiovasculares

MATEUS ARAÚJO CASTRO E SOUZA

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Dra. Maria Betânia de Freitas Marques

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM

Prof. Dr. Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes

Universidade Estadual Paulista - UNESP

Prof. Dr. José Eduardo Gonçalves

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Paula Rocha Chellini

Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Prof. Dr. Christian Fernandes - Orientador

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti - Coorientador

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Maria Beatriz de Abreu Glória - Coorientadora

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 17 de dezembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Jose Eduardo Goncalves, Professor do Magistério Superior**, em 18/12/2020, às 18:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Christian Fernandes, Professor do Magistério Superior**, em 18/12/2020, às 19:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes, Usuário Externo**, em 21/12/2020, às 16:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Beatriz de Abreu Gloria, Professora Magistério Superior - Voluntária**, em 14/01/2021, às 19:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Betânia de Freitas Marques, Usuário Externo**, em 15/01/2021, às 06:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gerson Antonio Pianetti, Professor do Magistério Superior**, em 15/01/2021, às 09:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paula Rocha Chellini, Usuário Externo**, em 15/01/2021, às 11:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0483657** e o código CRC **80971BEC**.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por nunca ter deixado faltar nada para mim e para a minha família e ter me mantido persistente nos momentos difíceis e de desânimo. A Ele eu devo tudo que conquistei.

Aos meus pais, por todo o amor, carinho e dedicação que sempre tiveram por mim e pelos meus irmãos.

À minha família, pelo amor, carinho, confiança, dedicação e por sempre acreditarem em mim. Em especial, ao meu irmão, Lucas, pelos valiosos conselhos e correções em algumas das partes deste trabalho.

À Tati, minha noiva, pelo amor, carinho, compreensão nos momentos difíceis e por toda a ajuda no decorrer destes anos, inclusive na extração e na elucidação estrutural da irbesartana.

Ao Allisson, meu amigo, pela convivência diária, pelos conselhos e pelos momentos de descontração.

Ao Christian, meu orientador, pelos valiosos conselhos e ensinamentos, pela orientação, pelas correções de texto e por fornecer as condições para a realização deste trabalho.

Aos meus coorientadores, Gerson Pianetti e Maria Beatriz, pelos ensinamentos, pelo auxílio, pelas correções de texto e por fornecer as condições para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos do almoço no bandeirão, André, Ivanei, Geraldo, Leonardo e Luan, pela amizade e pelos momentos de descontração, que ajudaram a tornar essa jornada mais leve.

Aos meus amigos da Faculdade de Farmácia, Naialy, Luan, Carlos Eduardo, Juliana Brêtas, Viviana e Luciana Nascimento, pela rica troca de informações, conselhos e pela amizade. À Naialy, pela parceria, por toda a ajuda na realização dos experimentos e pela troca de ideias ao longo desse período. Ao Luan, pelas parcerias e oportunidades de colaboração, pelas dicas e pelos conselhos.

Ao Vinícius Rocha e à Isabella Marques, meus alunos de iniciação científica, pela amizade e por toda a ajuda na realização dos experimentos.

À professora Maria das Graças Carvalho e em especial à servidora Camilla Paraguai, pelo auxílio na coleta de amostras de sangue, realizada no Laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFMG.

À professora Maria Auxiliadora Parreiras Martins e à Isabella Pacheco, bem como aos técnicos do Laboratório de Análises Clínicas do HC, pela coleta de amostras de sangue de pacientes atendidos no Ambulatório de Anticoagulação do Serviço de Hematologia e Oncologia do Hospital das Clínicas da UFMG.

Aos voluntários, que gentilmente doaram amostras de sangue para a realização dessa pesquisa. A contribuição de vocês foi imprescindível para a conclusão do trabalho.

Ao professor Adolfo Henrique de Moraes Silva, do Departamento de Química da UFMG, por autorizar a utilização do espectrofluorímetro do Laboratório de Espectroscopia no Ultravioleta-Visível.

À Farmácia Amphora, na pessoa da farmacêutica Karina de Sá Pedras, pela doação de insumos farmacêuticos ativos usados neste trabalho.

Ao professor Ricardo José Alves e em especial à servidora Ângela Marques, pela disponibilidade, pela doação de 1,2-dicloroetano e clorobenzeno e por autorizar a utilização do aparelho de ponto de fusão do Laboratório de Química Farmacêutica.

Aos membros da minha banca de qualificação, professores Ricardo Matias Orlando (Departamento de Química – UFMG), Rodrigo Maia de Pádua e José Eduardo Gonçalves (Faculdade de Farmácia – UFMG), pelas importantes contribuições.

A todos os meus professores, pelos valiosos ensinamentos durante essa jornada.

“Há três caminhos para o fracasso: não ensinar o que se sabe, não praticar o que se ensina e não perguntar o que se ignora.”

(São Beda)

RESUMO

A hipertensão e as dislipidemias estão entre os principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, que matam, aproximadamente, 17 milhões de pessoas a cada ano. Diversos fármacos e esquemas terapêuticos estão disponíveis para o tratamento dessas doenças. Assim, métodos para a análise simultânea de vários desses fármacos são úteis em uma ampla variedade de situações, como em estudos farmacocinéticos, de monitorização terapêutica e em análises toxicológicas. Com este trabalho, teve-se por objetivo desenvolver métodos para a determinação simultânea de fármacos usados no tratamento de doenças cardiovasculares. Um método para a determinação de olmesartana (OLM), irbesartana (IRB), losartana (LOS) e valsartana (VAL) em plasma humano, por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (CLAE-FL), foi desenvolvido. O desenvolvimento do método consistiu na otimização dos comprimentos de onda de excitação e de emissão, das condições cromatográficas e do preparo de amostra. Utilizou-se coluna cromatográfica Luna ciano (250 x 4,6 mm; 5 µm) e fase móvel constituída por ácido fosfórico 0,1% (v/v) e acetonitrila (ACN). Os analitos foram detectados utilizando-se comprimentos de onda de excitação de 260 nm e de emissão de 370 e 410 nm. Para o preparo das amostras, compararam-se duas técnicas convencionais (extração líquido-líquido e precipitação de proteínas – PPT) e uma miniaturizada (microextração em sorvente empacotado). A PPT demonstrou seletividade similar às demais técnicas e melhores recuperações para a determinação de OLM, IRB, LOS e VAL por CLAE-FL e, por isso, foi empregada para o preparo de amostra. O método foi validado, demonstrando ser seletivo, linear, preciso e exato. Também foi desenvolvido método para a determinação simultânea de 9 fármacos anti-hipertensivos e hipocolesterolemiantes, por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM). Para isso, otimizaram-se as transições de massas de quantificação e confirmação dos analitos, as condições da fonte de ionização, a separação cromatográfica e o preparo de amostra, que foi realizado por microextração líquido-líquido assistida por vórtex (VALLME). A separação cromatográfica foi realizada empregando-se coluna Onyx Monolithic e fase móvel constituída por ácido fórmico 0,1% (v/v) e ACN. Recuperações e limites de quantificação adequados foram obtidos empregando-se VALLME e CLAE-EM/EM com tempo de corrida de 8 minutos. O método foi validado, demonstrando ser seletivo, preciso, exato e linear para todos os analitos, com exceção do verapamil, para o qual as curvas foram melhor ajustadas com modelo quadrático. Após a validação, os dois métodos desenvolvidos foram aplicados com sucesso na análise de amostras de plasma obtidas de voluntários atendidos no Ambulatório de Anticoagulação do Serviço de Hematologia e Oncologia do Hospital das Clínicas da UFMG, usuários de medicamentos anti-hipertensivos e hipocolesterolemiantes.

Palavras-chave: Métodos bioanalíticos. Cromatografia líquida. Espectrometria de massas. Fluorescência. Preparo de amostras. Hipertensão. Dislipidemias.

ABSTRACT

Hypertension and dyslipidemias are among the main risk factors for the development of cardiovascular diseases, which kill approximately 17 million people each year. There are several drugs and therapeutic schemes available for the treatment of these diseases. Therefore, methods for simultaneous analysis of several of these drugs can be useful in a wide variety of situations, from pharmacokinetic and therapeutic drug monitoring studies to toxicological analyzes. The objective of this study was to develop methods for the simultaneous determination of drugs used in the treatment of cardiovascular diseases. A method for the determination of olmesartan (OLM), irbesartan (IRB), losartan (LOS) and valsartan (VAL) in human plasma, by high performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FL), was developed. The method development consisted in the optimization of excitation and emission wavelengths, chromatographic conditions and sample preparation. A Luna cyano column (250 x 4.6 mm; 5 μ m) and a mobile phase consisting of 0.1% phosphoric acid (v/v) and acetonitrile (ACN) were employed. The analytes were detected using excitation wavelength of 260 nm and emission wavelengths of 370 nm and 410 nm. For sample preparation, two conventional (liquid-liquid extraction - ELL - and protein precipitation - PPT) and one miniaturized (microextraction in packed sorbent - MEPS) techniques were compared. PPT showed similar selectivity to the other techniques and better recoveries for the determination of OLM, IRB, LOS and VAL by HPLC-FL and was used for sample preparation. The method was validated, showing to be selective, linear, precise and accurate. A method for simultaneous determination of 9 antihypertensive and hypocholesterolemic drugs, by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS), was also developed. The quantification and confirmation mass transitions for the analytes, the conditions of the ionization source, the chromatographic separation and sample preparation, which was carried out by vortex-assisted liquid-liquid microextraction (VALLME), were optimized. Chromatographic separation was performed using an Onyx Monolithic column and mobile phase consisting of 0.1% (v/v) formic acid and ACN. Suitable recoveries and lower limits of quantification were achieved using VALLME and HPLC-MS/MS with a run time of 8 minutes. The method was validated, showing to be selective, precise, accurate and linear for all analytes, except for verapamil, for which the curves were better fitted employing a quadratic model. After validation, the two developed methods were successfully applied for the analysis of plasma samples obtained from volunteers who are served at Ambulatório de Anticoagulação do Serviço de Hematologia e Oncologia do Hospital das Clínicas da UFMG and are users of antihypertensive and hypocholesterolemic drugs.

Key-words: Bioanalytical methods. Liquid chromatography. Mass spectrometry. Fluorescence. Sample preparation. Hypertension. Dyslipidemias.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da microextração líquido-líquido assistida por vórtex (VALLME).....	35
Figura 2 – Dispositivo utilizado em microextração por sorvente empacotado (MEPS). Em destaque o cartucho contendo o sorvente empacotado inserido na agulha.....	39
Figura 3 – Representação esquemática do funcionamento da fonte electrospray.....	46
Figura 4 – Representação esquemática de um espectrômetro de massas com fonte electrospray e analisador de massas do tipo triplo quadrupolo.....	48
Figura 5 – Análise das informações sobre preparo de amostra, separação e detecção, bem como do volume de amostra empregado, para a determinação de fármacos anti-hipertensivos e hipocolesterolemiantes em plasma humano, obtidas a partir da revisão da literatura.....	64
Figura 6 – Gráfico relacionando o número de trabalhos publicados sobre o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de fármacos anti-hipertensivos e hipocolesterolemiantes em plasma humano e o número de fármacos determinados simultaneamente.....	66
Figura 7 – Espectro de absorção no infravermelho da substância obtida na extração.....	99
Figura 8 – Espectro padrão da irbesartana obtido por meio da preparação de pastilha de KBr na faixa de número de ondas de 2000 a 400 cm^{-1}	99
Figura 9 – Cromatograma obtido pela injeção da solução da substância obtida na extração.....	100
Figura 10 – Sobreposição dos cromatogramas da solução da substância obtida na extração e do metanol (diluyente) (zoom).....	101
Figura 11 – Espectro de RMN de ^1H da substância extraída e purificada.....	103
Figura 12 – Espectros de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT 135 obtidos para a substância extraída e purificada.....	104
Figura 13 - Espectros de absorção no ultravioleta de CDC (A), IRB (B), LOS (C), OLM (D) e VAL (E).....	106

Figura 14 – Espectros de emissão de CDC (A), IRB (B), LOS (C), OLM (D) e VAL (E) para detecção por fluorescência.....	107
Figura 15 – Cromatogramas sobrepostos, obtidos pela análise de amostras de plasma adicionadas dos analitos no CQM, com as diferentes técnicas de preparo de amostras (MEPS, ELL e PPT). OLM, olmesartana; LOS, losartana; IRB, irbesartana; VAL, valsartana; CDC, candesartana cilexetila; PI, padrão interno.....	112
Figura 16 – Superfícies de resposta obtidas para razão sinal-ruído (S/R) dos picos de OLM, IRB, LOS, VAL e CDC na concentração de 100 ng/mL durante a otimização do método de preparo de amostra. OLM, olmesartana; LOS, losartana; IRB, irbesartana; VAL, valsartana; CDC, candesartana cilexetila; S/R, razão sinal-ruído; V_{ACN}/V_{plasma} , razão do volume de acetonitrila pelo volume de plasma.....	115
Figura 17 – Cromatogramas das amostras de plasma branco e da amostra no LIQ obtidos durante os testes de seletividade do método bioanalítico por CLAE-FL.....	118
Figura 18 – Curvas analíticas obtidas para OLM, IRB, LOS e VAL durante a validação do método bioanalítico.....	118
Figura 19 – Cromatogramas de amostras reais obtidos utilizando-se o método validado. Concentrações de losartana obtidas para as amostras: voluntário 1 – 237,07 ng/mL, voluntário 2 – 103,48 ng/mL, voluntário 8 – 122,73 ng/mL. LOS, losartana; CDC, candesartana cilexetila; PI, padrão interno.....	123
Figura 20 – Áreas dos picos dos analitos em função do pH da solução tampão adicionada à amostra durante a otimização do método por VALLME.....	132
Figura 21 – Áreas dos picos dos analitos em função da concentração de cloreto de sódio na solução tampão adicionada à amostra durante a otimização do método por VALLME.....	135
Figura 22 – Áreas dos picos dos analitos em função do volume de solução tampão adicionado à amostra durante a otimização do método por VALLME.....	136

Figura 23 – Áreas dos picos dos analitos em função do solvente extrator utilizado durante a otimização do método por VALLME. DCM, diclorometano; CLF, clorofórmio; CLB, clorobenzeno; DCE, 1,2-dicloroetano.....	138
Figura 24 – Áreas dos picos dos analitos em função do volume de solvente extrator (diclorometano) utilizado durante a otimização do método por VALLME.....	139
Figura 25 – Áreas dos picos dos analitos em função do tempo de agitação em vórtex utilizado durante a otimização do método por VALLME.....	140
Figura 26 – Representação esquemática do método de preparo de amostra por microextração líquido-líquido assistida por vórtex (VALLME)...	141
Figura 27 – Cromatogramas obtidos para uma amostra no LIQ (A) e uma amostra de plasma branco normal (plasma normal 1) (B) para avaliação da seletividade do método bioanalítico.....	145
Figura 28 – Curvas analíticas obtidas durante a avaliação da linearidade no primeiro dia da validação do método por CLAE-EM/EM.....	148
Figura 29 – Cromatogramas obtidos para a amostra 12 utilizando-se o método validado. Concentrações plasmáticas: CVD – 61,09 ng/mL, LOS – 3,32 ng/mL, DTZ – 44,29 ng/mL, VAR – 1810,67 ng/mL. CVD, carvedilol; LOS, losartana; DTZ, diltiazem; VAR, varfarina; IRB, irbesartana; PI, padrão interno.....	153

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características físico-químicas dos fármacos avaliados neste estudo.....	52
Tabela 2 – Características farmacocinéticas dos fármacos avaliados neste estudo.....	57
Tabela 3 – Métodos para a determinação de fármacos usados no tratamento de doenças cardiovasculares em plasma humano.....	59
Tabela 4 - Condições cromatográficas do gradiente exploratório amplo para a análise da substância obtida na extração, por CLAE.....	73
Tabela 5 - Condições cromatográficas iniciais para o desenvolvimento de método para determinação de CDC, IRB, LOS, OLM e VAL por CLAE- UV/DAD.....	76
Tabela 6 – Gradiente inicial para a determinação de CDC, IRB, LOS, OLM e VAL por CLAE-UV/DAD.....	76
Tabela 7 – Matriz do planejamento fatorial em dois níveis para a otimização do preparo de amostra por precipitação de proteínas.....	79
Tabela 8 – Concentrações de LOS, IRB, OLM e VAL nas amostras de plasma para a avaliação da linearidade do método bioanalítico.....	81
Tabela 9 – Concentrações de LOS, IRB, OLM e VAL nas amostras de plasma para a avaliação da precisão e exatidão do método bioanalítico.....	82
Tabela 10 – Parâmetros e condições testadas durante a otimização dos parâmetros da fonte electrospray.....	86
Tabela 11 - Condições cromatográficas utilizadas para a otimização dos parâmetros da fonte electrospray.....	87
Tabela 12 - Condições cromatográficas iniciais para o desenvolvimento de método para a determinação dos fármacos por CLAE-EM/EM.....	87
Tabela 13 – Gradiente utilizado para iniciar o desenvolvimento do método por CLAE-EM/EM.....	88
Tabela 14 – Modo de preparo das soluções tampão para a avaliação do efeito do pH na extração dos analitos por VALLME.....	90
Tabela 15 – Concentrações dos analitos nas amostras de plasma para a avaliação da linearidade do método bioanalítico.....	94

Tabela 16 – Concentrações dos analitos nas amostras de plasma para a avaliação da precisão e exatidão do método bioanalítico.....	95
Tabela 17 – Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ¹ H da substância extraída e purificada.....	105
Tabela 18 – Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ¹³ C da substância extraída e purificada.....	105
Tabela 19 – Gradiente otimizado para a determinação de CDC, IRB, LOS, OLM e VAL por CLAE–FL empregando coluna Waters Symmetry C ₁₈ . A, ácido fórmico 0,1% (v/v); B, acetonitrila.....	108
Tabela 20 – Parâmetros de adequabilidade do Sistema e de sensibilidade para a separação cromatográfica de CDC, IRB, LOS, OLM e VAL por CLAE-FL usando diferentes fases móveis aquosas e acetonitrila como modificador orgânico.....	109
Tabela 21 - Condições cromatográficas otimizadas para a determinação de CDC, IRB, LOS, OLM e VAL por CLAE-FL.....	110
Tabela 22 – Gradiente otimizado para a determinação de CDC, IRB, LOS, OLM e VAL por CLAE-FL empregando coluna Luna ciano.....	110
Tabela 23 – Resultados de recuperação obtidos para PPT + MEPS durante experimentos preliminares.....	113
Tabela 24 – Resultados de recuperação obtidos para a extração líquido-líquido (ELL) durante experimentos preliminares.....	113
Tabela 25 – Resultados de recuperação obtidos para a precipitação de proteínas durante experimentos preliminares.....	114
Tabela 26 – Análise de variância do planejamento fatorial para a predição da extração de olmesartana.....	115
Tabela 27 – Análise de variância do planejamento fatorial para a predição da extração de losartana.....	116
Tabela 28 – Análise de variância do planejamento fatorial para a predição da extração de irbesartana.....	116
Tabela 29 – Análise de variância do planejamento fatorial para a predição da extração de valsartana.....	116
Tabela 30 – Análise de variância do planejamento fatorial para a predição da extração de candesartana cilexetila (padrão interno).....	116

Tabela 31 – Parâmetros das curvas analíticas obtidas durante a validação do método por CLAE-FL.....	119
Tabela 32 – Resultados obtidos durante os testes para a avaliação da precisão, da exatidão e da recuperação do método bioanalítico por CLAE- FL.....	120
Tabela 33 – Resultados obtidos durante os testes para a avaliação da estabilidade de LOS, OLM, IRB e VAL em plasma.....	122
Tabela 34 – Concentração plasmática de losartana obtidas de amostras de voluntários com o método desenvolvido e validado.....	122
Tabela 35 – Parâmetros otimizados para a determinação de fármacos anti-hipertensivos e hipocolesterolemiantes por CLAE-EM/EM.....	125
Tabela 36 – Parâmetros e condições otimizadas para a fonte electrospray..	125
Tabela 37 – Gradiente com o qual se obteve a melhor separação cromatográfica para a determinação de fármacos anti-hipertensivos e hipocolesterolemiantes por CLAE-EM/EM.....	127
Tabela 38 - Condições cromatográficas otimizadas para a determinação de fármacos anti-hipertensivos e hipocolesterolemiantes por CLAE- EM/EM.....	128
Tabela 39 – Tempos de retenção médios obtidos para os analitos utilizando-se as condições cromatográficas otimizadas.....	128
Tabela 40 – Resultados obtidos durante a avaliação da seletividade do método bioanalítico por CLAE-EM/EM.....	144
Tabela 41 – Resultados obtidos para a avaliação do efeito matriz do método bioanalítico por CLAE-EM/EM.....	146
Tabela 42 – Parâmetros das três curvas analíticas obtidas para cada analito durante a validação do método bioanalítico por CLAE-EM/EM.....	147
Tabela 43 – Resultados obtidos durante os testes para a avaliação da precisão, da exatidão e da recuperação do método bioanalítico por CLAE- EM/EM.....	149
Tabela 44 – Resultados obtidos durante a avaliação da estabilidade dos analitos em plasma.....	151

Tabela 45 – Resultados de concentração plasmática obtidos para CVD, LOS, DTZ, ATV e VAR nas amostras reais avaliadas, obtidos com o método desenvolvido e validado.....	152
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA-DLLME	Air-assisted dispersive liquid-liquid microextraction; Microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ar
ACN	Acetonitrila
AF	Ácido fórmico
ANL	Anlodipino
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization; Ionização química à pressão atmosférica
APPI	Atmospheric pressure photo-ionization; Fotoionização à pressão atmosférica
AT ₁	Receptor do tipo I de angiotensina II
ATR	Attenuated Total Reflection; Reflexão Total Atenuada
ATV	Atorvastatina
C ₁₈	Octadecilsilano
C ₂	Etilsilano
C ₈	Octilsilano
CAD	Collisionally activated dissociation; Dissociação ativada por colisão
CAM	Molibdato cérico de amônio
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDC	Candesartana cilexetila
CE	Collision energy; Energia de colisão
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CL-FN	Cromatografia Líquida de fase normal
CL-FR	Cromatografia Líquida de fase reversa
CLUE	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
C _{máx}	Concentração plasmática máxima
CN	Ciano
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CQA	Controle de qualidade de alta concentração
CQB	Controle de qualidade de baixa concentração
CQD	Controle de qualidade de diluição
CQLIQ	Controle de qualidade no limite inferior de quantificação
CQM	Controle de qualidade de média concentração
CVD	Carvedilol
CXP	Collision cell exit potential; Potencial de saída da célula de colisão
DAD	Diode Array Detector; Arranjo de diodos
DCM	Diclorometano
DCVs	Doenças cardiovasculares
DLLME	Dispersive liquid-liquid microextraction; Microextração líquido-líquido dispersiva
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (continuação)

DP	Declustering Potential; Potencial de desagregação
DPR	Desvio Padrão Relativo
DTZ	Diltiazem
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ECC	Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento
ECD	Estabilidade de curta duração
EFS	Extração em Fase Sólida
ELD	Estabilidade de longa duração
ELL	Extração Líquido-Líquido
EM	Espectrometria de massas
EM/EM	Espectrometria de massas sequencial
EMA	European Medicines Agency; Agência Europeia de Medicamentos
EPP	Estabilidade pós-processamento
EPR	Erro padrão relativo
ESI	Electrospray Ionization; Ionização por <i>electrospray</i>
ESP	Espironolactona
FDA	Food and Drug Analysis
FIA	Flow Injection Analysis; Análise por injeção em fluxo
FL	Fluorescência
<i>g</i>	Força centrífuga
GS1	Gás de nebulização
GS2	Gás auxiliar
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HCl _{conc}	Ácido clorídrico concentrado
HDL	High Density Lipoprotein; Lipoproteína de alta densidade
HF-LPME	Hollow fiber liquid phase microextraction; Microextração em fase líquida com fibra oca
HILIC	Hydrophilic interaction liquid chromatography; Cromatografia por interações hidrofílicas
IRB	Irbesartana
<i>k</i>	Fator de retenção
KBr	Brometo de potássio
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LDL	Low Density Lipoprotein; Lipoproteína de baixa densidade
LIQ	Limite Inferior de Quantificação
Log D	Logaritmo do coeficiente de distribuição
Log P	Logaritmo do coeficiente de partição octanol/água
LOS	Losartana

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (continuação)

LSQ	Limite Superior de Quantificação
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MEPS	Microextraction by Packed Sorbent; Microextração por sorvente empacotado
MIP	Molecularly Imprinted Polymer; Polímero de Impressão Molecular
MRM	Multiple Reaction Monitoring; Monitorização de reações múltiplas
N	Número de pratos
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NH ₂	Amino
OLM	Olmesartana
PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAS	Pressão Arterial Sistólica
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Padrão Interno
pKa	Logaritmo negativo da constante de acidez
PPT	Precipitação de proteínas
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
q ₂	Célula de colisão
R ²	Coefficiente de determinação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RF	Radiofrequência
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
Rs	Resolução
SIM	Single ion monitoring; Monitoramento de íon único
S/R	Razão sinal-ruído
SBSE	Stir bar sorptive extraction; Extração sortiva em barra de agitação
SCX	Strong cation exchange; Troca catiônica forte
SDME	Single drop microextraction; Microextração em gota suspensa
SPME	Solid phase microextraction; Microextração em fase sólida
SQR	Substância química de referência
T	Fator de cauda
<i>t</i> _{1/2}	Tempo de meia-vida de eliminação
TEA	Trietilamina
TFA	Trifluoroacetic acid; ácido trifluoroacético
<i>t</i> _{máx}	Tempo de absorção máxima

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (continuação)

TOF	Time of flight; Tempo de voo
TQD	Tripla quadrupolo
t_R	Tempo de retenção
UA-DLLME	Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction; Microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ultrassom
USP	United States Pharmacopeia; Farmacopeia dos Estados Unidos da América
UV	Ultravioleta
VA-DLLME	Vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction; Microextração líquido-líquido dispersiva assistida por vórtex
VAL	Valsartana
VALLME	Vortex-assisted liquid-liquid microextraction, Microextração líquido-líquido assistida por vórtex
VAR	Varfarina
VPM	Verapamil

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	25
2.1 Geral	25
2.2 Específicos	25
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
3.1 Doenças cardiovasculares – características e epidemiologia	26
3.2 Esquemas de tratamento da hipertensão arterial e das dislipidemias	27
3.2.1 Hipertensão arterial sistêmica (HAS)	27
3.2.2 Dislipidemias	28
3.3 Determinação de fármacos em matrizes biológicas	30
3.3.1 Preparo de amostras	30
3.3.2 Cromatografia líquida e detecção	40
3.3.3 Características físico-químicas dos fármacos	51
3.3.4 Características farmacocinéticas dos fármacos	57
3.3.5 Métodos bioanalíticos para a determinação de fármacos anti-hipertensivos e hipocolesterolemiantes em plasma humano	58
4 MATERIAIS E MÉTODOS	67
4.1 Materiais	67
4.1.1 Medicamentos	67
4.1.2 Substâncias químicas de referência e insumos farmacêuticos ativos	67
4.1.3 Reagentes	67
4.1.4 Amostras biológicas	68
4.1.5 Materiais, vidrarias e instrumentos	69
4.1.6 Equipamentos	70
4.2 Métodos	71
4.2.1 Obtenção de irbesartana a partir de comprimidos comerciais e sua caracterização	71
4.2.2 Método bioanalítico para determinação de olmesartana, irbesartana, losartana e valsartana em plasma humano por	

cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fluorescência (CLAE-FL).....	74
4.2.3 Método bioanalítico para a determinação simultânea de fármacos anti-hipertensivos e hipocolesterolemiantes em plasma humano empregando microextração líquido-líquido assistida por vórtex (VALLME) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM).....	84
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	98
5.1 Obtenção de irbesartana a partir de comprimidos comerciais e sua caracterização.....	98
5.1.1 Caracterização da substância obtida na extração.....	98
5.2 Método bioanalítico para determinação de olmesartana, irbesartana, losartana e valsartana em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (CLAE-FL).....	106
5.2.1 Determinação dos comprimentos de onda de excitação e emissão para detecção dos fármacos por fluorescência.....	106
5.2.2 Otimização das condições cromatográficas.....	107
5.2.3 Preparo de amostra.....	111
5.2.4 Validação do método bioanalítico.....	117
5.2.5 Aplicação do método bioanalítico.....	122
5.3 Método bioanalítico para a determinação simultânea de fármacos anti-hipertensivos e hipocolesterolemiantes em plasma humano empregando microextração líquido-líquido assistida por vórtex (VALLME) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM).....	124
5.3.1 Otimização das condições do espectrômetro de massas.....	124
5.3.2 Otimização das condições cromatográficas.....	126
5.3.3 Otimização do método de preparo de amostra.....	129
5.3.4 Validação do método bioanalítico.....	143
5.3.5 Aplicação do método bioanalítico.....	152
6 CONCLUSÕES.....	155
REFERÊNCIAS.....	157

APÊNDICE A – Espectros de massas de fragmentação obtidos para todos os analitos do método por CLAE-EM/EM.....	169
APÊNDICE B – Gráficos de log D para todos os analitos avaliados com o método bioanalítico por CLAE-EM/EM obtidos com o software <i>log D predictor</i> (CHEMAXON, 2020).....	174
ANEXO A – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFMG, contendo a primeira e a última página (aprovação do projeto).....	177
ANEXO B – Certificado de apresentação de pôster do IV ABCF Congress, realizado em São Paulo - SP, em setembro/2018.....	178
ANEXO C – Certificados de apresentação de pôster e de menção honrosa do Simpósio em Ciências Farmacêuticas – Sincifar, realizado em Belo Horizonte - MG, em novembro/2018.....	179
ANEXO D – Certificado de apresentação de pôster do Simpósio em Ciências Farmacêuticas – Sincifar, realizado em Belo Horizonte - MG, em novembro/2018.....	180
ANEXO E – Certificado de apresentação de pôster do Simpósio Latino Americano em Cromatografia e Técnicas Relacionadas (COLACRO), realizado em Aracaju - SE, em julho/2019.....	181
ANEXO F – Artigo publicado no periódico <i>Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis</i> (volume 188), em junho de 2020.....	182
ANEXO G – Artigo publicado no periódico <i>European Journal of Pharmaceutical Sciences</i> (volume 119), em 2018, como resultado de colaboração realizada durante o período do doutorado.....	183
ANEXO H – Artigo publicado no periódico <i>International Journal of Pharmaceutics</i> (volume 587), em 2020, como resultado de colaboração realizada durante o período do doutorado.....	184
ANEXO I – Artigo publicado no periódico <i>Journal of Chromatographic Science</i>, em outubro de 2020, como resultado de colaboração realizada durante o período do doutorado.....	185
ANEXO J – Artigo publicado no periódico <i>Current Pharmaceutical Analysis</i> (volume 16), em 2020, durante o período do doutorado.....	186

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares representam a principal causa de morte no Brasil e no mundo. No ano de 2016, foram responsáveis pela morte de 17,9 milhões de pessoas, o que representou 31% do total de mortes no mundo. A hipertensão arterial sistêmica (HAS) e as dislipidemias estão entre os principais fatores de risco metabólicos para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (WHO, 2017).

As dislipidemias e a HAS podem causar a aterosclerose, doença inflamatória crônica provocada pela agressão endotelial, principalmente em artérias de médio e grande calibre, que consiste na formação de uma placa aterosclerótica capaz de ocluir a luz desses vasos, podendo levar a ocorrência de doenças cardiovasculares, como o infarto e o acidente vascular encefálico (FALUDI *et al.*, 2017; WHO, 2011).

A diversidade de fármacos e classes terapêuticas para o tratamento da hipertensão arterial sistêmica e das dislipidemias, bem como a presença de comorbidades e esquemas de tratamento diversos, fazem com que o desenvolvimento de métodos analíticos abrangentes para a determinação desses fármacos em amostras biológicas seja um desafio.

A análise de fármacos em matrizes biológicas pode ser necessária em uma ampla variedade de situações, como na realização de estudos farmacocinéticos, na monitorização terapêutica, em estudos toxicológicos, na análise anti-doping e no desenvolvimento de novas formulações (PENG; CHIOU, 1990).

Em uma busca na literatura, foram encontrados métodos para a determinação simultânea, em plasma humano, de fármacos anti-hipertensivos e hipocolesterolemiantes. Entretanto, poucos realizaram a determinação simultânea de vários fármacos. Além disso, técnicas modernas e miniaturizadas de preparo de amostra foram pouco empregadas com essa finalidade.

Dessa forma, com este estudo, teve-se por finalidade desenvolver métodos bioanalíticos para a determinação simultânea de fármacos anti-hipertensivos e hipocolesterolemiantes em plasma humano. Foram selecionados 11 fármacos, 7 deles presentes na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) (BRASIL, 2017), para o desenvolvimento dos métodos bioanalíticos. Nesse sentido, os métodos desenvolvidos são importantes ferramentas para a avaliação da adesão ao tratamento e para a monitorização terapêutica, já que os fármacos incluídos na RENAME estão entre os mais utilizados pela população brasileira. Os métodos foram validados de acordo com a normatização vigente e aplicados em amostras de voluntários atendidos no Ambulatório de Anticoagulação do Serviço de Hematologia e Oncologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Desenvolver métodos bioanalíticos modernos para a determinação simultânea, em plasma humano, de fármacos anti-hipertensivos e hipocolesterolemiantes empregando a cromatografia líquida de alta eficiência.

2.2 Específicos

- Extrair irbesartana a partir de comprimidos comerciais e caracterizá-la empregando técnicas espectroscópicas e cromatográficas.
- Avaliar e comparar diferentes técnicas de preparo de amostras, convencionais (precipitação de proteínas e extração líquido-líquido) e moderna (microextração em sorvente empacotado - MEPS), para a extração de losartana, irbesartana, olmesartana e valsartana a partir de amostras de plasma humano.
- Desenvolver e validar método bioanalítico para a determinação simultânea de losartana, irbesartana, olmesartana e valsartana em amostras de plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (CLAE-FL).
- Desenvolver e validar método bioanalítico para a determinação simultânea de fármacos anti-hipertensivos e hipocolesterolemiantes em amostras de plasma humano empregando microextração líquido-líquido assistida por vórtex (VALLME) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM).
- Empregar os métodos validados para a determinação da concentração plasmática dos fármacos estudados em amostras obtidas de pacientes que fazem uso de medicamentos anti-hipertensivos e hipocolesterolemiantes.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Doenças cardiovasculares – características e epidemiologia

As doenças cardiovasculares (DCVs) são um grupo de doenças do coração e dos vasos sanguíneos que incluem a doença arterial coronariana, a doença cerebrovascular, a doença arterial periférica, a doença cardíaca reumática, as doenças cardíacas congênitas, a trombose venosa profunda e a embolia pulmonar (WHO, 2017).

As DCVs são as maiores causas de óbito no mundo, matando aproximadamente 17,9 milhões de pessoas em 2016, cerca de 31% das mortes em todo o mundo. Dessas, 85% foram causadas por infarto agudo do miocárdio e acidente vascular encefálico. Estima-se que 75% das mortes causadas por DCVs ocorreram em países de baixa e média renda (WHO, 2017). No Brasil, foram mais de 1,3 milhão de óbitos em 2017, sendo 27,3% causados por DCVs, a principal causa de morte no país (MALTA *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Os principais fatores de risco comportamentais para o desenvolvimento de DCVs são a alimentação não saudável, o sedentarismo, o tabagismo e o alcoolismo. Esses fatores de risco podem ser mensurados nos indivíduos a partir do aumento da pressão arterial, da glicemia, da concentração sérica de lípidos, do sobrepeso e da obesidade (WHO, 2017).

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) e as dislipidemias estão entre os principais fatores de risco para o desenvolvimento de DCVs. A HAS, caracterizada pela elevação sustentada dos níveis pressóricos sistólico (≥ 140 mmHg) e/ou diastólico (≥ 90 mmHg), é responsável por 45% das mortes causadas por doenças arteriais coronarianas e 51% das mortes causadas por acidente vascular encefálico (MALACHIAS *et al.*, 2016; WHO, 2013).

No Brasil, a HAS atinge 32,5% dos indivíduos adultos e mais de 60% dos idosos, contribuindo diretamente ou indiretamente para 50% das mortes decorrentes de

doenças cardiovasculares. O impacto econômico causado pela doença também é grande. As complicações causadas pela hipertensão, juntamente com a diabetes, causam perda de produtividade no trabalho e diminuição da renda familiar, tendo causado um prejuízo estimado em US\$ 4,18 bilhões entre 2006 e 2015 (MALACHIAS *et al.*, 2016).

As dislipidemias são distúrbios metabólicos caracterizados por alterações qualitativas e/ou quantitativas de lipídeos e lipoproteínas no plasma. Elas podem se manifestar pelo aumento da concentração sérica de colesterol total, de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e de triglicérides, bem como por uma redução nos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) (ANGELICO; BARATTA; DEL BEN, 2013).

As dislipidemias e a HAS podem causar aterosclerose, doença inflamatória crônica que ocorre em resposta à agressão endotelial, e, conseqüentemente, podem causar doenças cardiovasculares, como o infarto e o acidente vascular encefálico (FALUDI *et al.*, 2017). Dessa forma, a prevenção e o tratamento da HAS e das dislipidemias são de extrema importância para a prevenção de doenças cardiovasculares.

3.2 Esquemas de tratamento da hipertensão arterial e das dislipidemias

3.2.1 Hipertensão arterial sistêmica (HAS)

O tratamento da HAS tem como finalidade a diminuição da pressão arterial e, em última instância, a redução da morbimortalidade cardiovascular. Diversos fármacos de diferentes classes estão disponíveis, dentre eles os diuréticos, os agentes de ação central, os betabloqueadores, os alfabloqueadores, os vasodilatadores diretos, os bloqueadores dos canais de cálcio, os inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), os bloqueadores dos receptores AT₁ da angiotensina II e os inibidores diretos da renina (MALACHIAS *et al.*, 2016).

O tratamento da HAS consiste primeiramente na modificação do estilo de vida, pela adoção de uma dieta saudável, com baixa ingestão de sódio, pela prática de exercícios físicos, controle do estresse, diminuição do peso corporal, diminuição do

consumo de bebidas alcóolicas e cessação do tabagismo. Porém, quando essas medidas não são suficientes, podem ser utilizados fármacos em monoterapia ou em associação para o tratamento da HAS, dependendo da necessidade do paciente (MALACHIAS *et al.*, 2016; UNGER *et al.*, 2020).

O tratamento de pacientes com HAS em estágio 1, caracterizado por pressão arterial sistólica (PAS) entre 140 e 159 mmHg e por pressão arterial diastólica (PAD) entre 90 e 99 mmHg, e baixo ou moderado risco para o desenvolvimento de DCVs consiste na modificação do estilo de vida e na administração de um fármaco, que pode ser um diurético, um inibidor da ECA, um bloqueador dos canais de cálcio, um bloqueador dos receptores de angiotensina II ou um betabloqueador (em casos específicos), em monoterapia. Caso a meta de PA não tenha sido atingida ou reações adversas intoleráveis tenham ocorrido, o profissional prescritor pode optar pelo aumento da dose, pela associação de um segundo fármaco ou pela substituição do medicamento (MALACHIAS *et al.*, 2016; UNGER *et al.*, 2020; WHELTON *et al.*, 2018).

Para pacientes com HAS em estágio 1 e risco cardiovascular alto ou em estágios 2 (PAS entre 160 e 179 mmHg e/ou PAD entre 100 e 109 mmHg) ou 3 (PAS maior ou igual a 180 mmHg e PAD maior ou igual a 110 mmHg), o tratamento consiste na mudança de estilo de vida e na combinação de dois fármacos de classes diferentes em doses baixas. Caso a meta de PA não tenha sido atingida ou reações adversas intoleráveis tenham ocorrido, o médico pode optar pelo aumento da dose, pela associação de um terceiro fármaco ou pela substituição da combinação de fármacos. Caso nenhuma dessas medidas tenham êxito, o profissional pode optar pela adição de outros fármacos ao tratamento (MALACHIAS *et al.*, 2016; UNGER *et al.*, 2020; WHELTON *et al.*, 2018).

3.2.2 Dislipidemias

A decisão para o início da terapia farmacológica das dislipidemias depende do risco cardiovascular do paciente e do tipo de dislipidemia presente. Em pacientes com risco cardiovascular baixo ou moderado, o tratamento das dislipidemias envolve, a princípio, mudanças no estilo de vida, como a perda de peso, a prática de atividades

físicas, a redução da ingestão de alimentos ricos em colesterol, ácidos graxos saturados, ácidos graxos trans e carboidratos. Caso a mudança de estilo de vida não seja suficiente para diminuir a concentração sérica dos lípidos, faz-se necessário associar a mudança de estilo de vida ao tratamento farmacológico (FALUDI *et al.*, 2017; MACH *et al.*, 2020).

No caso de pacientes com risco alto ou muito alto, o tratamento deve incluir medicamentos aliados às mudanças no estilo de vida. A escolha da classe terapêutica a ser utilizada depende do tipo de dislipidemia apresentado, já que os medicamentos hipolipemiantes são divididos nos que agem predominantemente nas taxas séricas de colesterol e naqueles que agem predominantemente nas taxas séricas de triglicerídeos (FALUDI *et al.*, 2017; MACH *et al.*, 2020).

Em pacientes com hipercolesterolemia isolada, as estatinas são os medicamentos recomendados, em monoterapia ou em associação com a ezetimiba, colestiramina e, eventualmente, com os fibratos ou ácido nicotínico. As estatinas disponíveis no mercado são a sinvastatina, a pravastatina, a fluvastatina, a pitavastatina, a atorvastatina e a rosuvastatina. Para pacientes com intolerância às estatinas, a ezetimiba em monoterapia pode ser empregada. Já para aqueles que apresentam efeitos adversos com doses elevadas de estatina, a ezetimiba pode ser associada a doses toleradas de estatina. A colestiramina, único fármaco da classe das resinas disponível no Brasil, também pode ser usada quando a meta de concentração sérica de LDL não é atingida, mesmo com o uso de estatinas potentes em doses efetivas (FALUDI *et al.*, 2017; MACH *et al.*, 2020).

Para o tratamento de pacientes com hipertrigliceridemia isolada, os fibratos são os fármacos indicados prioritariamente e, em segundo lugar, o ácido nicotínico ou a associação de ambos. Exemplos de fármacos dessa classe são o bezafibrato, a genfibrozila, o etofibrato, o fenofibrato e o ciprofibrato. Na hiperlipidemia mista (hipercolesterolemia + hipertrigliceridemia), pacientes com concentrações séricas de triglicerídeos acima de 500 mg/dL devem iniciar o tratamento com um fibrato, associando-se, caso necessário, ácido nicotínico ou ácidos graxos ômega 3. Caso ainda haja a necessidade de redução da colesterolemia, pode-se adicionar uma

estatina e/ou outros fármacos hipocolesterolemiantes. O uso de genfibrozila, um fibrato, deve ser evitado nas associações de estatinas e fibratos (FALUDI *et al.*, 2017; MACH *et al.*, 2020).

3.3 Determinação de fármacos em matrizes biológicas

A diversidade de fármacos e classes terapêuticas para o tratamento da hipertensão arterial sistêmica e das dislipidemias, bem como a presença de comorbidades e esquemas de tratamento diversos, fazem com que o desenvolvimento de métodos analíticos abrangentes para a determinação desses fármacos em amostras biológicas seja um desafio.

A análise de fármacos em matrizes biológicas pode ser necessária em uma ampla variedade de situações, como em estudos farmacocinéticos para o desenvolvimento de novos medicamentos e formas farmacêuticas; em estudos de bioequivalência ou biodisponibilidade relativa, para o desenvolvimento de medicamentos genéricos ou similares; na monitorização terapêutica, no caso de fármacos com baixo índice terapêutico ou em condições patológicas que a tornem necessária; em estudos toxicológicos, para a identificação de envenenamento, da causa da morte e de drogas ilícitas; e na análise anti-doping. A escolha da matriz biológica depende dos objetivos da análise e das características farmacocinéticas do analito (PENG; CHIOU, 1990).

A determinação de fármacos em amostras biológicas envolve, geralmente, quatro etapas, que são o preparo de amostras, a separação, a detecção e o tratamento dos dados (CASSIANO *et al.*, 2006). Cada uma dessas etapas é de extrema importância, mas o preparo de amostras e as técnicas de separação e detecção merecem um destaque.

3.3.1 Preparo de amostras

Amostras biológicas, como sangue, plasma, soro, urina, líquido cefalorraquidiano, entre outras, são misturas muito complexas de constituintes. Fármacos ou substâncias tóxicas são componentes minoritários nas amostras, que normalmente são

constituídas por proteínas, fosfolípidos, sais inorgânicos e uma ampla variedade de substâncias orgânicas (QUEIROZ; SOUZA, 2018).

Neste contexto, o preparo de amostras é extremamente importante, já que a injeção direta da amostra ou a injeção da amostra diluída no sistema cromatográfico pode causar uma série de entupimentos em tubulações e um aumento rápido da pressão da coluna cromatográfica, atribuído à precipitação das proteínas da amostra quando em contato com o solvente orgânico ou os sais dos tampões normalmente empregados na fase móvel, o que poderia causar uma diminuição significativa na vida útil dos equipamentos e das colunas cromatográficas (BLANCHARD, 1981). Além disso, o preparo de amostras é primordial para eliminar a maioria dos interferentes endógenos da matriz biológica, para diminuir o efeito matriz, no caso de detecção por espectrometria de massas, e para isolar e concentrar os analitos de interesse (QUEIROZ; SOUZA, 2018).

Será feita uma breve revisão sobre as técnicas de preparo de amostra utilizadas para a determinação de fármacos em amostras biológicas, separando-as em duas categorias: as baseadas em solventes e aquelas baseadas em sorventes.

3.3.1.1 Técnicas de preparo de amostra baseadas em solventes

As técnicas de preparo de amostra baseadas em solventes compreendem a precipitação de proteínas, a extração líquido-líquido e as suas miniaturizações.

A precipitação de proteínas é uma técnica adequada para matrizes biológicas que possuem alta porcentagem de proteínas em sua composição, como plasma, soro ou sangue total. Ácidos, solventes orgânicos, sais e metais podem ser usados como agentes precipitantes (STONE, 2017).

Os solventes orgânicos solúveis em água diminuem a constante dielétrica da amostra aquosa, o que aumenta a atração entre moléculas ionizadas e facilita a interação eletrostática entre proteínas. Além disso, eles deslocam as moléculas de água ordenadas em volta das regiões hidrofóbicas das superfícies das proteínas, o que

minimiza as interações hidrofóbicas entre elas, fazendo com que as interações elétricas se tornem predominantes, o que causa a agregação das proteínas (POLSON *et al.*, 2003). As soluções ácidas formam sais com os grupos amino das proteínas, que estão carregados positivamente em pH abaixo do ponto isoelétrico das proteínas (BLANCHARD, 1981).

A solubilidade das proteínas na amostra aquosa resulta das interações polares com a água, interações iônicas com sais e forças eletrostáticas de repulsão entre moléculas de mesma carga. No ponto isoelétrico, uma proteína não possui carga líquida, o que faz com que ela tenha a menor solubilidade em solventes aquosos. Abaixo e acima do ponto isoelétrico, as proteínas tem carga líquida positiva e negativa, respectivamente (POLSON *et al.*, 2003).

Os metais, como o zinco e o cobre, formam sais insolúveis com as proteínas devido a suas interações com os grupos carboxilato das proteínas, ionizados negativamente em pH acima do ponto isoelétrico (BLANCHARD, 1981).

Polson e colaboradores (2003) realizaram um estudo para se determinar a eficiência de diferentes agentes precipitantes em amostras de plasma de ratos, de camundongos, de cachorros e de humanos. Eles avaliaram solventes orgânicos (acetonitrila, etanol e metanol), soluções ácidas (ácido tricloroacético e ácido fosfórico), sais (cloreto de amônio e sulfato de amônio) e metais (sulfato de zinco) em diferentes proporções em relação ao volume de plasma utilizado. Os resultados demonstraram que o uso de acetonitrila, sulfato de zinco e ácido tricloroacético levaram a maior precipitação das proteínas das diferentes fontes de plasma e a resultados mais reprodutíveis.

A precipitação de proteínas possui vantagens e desvantagens. A simplicidade, a perda mínima de amostra, já que os procedimentos apresentam poucas etapas, o uso de reagentes baratos, procedimentos pouco trabalhosos e a aplicabilidade a uma vasta gama de analitos são algumas das vantagens dessa técnica. As desvantagens da precipitação de proteínas consistem na impossibilidade de concentração dos analitos, dependendo do tipo de agente precipitante utilizado, supressão iônica significativa,

causada por fosfolípídeos, na espectrometria de massas, e falta de robustez (STONE, 2017).

A extração líquido-líquido (ELL) é baseada na adição de um solvente orgânico imiscível à amostra biológica. É estabelecido um equilíbrio de partição, em que moléculas apolares tendem a migrar para a fase orgânica e moléculas polares tendem a permanecer na solução aquosa (STONE, 2017).

O procedimento para a realização da ELL consiste na adição do solvente orgânico à amostra, que em seguida é agitada vigorosamente para que a mistura atinja rapidamente o equilíbrio de partição. Na sequência, a amostra é centrifugada para a separação das fases. Então, a fase orgânica é coletada, evaporada e o resíduo ressuspenso em solução compatível com a fase móvel do método cromatográfico utilizado (STONE, 2017). No caso de se usar cromatografia gasosa, a fase orgânica pode ser injetada diretamente no cromatógrafo. Diferentes solventes orgânicos, mais ou menos densos do que a água, podem ser empregados.

Na análise de substâncias ionizáveis, especial atenção deve ser dada ao pH da amostra, já que apenas analitos não ionizados são extraídos eficientemente pelo solvente orgânico. Para se aumentar a eficiência de extração, o pH da amostra deve ser ajustado para valores abaixo de $pK_a - 2$, para analitos ácidos, e para valores superiores a $pK_a + 2$, no caso de analitos básicos (BYLDA *et al.*, 2014).

As vantagens da ELL são o baixo custo dos reagentes empregados, moderada seletividade, potencial para concentrar os analitos e ótimo *clean up* da amostra, incluindo a remoção de fosfolípídeos. Por outro lado, a ELL é uma técnica mais complexa do que a PPT, mais demorada, demanda analistas treinados, maior tempo gasto para o desenvolvimento do método, dificuldade de automação, limitação no caso de analitos polares e o elevado gasto de solventes orgânicos (STONE, 2017).

Para melhorar a eficiência de extração de substâncias polares, solventes orgânicos polares, solúveis em água, vem sendo testados. Nesse caso, a separação de fases pode ser alcançada pela adição de sal em concentrações elevadas, o que faz com

que a fase aquosa se torne muito mais polar do que o solvente orgânico, causando a separação das fases. Essa variação da técnica foi denominada extração líquido-líquido assistida por sal (SALLE) (BYLDA *et al.*, 2014).

Com o objetivo de reduzir o gasto de solventes orgânicos, várias miniaturizações da ELL foram desenvolvidas nas últimas décadas. Na microextração em gota suspensa (SDME), uma microsseringa com uma gota (aproximadamente 50 µL) do solvente orgânico extrator, imiscível em água, suspensa na ponta da agulha, é imersa na solução amostra, que é mantida sob agitação magnética. Os analitos apolares, com elevados coeficientes de partição, são extraídos com alta eficiência. Porém, a técnica requer o uso de volumes significativos de amostra (1 – 5 mL) e não é tão robusta, já que pode ocorrer perda de solvente durante a extração. Além disso, um pré-tratamento se faz necessário no caso de amostras muito viscosas ou contendo material particulado, já que este pode colidir com a microgota (OLIVEIRA *et al.*, 2008; HANSEN; ØIESTAD; PEDERSEN-BJERGAARD, 2020).

A microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) emprega uma membrana capilar porosa e hidrofóbica, denominada fibra oca. Os poros da fibra oca são impregnados com o solvente orgânico extrator e o seu lúmen é preenchido com uma fase aceptora, que não entra em contato direto com a fase doadora (solução amostra). O baixo custo da fibra faz com que não seja necessário reutilizá-la, evitando-se, assim, efeito residual (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Essa técnica pode ser usada em duas ou três fases, de acordo com as características do analito a ser extraído. No sistema de duas fases, o analito é extraído da amostra (fase doadora) através do solvente orgânico impregnado nos poros da fibra para o mesmo solvente contido no lúmen da fibra (fase aceptora). Nesse caso, é necessário que o analito seja, no mínimo, moderadamente hidrofóbico para que a recuperação seja razoável. No sistema de três fases, o lúmen da fibra é preenchido com uma fase aceptora aquosa, que pode ter o pH ajustado de forma a favorecer a extração de substâncias ionizáveis da amostra (OLIVEIRA *et al.*, 2008; HANSEN; ØIESTAD; PEDERSEN-BJERGAARD, 2020).

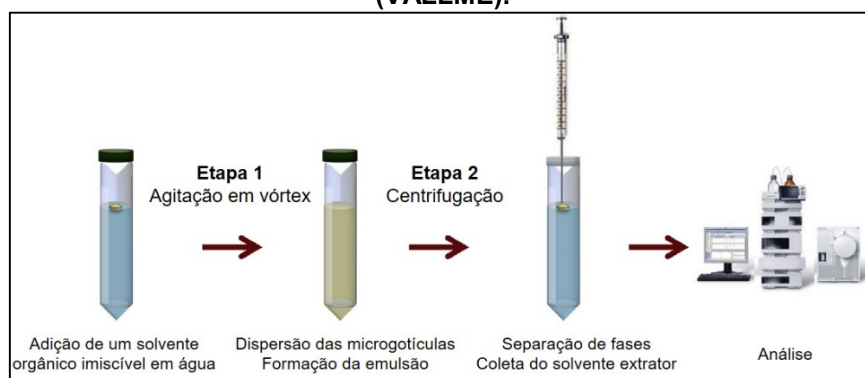
Rezaee e colaboradores (2006) descreveram, pela primeira vez, a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME). A técnica é baseada na adição, por meio de uma

rápida injeção, de uma mistura contendo um solvente extrator, insolúvel em água, e um solvente dispersante, solúvel em água, à amostra aquosa. Como resultado, observa-se uma solução turva, formada pela dispersão de microgotículas do solvente extrator na fase aquosa. Inicialmente desenvolvida para a determinação de analitos em amostras de água, a DLLME possui aplicações em amostras biológicas, como plasma (AHMED; ATIA; ALI, 2017; FARAJZADEH; ABBASPOUR, 2018; FERNÁNDEZ *et al.*, 2015) e urina (GHAMBARIAN *et al.*, 2016).

Variações da DLLME no que diz respeito ao modo de dispersão do solvente orgânico extrator surgiram nos últimos anos. Na técnica original, a dispersão das microgotículas do solvente extrator era causada pela adição de um solvente dispersante e foi, então, denominada DLLME. Com o passar do tempo, outras técnicas para a dispersão do solvente extrator foram descritas, como a agitação em vórtex (VA-DLLME), também conhecida como microextração líquido-líquido assistida por vórtex (VALLME), a imersão em banho de ultrassom (UA-DLLME), a injeção de ar (AA-DLLME), entre outras (KOKOSA, 2020). Métodos desenvolvidos a partir da combinação dos mecanismos de dispersão também foram descritos.

A VA-DLLME ou VALLME emprega apenas a agitação em vórtex para a dispersão das microgotículas do solvente orgânico extrator. Para a otimização de métodos de extração por VALLME, parâmetros como o tipo e o volume de solvente extrator, o volume de amostra, a adição de tensoativos, a concentração de tensoativos, o pH, a força iônica, a velocidade de agitação e o tempo de agitação devem ser avaliados. A **Figura 1** apresenta uma representação esquemática da técnica.

Figura 1 – Representação esquemática da microextração líquido-líquido assistida por vórtex (VALLME).



Fonte: adaptado de PSILLAKIS, 2019.

3.3.1.2 Técnicas de preparo de amostra baseadas em sorventes

A extração em fase sólida (EFS) é uma técnica para a extração e concentração de analitos de uma amostra gasosa, fluida ou líquida na qual a amostra flui por uma fase sólida, onde os analitos de interesse são retidos e de onde são posteriormente desorvidos utilizando-se um solvente (POOLE; POOLE, 2012; ANDRADE-EIROA *et al.*, 2016).

O uso de fases sólidas para a extração de fármacos de matrizes biológicas remonta a 1923 com o uso de permutita e, subsequentemente, de ácido silícico para extrair adrenalina. Na década de 1950, pesquisadores usaram colunas de alumina para a extração de adrenalina e noradrenalina de amostras de sangue. Após décadas, mais especificamente no final da década de 1970, empresas fabricantes de colunas cromatográficas, como a Waters Associates e a Analytichem International, foram as primeiras a desenvolver o conceito do uso de sorventes, similares aos usados como fase estacionária em colunas de CLAE, empacotados em pequenas colunas, para isolar fármacos e outras substâncias químicas de interferentes presentes em amostras. Essas colunas foram chamadas de colunas de extração em fase sólida (KRISHNAN; IBRAHAM, 1994).

Desde então, surgiram cartuchos comerciais de EFS empacotados com diferentes tipos de materiais, desde sorventes para a extração de analitos apolares em amostras aquosas, como C₁₈, C₈ e C₄, até sorventes de troca iônica, como SCX (sorvente de troca catiônica) e NH₂. Novos materiais, como os meios de acesso restrito e os polímeros de impressão molecular (MIP), têm sido reportados na literatura (LI; RIVORY; CLARKE, 2006; JALILI; BARKHORDARI; GHIASVAND, 2020).

Na EFS, os cartuchos empacotados com sorventes a base de sílica precisam ser condicionados antes da realização da extração. Os cartuchos poliméricos não apresentam esse requisito. Após o condicionamento, a amostra é percolada pelo cartucho. Para que a eluição ocorra em um tempo adequado, é necessário usar vácuo ou pressão positiva. Nessa etapa, os analitos de interesse, assim como alguns interferentes da matriz biológica, vão interagir com o sorvente e ficar retidos. É

importante ressaltar que esta etapa é crítica para a obtenção de recuperações adequadas, já que quanto maior a velocidade com que a amostra passar pelo cartucho, menos tempo haverá para que ocorram interações entre os analitos de interesse e o sorvente. Em seguida, é realizada uma etapa de limpeza do cartucho pela percolação de um solvente pelo qual os interferentes, normalmente mais polares, tenham afinidade, mas que idealmente não seja capaz de remover os analitos de interesse. Por fim, os analitos de interesse são eluídos do cartucho pela aplicação de um solvente capaz de dessorvê-los (SANSON *et al.*, 2014).

Além dos cartuchos tradicionais, a EFS também pode ser realizada utilizando-se discos formados por partículas do sorvente. Originalmente, os discos foram desenvolvidos com a finalidade de aumentar a velocidade de processamento para elevados volumes de amostra e minimizar o entupimento causado por partículas e componentes da matriz. Porém, os discos são significativamente mais caros e menos sorventes diferentes estão disponíveis (POOLE; POOLE, 2012).

Novas necessidades das indústrias, como a diminuição do tamanho das amostras e o aumento do número de amostras a serem analisadas, fez com que alternativas que facilitassem a automação da técnica se tornassem primordiais. Placas de 96 poços e ponteiras para micropipetas contendo diferentes sorventes foram algumas das alternativas encontradas para diminuir o tempo dispendido para o preparo de amostras, além de requerer menores volumes de amostra (POOLE; POOLE, 2012). Outras miniaturizações da EFS serão discutidas a seguir.

A microextração em fase sólida (SPME) é uma microtécnica que emprega um dispositivo que consiste num bastão de fibra ótica, de sílica fundida, com 10 mm de uma das extremidades recobertos com um polímero extrator. A extração ocorre mergulhando-se a extremidade recoberta com o sorvente na amostra ou no seu "headspace", quando o objetivo é extrair substâncias voláteis e semi-voláteis. A fibra permanece em contato com a amostra, sob agitação constante, até que se atinja o equilíbrio de partição. Após a extração, a fibra é retirada da amostra e os analitos são dessorvidos utilizando-se solvente ou elevadas temperaturas no injetor do cromatógrafo gasoso, no caso de analitos termoestáveis. O dispositivo também pode

ser acoplado ao sistema de CLAE para a realização da dessorção dos analitos, porém requer uma interface específica (VALENTE; AUGUSTO, 2000; FERNANDES *et al.*, 2007; JALILI; BARKHORDARI; GHIASVAND, 2020).

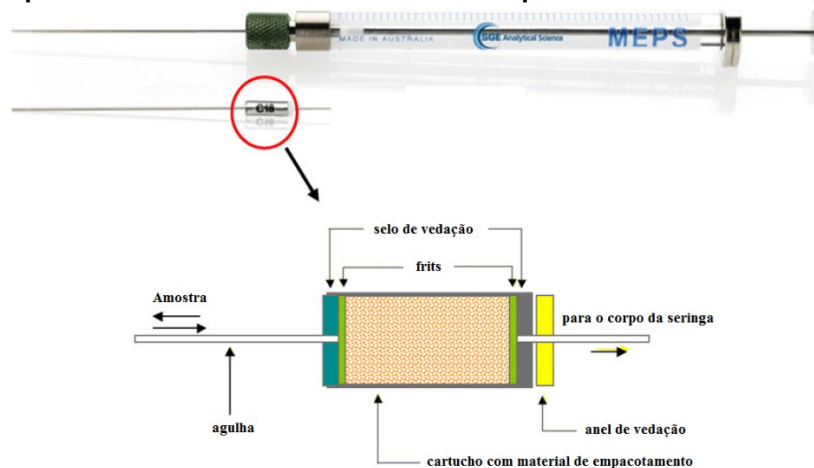
Uma nova abordagem foi desenvolvida para automatizar a SPME e foi denominada SPME “no tubo”. Nessa técnica, tanto a etapa de extração quanto a etapa de dessorção são automatizadas no sistema de CLAE. O dispositivo consiste num tubo capilar aberto de sílica fundida, com a superfície interna revestida com o sorvente quimicamente ligado. Por permitir a automação do processo de extração, a SPME “em tubo” é mais precisa e requer menos tempo de análise, além de diminuir a exposição do analista à amostra biológica. O sistema SPME “no tubo”-CLAE pode ser montado fixando-se uma coluna capilar entre a agulha e a alça de amostragem do injetor. O injetor automático aspira a amostra, que segue em direção ao capilar contendo o sorvente a uma velocidade linear constante. O volume de amostra aspirado é dispensado no frasco e em seguida aspirado novamente. São realizados ciclos de aspiração e ejeção, executados automaticamente pelo injetor. No capilar, ocorre o processo de partição do analito com o sorvente até o equilíbrio ser atingido. Após a etapa de extração, os analitos são dessorvidos pela fase móvel ou pela adição de um solvente orgânico e separados pela coluna cromatográfica. Para evitar o entupimento da agulha do injetor ou do capilar, a remoção de proteínas tem sido realizada antes da SPME “em tubo” (QUEIROZ; LANÇAS, 2005; MOLINER-MARTINEZ *et al.*, 2015).

A extração sortiva em barra de agitação (SBSE) é outra miniaturização da EFS. Para a realização da extração, uma barra magnética é revestida com polidimetilsiloxano e colocada em contato com a amostra, sob constante agitação. A barra empregada na SBSE possui maior área superficial e, conseqüentemente, maior capacidade de sorção do que a fibra da SPME. Após a extração, a dessorção pode ocorrer, no caso de analitos voláteis, por meio de elevadas temperaturas, no injetor do CG, ou empregando-se solventes, no caso de analitos termicamente instáveis ou não voláteis. As barras podem ser reutilizadas. As desvantagens da técnica estão relacionadas ao elevado tempo de equilíbrio necessário para a extração dos analitos, ao volume de amostra necessário para a realização da técnica, o que algumas vezes inviabiliza a sua utilização em algumas amostras biológicas, e à ausência de diferentes materiais

solventes, o que limita a seletividade e especificidade da técnica (QUEIROZ; SOUZA, 2018; CHAVES; QUEIROZ, 2008; FERNANDES *et al.*, 2006; FERNANDES *et al.*, 2008).

A microextração em solvente empacotado (MEPS) é uma miniaturização dos dispositivos de extração em fase sólida convencional, na qual há a redução dos volumes de amostra e solventes da escala de mililitros para microlitros. O suporte sólido contendo o solvente é inserido em uma agulha fixa no corpo da seringa (**Figura 2**). Dessa forma, quando a amostra passa pelo suporte sólido, o analito interage com o solvente e é então extraído da amostra. Posteriormente, utiliza-se solvente adequado para eluir o analito do suporte (ABDEL-REHIM, 2004; ABDEL-REHIM, 2010).

Figura 2 – Dispositivo utilizado em microextração por solvente empacotado (MEPS). Em destaque o cartucho contendo o solvente empacotado inserido na agulha.



Fonte: ABDEL-REHIM, 2010; VIANA, 2014.

Antes da extração, a amostra deve ser diluída e o cartucho deve ser condicionado. Para a extração, a amostra é aspirada e ejetada da seringa repetidas vezes, até que se atinja o equilíbrio de partição. Em seguida, é realizada uma lavagem do cartucho com o objetivo de eliminar interferentes da matriz biológica. Por fim, os analitos são desorvidos com a fase móvel ou um solvente orgânico. Antes de ser reutilizado, o cartucho deve ser lavado para a remoção de interferentes da matriz e para se evitar efeito residual (ABDEL-REHIM, 2011).

O dispositivo utilizado para MEPS pode ser acoplado à cromatografia líquida ou gasosa e pode ser reutilizado, ao passo que os cartuchos de extração em fase sólida podem ser utilizados apenas uma vez. Além disso, diversas fases estacionárias estão disponíveis, entre elas C₂, C₈, C₁₈, sílica, HILIC, entre outras, o que permite a análise de uma extensa gama de analitos (apolares, polares, neutros e iônicos) (ABDEL-REHIM, 2010).

A MEPS tem sido utilizada para a análise de diferentes analitos em plasma. Viana e colaboradores (2014) empregaram MEPS para a determinação de antidiabéticos orais em plasma por cromatografia líquida de alta eficiência. A MEPS foi empregada também na determinação de fármacos antiepilépticos em plasma e urina (RANI; MALIK; SINGH, 2012). Diversos outros trabalhos foram publicados empregando-se esta técnica, incluindo o desenvolvimento de novos sorventes. Como exemplo, têm-se o desenvolvimento de um polímero de impressão molecular para a determinação de dinotefurano (SILVA; BORGES; NASCIMENTO JÚNIOR, 2018).

3.3.2 Cromatografia líquida e detecção

A análise de fármacos e metabólitos presentes nas matrizes biológicas requer uma separação dos constituintes antes da detecção, para melhorar a detectabilidade, a precisão e a exatidão do método. Apesar do uso de técnicas de preparo de amostras, seletivas ou não, para a análise de fármacos nesse tipo de matriz, a separação cromatográfica é primordial para garantir a especificidade da detecção (KELLOGG, 2017).

A cromatografia líquida e a cromatografia gasosa são empregadas para a determinação de fármacos em amostras biológicas. Porém, a maior parte dos trabalhos disponíveis na literatura empregaram a cromatografia líquida para a separação dos analitos e substâncias interferentes antes da detecção. Isso se deve ao fato de a cromatografia gasosa requerer analitos voláteis e estáveis termicamente, o que não é o caso de muitos fármacos. Por isso, essa revisão irá abordar apenas a cromatografia líquida.

A cromatografia líquida é uma das muitas técnicas de separação cromatográfica para a análise de misturas de substâncias químicas. Serão abordadas nesta revisão a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE).

A CLAE (do inglês HPLC, *high performance liquid chromatography*) é a técnica mais amplamente utilizada para a separação de misturas de substâncias químicas. A técnica é tão abrangente por se aplicar a praticamente qualquer tipo de amostra, apresentar alta precisão, uma ampla variedade de equipamentos e colunas cromatográficas disponíveis comercialmente e por ser amplamente empregada em laboratórios analíticos (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

Várias colunas cromatográficas empacotadas com diferentes fases estacionárias estão atualmente disponíveis. Diferentes tipos de partícula, como as totalmente porosas, as micropelículas, as superficialmente porosas ou de núcleo fundido e as de perfusão podem ser encontradas. Essas partículas normalmente têm diâmetro entre 2 µm e 5 µm. As partículas mais usadas em colunas de CLAE são as de sílica, que podem ser ligadas a diferentes tipos de ligantes, como cadeias carbônicas (C₈ e C₁₈), grupos fenil, ciano, amino, entre outros (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

A separação cromatográfica ocorre em função das interações diferenciais dos analitos com a fase estacionária e com a fase móvel. Na cromatografia líquida de fase reversa (CL-FR), a mais empregada para a análise de amostras biológicas, a fase móvel é mais polar do que a fase estacionária, devido aos tipos de ligantes usados nas partículas de sílica. O grau de retenção dos analitos na fase estacionária depende de um equilíbrio de partição estabelecido entre a fase estacionária e a fase móvel. Quanto mais apolar um analito, mais ele será retido pela coluna. Porém, a partição não é o único mecanismo de separação na CL-FR. A adsorção, causada por interações entre grupos polares dos analitos e grupos silanóis residuais presentes na superfície das partículas de sílica, também ajudam a explicar a retenção dos analitos na fase estacionária, principalmente quando estes possuem característica básica. Essas interações secundárias com os grupos silanóis residuais também explicam um fenômeno observado nos cromatogramas, a cauda. Analitos, principalmente os de

caráter básico, apresentam cauda ou assimetria na parte posterior do pico cromatográfico, o que muitas vezes diminui a resolução entre dois picos, além de dificultar a integração, trazendo prejuízos à quantificação (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

Sílicas com superfícies de diferentes naturezas químicas, mais ou menos propensas à formação de cauda, estão disponíveis. Partículas de sílica com grupos silanóis livres, silanóis geminais, silanóis associados e com diferentes níveis de contaminação por metais podem ser encontradas. Silanóis livres são os mais ácidos e estão associados à baixa eficiência da coluna, caracterizada por baixos valores de número de pratos (N), e a um aumento na cauda de picos de analitos básicos (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

Além das colunas particuladas, colunas monolíticas também podem ser empregadas na CLAE. Elas são moldadas como um cilindro rígido e produzidas por polimerização, a partir de sílica ou polímeros. Colunas monolíticas possibilitam o uso de maiores vazões de fase móvel sem um aumento muito grande da pressão do sistema. Porém, elas estão limitadas a apenas algumas dimensões e fases estacionárias, além de apresentar uma tendência de formação de cauda mesmo para analitos neutros (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

Uma das limitações da CL-FR é a baixa retenção de analitos polares ou iônicos. Essa limitação poderia ser solucionada pelo uso da cromatografia líquida de fase normal (CL-FN), na qual a fase estacionária é mais polar do que a fase móvel. Entretanto, a solubilidade de analitos polares nas fases móveis empregadas na CL-FN é limitada, além de dificultar a detecção empregando espectrometria de massas (SILVA; BOTTOLI; COLLINS, 2016; LANÇAS, 2009).

Um novo modo de separação, a cromatografia por interações hidrofílicas (HILIC), foi introduzido na década de 1990. Na HILIC, é empregada uma fase estacionária mais polar do que na CL-FR e fase móvel com pouca concentração de água ou tampão, sendo composta, normalmente, por pelo menos 70% de solvente orgânico, na maioria das vezes acetonitrila. Na HILIC, fases estacionárias mais polares, como ciano, diol,

amida, amino, entre outras, são empregadas. Uma camada de água fica imobilizada ou adsorvida na superfície da fase estacionária, retendo analitos polares por interações hidrofílicas, estabelecendo-se um equilíbrio de partição. Acredita-se também que podem ocorrer interações do tipo ligação de hidrogênio entre os grupos funcionais polares da fase estacionária e os dos analitos e do tipo eletrostática entre a fase estacionária e grupos ionizados dos analitos. Dessa forma, nesse modo de separação, os analitos polares são os mais retidos, diferentemente da CL-FR (SILVA; BOTTOLI; COLLINS, 2016; KARTSOVA; BESSONOVA; SOMOVA, 2019; JANDERA; JANÁS, 2017).

A HILIC apresenta algumas vantagens em relação à CL-FR, como a diminuição da pressão do sistema, maior retenção e eficiência de separação de analitos polares sem a necessidade de utilização de reagentes de par iônico, aumento da vida útil da fase estacionária pelo uso de baixas concentrações de água, melhor compatibilidade com técnicas de preparo de amostra que utilizam altas concentrações de solvente orgânico, como a EFS ou a ELL. Além disso, há um aumento da detectabilidade dos analitos no acoplamento com a espectrometria de massas, pelo aumento da eficiência da ionização (SILVA; BOTTOLI; COLLINS, 2016; BECCARIA; CABOOTER, 2020). Colunas para cromatografia líquida de ultra eficiência empacotadas com fases estacionárias para HILIC também estão disponíveis, aumentando as possibilidades de aplicações.

A CLUE (do inglês UHPLC, *ultra high performance liquid chromatography*) emprega os mesmos princípios da CLAE, porém com o uso de partículas de fase estacionária inferiores a 2 μm , o que aumenta de forma expressiva a eficiência de separação da técnica. Com a diminuição do tamanho de partícula há, entretanto, um aumento expressivo da pressão do sistema. Assim, o sistema de CLUE é fabricado para resistir a pressões muito mais elevadas (de até 1200 bar) do que as observadas em CLAE (até 600 bar). Para a CLUE, as colunas cromatográficas são produzidas com partículas de sílica mais resistentes (GUMUSTAS *et al.*, 2013).

Como a eficiência de separação é elevada significativamente com o uso de partículas sub-2 μm , picos muito finos são obtidos com a CLUE. Para que se alcance ganhos

reais de eficiência e detectabilidade a partir da diminuição do tamanho das partículas da fase estacionária, importantes medidas foram tomadas para diminuir o alargamento de banda no sistema cromatográfico. Colunas e tubulações com menores diâmetros internos, o uso de menores volumes de injeção, o uso de conectores com volume zero, detectores com células de fluxo com volumes muito baixos e mesmo caminho óptico e elevadas frequências de aquisição foram alternativas encontradas pelos fabricantes para diminuir o alargamento de banda e aumentar a eficiência e a sensibilidade da CLUE (GUMUSTAS *et al.*, 2013; FEKETE *et al.*, 2014).

Diferentes detectores estão disponíveis para serem usados na CLAE e na CLUE, como o ultravioleta, o de fluorescência, o eletroquímico, o de índice de refração, o de aerossol carregado, entre outros. Além disso, é possível acoplar o sistema cromatográfico à espectrometria de massas (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010). A revisão irá focar nos detectores UV e de fluorescência e no acoplamento entre a cromatografia líquida e a espectrometria de massas por serem os mais empregados para a análise de amostras biológicas.

Os detectores fotométricos, baseados na absorção de luz ultravioleta e visível, são sensíveis a vários analitos, desde que estes absorvam luz na faixa de comprimento de onda de 190 a 600 nm. Para isso, as moléculas devem ter em sua estrutura grupos cromóforos, caracterizados por ligações duplas conjugadas. A concentração do analito na célula de fluxo é regida pela lei de Lambert e Beer, que relaciona a intensidade da absorção de luz à absorvidade molar da substância, ao caminho óptico da célula de fluxo e à concentração do analito (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

Existem diferentes tipos de detectores fotométricos. Atualmente, os mais utilizados são aqueles com comprimento de onda variável, nos quais é possível selecionar um ou mais comprimentos de onda no UV ou no visível, e o de arranjo de diodos (DAD), que possibilita a obtenção dos espectros de absorção dos analitos no UV e visível, cromatogramas em diferentes comprimentos de onda e a realização de testes de pureza de pico. Os detectores DAD têm sido preferidos para a análise de fármacos (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

Os detectores de fluorescência são muito sensíveis e seletivos, já que apenas analitos capazes de emitir fluorescência fornecem algum sinal. Nos detectores de fluorescência, os analitos são excitados por um feixe de luz na região do UV e emitem luz com comprimento de onda maior que a luz incidente. Muitas moléculas absorvem luz, mas poucas apresentam fluorescência intrínseca. A emissão de fluorescência está relacionada a algumas características químicas, como a presença de ciclos ou anéis aromáticos policíclicos, principalmente quando grupos ativadores ($-\text{NH}_2$, $-\text{NR}_2$, $-\text{OH}$ e $-\text{OR}$) estão substituídos nas posições *orto* e/ou *para*. Por outro lado, grupos desativadores ($-\text{NO}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{COOR}$, $-\text{CHO}$, $-\text{COR}$) substituídos na posição *meta* reduzem a emissão de fluorescência. Para analitos que não apresentam fluorescência nativa, reações de derivatização pré e pós-coluna são possíveis (LIPKA; VACCHER, 2015).

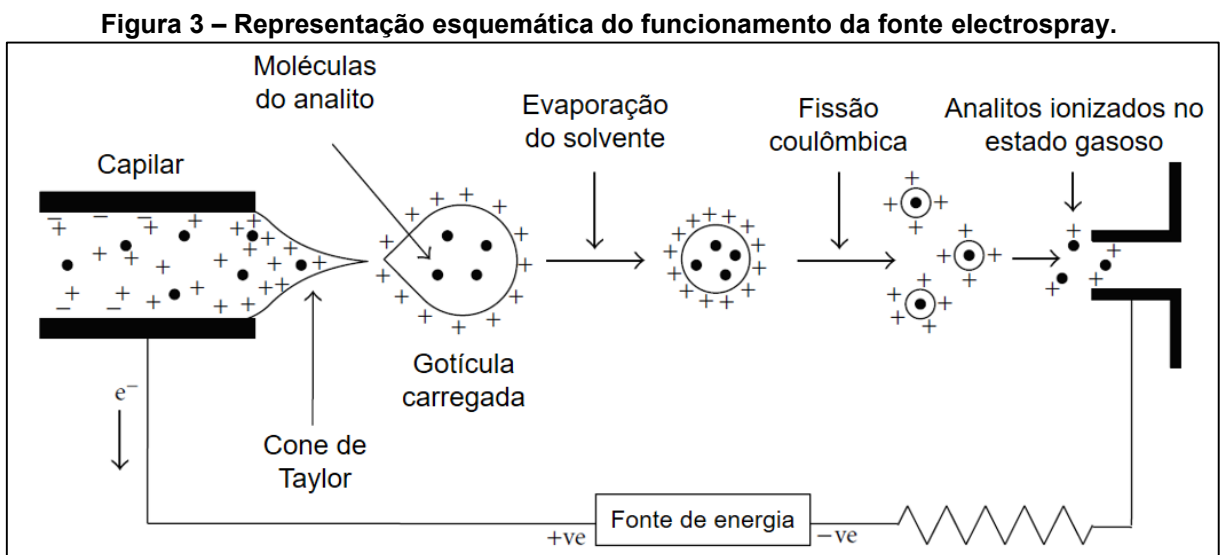
Como os detectores fotométricos apresentam limitações de seletividade e detectabilidade e os detectores de fluorescência não são tão abrangentes, o acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas tem sido preferido para a análise de fármacos em amostras biológicas.

O acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas (LC-MS) reúne as vantagens de ambas as técnicas. O poder de separação da cromatografia é aliado à alta seletividade e detectabilidade da espectrometria de massas. Para a análise de fármacos em amostras biológicas, normalmente se emprega a espectrometria de massas sequencial, quando se usam dois ou mais analisadores de massas em série, aumentando significativamente a seletividade da análise (BECCARIA; CABOOTER, 2020).

Basicamente, o espectrômetro de massas é um equipamento que produz íons e os separa de acordo com as suas razões massa/carga (m/z). Ele consiste em três grandes partes: fonte de ionização, analisador de massas e detector. No acoplamento com a cromatografia líquida, três fontes de ionização são normalmente empregadas, a electrospray (do inglês ESI, electrospray ionization), a ionização química à pressão atmosférica (do inglês APCI, atmospheric pressure chemical ionization) e a

fotoionização à pressão atmosférica (do inglês APPI, atmospheric pressure photo-ionization). A fonte ESI é a mais amplamente utilizada, seguida da APCI e da APPI (KELLOGG, 2017; BECCARIA; CABOOTER, 2020).

A ionização por electrospray é suave, ou seja, na fonte ocorre pouca ou nenhuma fragmentação do analito. A ionização é produzida pela aplicação de um forte campo elétrico, sob pressão atmosférica, a um líquido passando por um tubo capilar com baixa vazão, formando um fino spray. O campo elétrico induz um acúmulo de cargas na superfície do líquido localizado no final do capilar, formando gotículas altamente carregadas. Com a evaporação do solvente, as gotículas vão diminuindo e se subdividindo, até que a repulsão eletrostática dentro das microgotículas é tão grande que ocorre a fissão e a liberação dos íons precursores dos analitos ($[M+H]^+$, no modo positivo, e $[M-H]^-$, no modo negativo) em fase gasosa. Uma representação esquemática do funcionamento da fonte electrospray é apresentada na **Figura 3**. Dependendo das características dos analitos, os aditivos podem ser usados para deslocar o equilíbrio no sentido da formação de cátions (modo positivo) ou ânions (modo negativo) (HOFFMANN; STROOBANT, 2007).



Fonte: adaptado de BANERJEE; MAZUMDAR, 2012.

Para que o acoplamento entre a cromatografia líquida e a espectrometria de massas seja possível, a fase móvel deve ser evaporada, já que apenas íons no estado gasoso conseguem adentrar o analisador de massas. Grande parte das fontes de ionização electrospray disponíveis no mercado não são capazes de evaporar grandes fluxos de

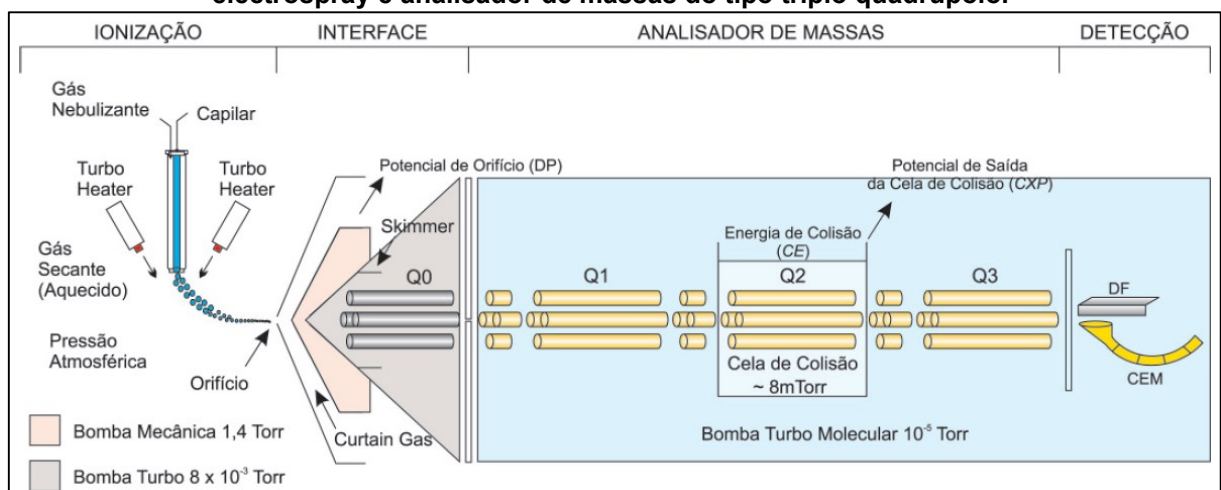
fase móvel. Uma alternativa para solucionar esse problema foi a utilização de divisores de fluxo (*splits*), que fazem com que apenas uma fração do eluato proveniente da cromatografia entre na fonte de ionização. Mais recentemente, fontes electrospray capazes de evaporar volumes maiores de fase móvel têm sido disponibilizadas no mercado (HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

Após a obtenção dos analitos ionizados e no estado gasoso, estes seguem em direção ao analisador de massas, onde serão separados em função da sua razão m/z . Diferentemente das fontes de ionização à pressão atmosférica, os analisadores de massas operam sob alto vácuo, para evitar a colisão entre moléculas. Vários analisadores de massa estão disponíveis no mercado, cada um tendo suas vantagens e limitações. Os analisadores mais usados para a determinação de fármacos em amostras biológicas são o quadrupolo, a armadilha de íons (*ion trap*) e o tempo de voo (TOF, time of flight) (KELLOGG, 2017; VESSECCHI *et al.*, 2011; HOPFGARTNER; BOURGOGNE, 2003).

Analisadores do tipo quadrupolo consistem em quatro barras cilíndricas dispostas paralelamente, de forma que os seus centros formam os cantos de um quadrado. Uma radiofrequência (RF) e uma corrente direta, positiva ou negativa, são aplicadas nas barras, de forma que os íons são acelerados através das barras em direção ao quadrupolo seguinte ou ao detector. Apenas íons de uma exata razão m/z podem passar através do quadrupolo em uma dada RF, de forma que se pode seleccionar apenas um íon com uma razão m/z específica. Por exemplo, um íon com carga positiva entrando no espaço entre as barras será atraído em direção a uma barra negativa. Se o potencial da barra mudar de sinal antes dele colidir com ela, o íon mudará de direção, pois sofrerá repulsão eletrostática. Da mesma forma, o sinal de uma barra paralela pode ser alterado para que o íon vá em direção a ela e, em seguida, alterado novamente, de forma que ele sofra repulsão. As alterações de RF fazem com que o íon mantenha a trajetória. Quando a RF é variada dentro de uma faixa pré-determinada, íons dentro de uma faixa mais ampla de razão m/z são acelerados através do quadrupolo, possibilitando a varredura de íons com razão m/z dentro da faixa pré-estabelecida pelo analista (KELLOGG, 2017; VESSECCHI *et al.*, 2011; HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

O analisador do tipo triplo quadrupolo (TQD) consiste no acoplamento de três quadrupolos em série. Um gás de colisão, que pode ser argônio ou nitrogênio, pode ser introduzido no quadrupolo central ou célula de colisão (q2) em uma pressão suficiente para causar uma ou várias colisões com um íon que adentra o q2, causando sua fragmentação. O primeiro e o terceiro quadrupolo (Q1 e Q3) funcionam basicamente como filtros. Nesse tipo de analisador, é possível realizar diferentes tipos de varredura, sendo a mais importante para a quantificação de analitos em matrizes biológicas a de monitoramento de reações múltiplas (MRM, multiple reaction monitoring). No modo MRM, apenas um ou mais íons precursores com razões m/z pré-definidas passam através do Q1 e chegam ao q2, onde sofrem fragmentação. Em seguida, apenas íons produto de razões m/z pré-definidas passam através do Q3 e vão em direção ao detector. Por isso, analisadores do tipo TQD são considerados extremamente seletivos, já que cada analito ou íon precursor tem um padrão de fragmentação (KELLOGG, 2017; HOFFMANN; STROOBANT, 2007). Uma representação esquemática de um espectrômetro de massas do tipo TQD é apresentada na **Figura 4**.

Figura 4 – Representação esquemática de um espectrômetro de massas com fonte electrospray e analisador de massas do tipo triplo quadrupolo.



Fonte: MARTINS JÚNIOR et al., 2006.

O analisador do tipo armadilha de íons (*ion trap*) utiliza um campo elétrico oscilante para armazenar os íons em duas ou três dimensões, o que faz com que sejam classificados como 2D ou 3D. Nos analisadores 2D, mais modernos, os íons são confinados na dimensão axial, ou seja, no próprio eixo, pela aplicação de um potencial

elétrico estático. Dessa forma, íons com razões m/z pré-definidas são armazenados no analisador e ejetados em direção ao detector. Sistemas formados pelo acoplamento de analisadores do tipo quadrupolo e de armadilha de íons estão disponíveis. Em sistemas desse tipo, íons precursores com razões m/z pré-definidas são selecionados no quadrupolo e vão em direção à célula de colisão. Após a fragmentação dos íons precursores, os íons produto vão em direção ao analisador do tipo armadilha de íons. Nele, íons com razões m/z pré-estabelecidas são confinados e armazenados até que o analisador esteja cheio e, em seguida, são ejetados para o detector. Isso aumenta muito a detectabilidade. Analisadores desse tipo também podem funcionar como TQD (HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

No analisador do tipo tempo de voo (TOF, time of flight), os íons são acelerados em um tubo linear isento de campo elétrico. O tempo que um íon demora para atingir o detector é dependente da sua razão m/z . Quanto maior a razão m/z de um íon, mais tempo ele vai demorar para atingir o detector. Analisadores desse tipo também podem ser usados acoplados em série a outros analisadores de massas, como o quadrupolo, a armadilha de íons e o próprio TOF (KELLOGG, 2017).

Todos os analisadores de massas possuem vantagens e limitações. A escolha do analisador de massas a ser empregado depende dos objetivos da análise, da amostra analisada, das características dos analitos, da exatidão de massas requerida, da resolução necessária, entre outros (HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

Por fim, os íons precursores ou íons produto, dependendo do objetivo, saem do analisador de massas e atingem o detector para gerar um sinal. Existem vários tipos de detectores, mas os mais empregados atualmente são os multiplicadores de elétrons. Nesse tipo de detector, após saírem do analisador de massas, os íons são acelerados a uma alta velocidade e atingem o dínodo de conversão, causando a emissão de várias partículas secundárias, que podem ser íons, elétrons e nêutrons. Essas partículas são então convertidas em elétrons. Os elétrons são amplificados por um efeito cascata no multiplicador de elétrons para produzir uma corrente elétrica e gerar um sinal (HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

A exatidão nas análises realizadas por LC-MS podem ser comprometidas por diferentes causas, como a fragmentação dos analitos na fonte, a deposição de íons na fonte ou *charge*, o que reduz gradualmente o sinal, a formação de adutos e a mais importante, o efeito matriz, causado pela potencial variabilidade entre diferentes fontes da matriz biológica analisada, o que pode comprometer a confiabilidade do método (DE NICOLÒ; CANTÙ; D'AVOLIO, 2017).

O efeito matriz é um fenômeno que ocorre quando há a coeluição de substâncias endógenas não detectadas com os analitos de interesse, causando uma diminuição do sinal (supressão iônica) ou um aumento do sinal (indução iônica). O mecanismo ainda não é bem compreendido, mas acredita-se que é causado pela competição entre os íons dos interferentes endógenos e os analitos pela superfície das gotículas, antes de serem transferidos para a fase gasosa. O efeito matriz é observado principalmente com o uso da fonte de ionização electrospray, embora também haja relatos com a fonte APCI (TAYLOR, 2005).

Uma das principais medidas para se reduzir o efeito matriz é a preparação de curvas matrizadas, que são curvas analíticas preparadas na matriz biológica, e de amostras de controle de qualidade. Porém, a eficácia dessa abordagem é limitada pela variabilidade da concentração de interferentes endógenos em diferentes fontes da matriz biológica. Por isso, o método de preparo de amostra deve ser otimizado, de forma a remover potenciais interferentes, assim como a separação cromatográfica, para evitar a coeluição de substâncias interferentes juntamente com os analitos de interesse. Porém, algumas vezes não é possível eliminar o efeito matriz apenas com essas medidas (DE NICOLÒ; CANTÙ; D'AVOLIO, 2017).

Como o parâmetro utilizado para a quantificação em LC-MS é a razão da área do analito pela área do padrão interno, a avaliação do efeito matriz usando essa variável faz mais sentido. Em alguns casos, embora haja efeito matriz, caracterizado por valores de fator de matriz normalizado (FMN) inferiores ou superiores a um, o padrão interno pode compensar a variabilidade entre as diferentes fontes da matriz biológica avaliada, fazendo com que este efeito seja constante, independente da fonte da matriz biológica (DE NICOLÒ; CANTÙ; D'AVOLIO, 2017).

3.3.3 Características físico-químicas dos fármacos

As características físico-químicas dos fármacos selecionados para o desenvolvimento dos métodos bioanalíticos, bem como suas estruturas químicas, são apresentadas na **Tabela 1** (pág. 52).

Tabela 1 – Características físico-químicas dos fármacos avaliados neste estudo.

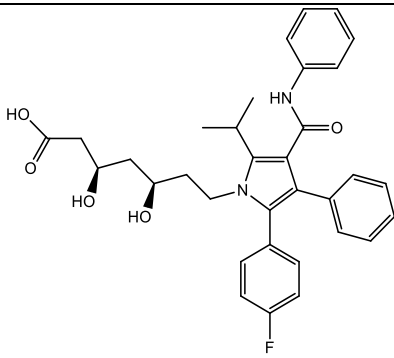
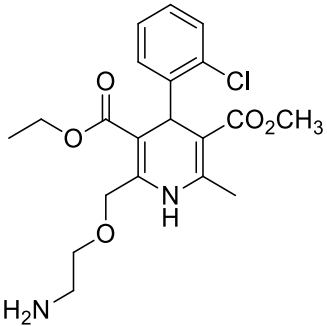
Fármaco	Classe terapêutica / farmacológica	Estrutura química	Massa molar (g mol ⁻¹)	pKa	Log P	Solubilidade
Atorvastatina cálcica	Antilipêmico / Estatina		1155,363	4,46	6,36	<ul style="list-style-type: none"> - Soluções aquosas com pH<4,0 (insolúvel) - Água destilada, tampão fosfato pH 7,4 e acetonitrila (muito pouco solúvel) - Etanol (pouco solúvel) - Metanol (facilmente solúvel)
Besilato de anlodipino	Anti-hipertensivo / Bloqueador de canal de cálcio		567,050	8,6	3,00	<ul style="list-style-type: none"> - Água (pouco solúvel) - Etanol (ligeiramente solúvel) - Metanol (facilmente solúvel)

Tabela 1 – Características físico-químicas dos fármacos avaliados neste estudo (continuação).

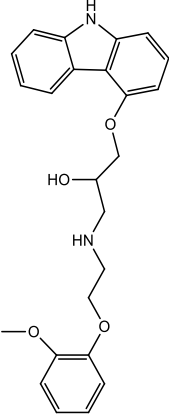
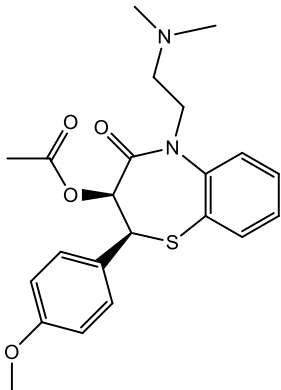
Fármaco	Classe terapêutica / farmacológica	Estrutura química	Massa molar (g mol ⁻¹)	pKa	Log P	Solubilidade
Carvedilol	Anti-hipertensivo / Antagonista β-adrenérgico		406,482	14,03 8,74	4,19	<ul style="list-style-type: none"> - Água (praticamente insolúvel) - Dimetilsulfóxido (facilmente solúvel) - Diclorometano e metanol (solúvel) - Etanol e álcool isopropílico (ligeiramente solúvel) - Éter etílico (pouco solúvel)
Cloridrato de diltiazem	Anti-hipertensivo / Bloqueador de canal de cálcio		450,978	7,7	2,79	<ul style="list-style-type: none"> - Água, clorofórmio, diclorometano, ácido fórmico e metanol (facilmente solúvel) - Álcool absoluto (ligeiramente solúvel) - Éter (praticamente insolúvel)

Tabela 1 – Características físico-químicas dos fármacos avaliados neste estudo (continuação).

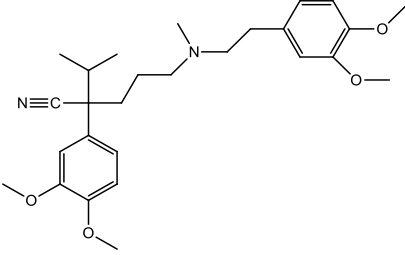
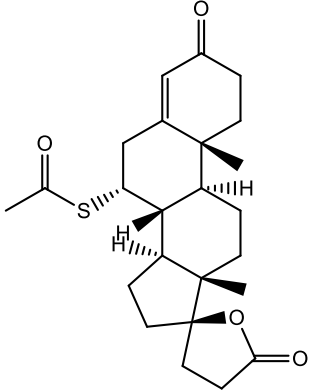
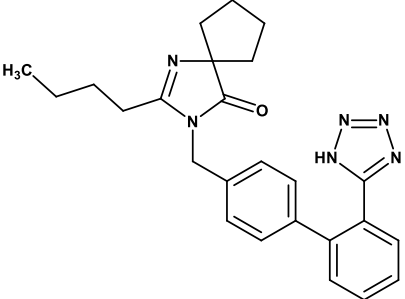
Fármaco	Classe terapêutica / farmacológica	Estrutura química	Massa molar (g mol ⁻¹)	pKa	Log P	Solubilidade
Cloridrato de verapamil	Anti-hipertensivo / Bloqueador de canal de cálcio		491,069	8,9	3,8	- Água (praticamente insolúvel) - Álcoois de cadeias pequenas, acetona, acetato de etila e clorofórmio (facilmente solúvel) - Benzeno e éter (solúvel)
Espironolactona	Anti-hipertensivo / Diurético poupador de potássio		416,576	n.a.	2,8	- Água (praticamente insolúvel) - Etanol (solúvel 1:80) - Clorofórmio (solúvel 1:3) - Éter (solúvel 1:100) - Metanol e óleos graxos (pouco solúvel)
Irbesartana	Anti-hipertensivo / Antagonista do receptor de angiotensina II		428,5	4,5	10,1	- Água (praticamente insolúvel) - Metanol (moderadamente solúvel) - Diclorometano (pouco solúvel)

Tabela 1 – Características físico-químicas dos fármacos avaliados neste estudo (continuação).

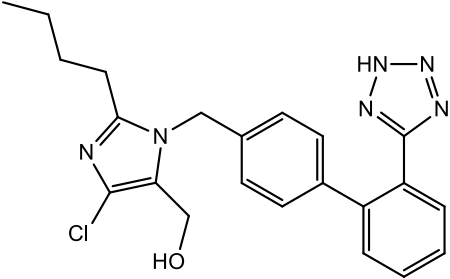
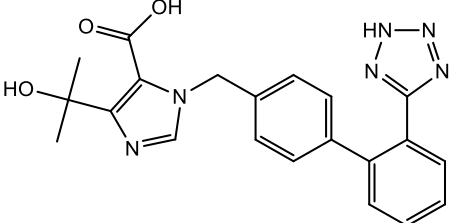
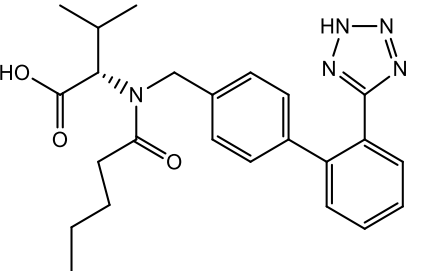
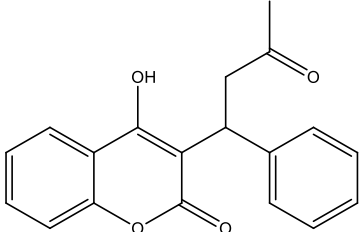
Fármaco	Classe terapêutica / farmacológica	Estrutura química	Massa molar (g mol ⁻¹)	pKa	Log P	Solubilidade
Losartana potássica	Anti-hipertensivo / Antagonista do receptor de angiotensina II		461,007	5,85 3,85	4,01	- Água (facilmente solúvel) - Álcool isopropílico (ligeiramente solúvel) - Acetonitrila (pouco solúvel) - Metanol (facilmente solúvel)
Olmesartana	Anti-hipertensivo / Antagonista do receptor de angiotensina II		446,511	0,91 5,57	5,9	- Água (praticamente insolúvel) - Metanol (ligeiramente solúvel)
Valsartana	Anti-hipertensivo / Antagonista do receptor de angiotensina II		435,528	4,37	5,8	- Etanol e metanol (solúvel) - Água (pouco solúvel) - Diclorometano (ligeiramente solúvel)

Tabela 1 – Características físico-químicas dos fármacos avaliados neste estudo (continuação).

Fármaco	Classe terapêutica / farmacológica	Estrutura química	Massa molar (g mol ⁻¹)	pKa	Log P	Solubilidade
Varfarina	Anticoagulante		308,3	4,5	3,47	<ul style="list-style-type: none"> - Soluções aquosas alcalinas (facilmente solúvel) - Acetona e dioxano (solúvel) - Álcoois (moderadamente solúvel) - Água, benzeno e cicloexano (praticamente insolúvel)

Fontes: THE UNITED, 2014; MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2011; BRITISH, 2014; BRITISH, 2019; FARMACOPEIA, 2019; O'NEIL, 2006; THE EUROPEAN, 2010; KIM *et al.*, 2016; WISHART *et al.*, 2008.

3.3.4 Características farmacocinéticas dos fármacos

As características farmacocinéticas dos fármacos selecionados para o desenvolvimento dos métodos bioanalíticos são apresentadas na **Tabela 2**. As informações relacionadas à farmacocinética dos analitos foram utilizadas para o desenvolvimento e validação dos métodos.

Tabela 2 – Características farmacocinéticas dos fármacos avaliados neste estudo.

Fármaco	Doses (mg/dia)	Concentração plasmática máxima (ng/mL)	t _{max} (h)	t _{1/2} (h)	Ligação a proteínas plasmáticas (%)
Anlodipino	5-10	18,1 ± 7,1 (10 mg/dia)	5,4-8,0	39 ± 8	93 ± 1
Atorvastatina	10-80	12,7-18,1 (20 mg)	1-2	14	≥ 98
Carvedilol	12,5-50	105,0 ± 12,0 (25 mg/dia)	1,3 ± 0,3	2,2 ± 0,3	95
Diltiazem	120-360	151,0 ± 46,0 (120 mg)	4,4 ± 1,3	4,0 ± 0,4	78 ± 3
Espironolactona	50-200	185,0 ± 51,0 (200 mg)	1,0	1,3 ± 0,3	> 90
Irbesartana	150-300	1300 ± 400 (50 mg)	1,2	13,0 ± 6,2	90
Losartana	25-100	296,0 ± 217,0 (50 mg)	1,0 ± 0,5	2,5 ± 1,0	98,7
Olmesartana	20-40	479,3 (20 mg/dia)	1,5	12-15	99
Verapamil	240-480	272,0 (240 mg/dia)	1,1	4,0 ± 1,5	90 ± 2
Valsartana	80-320	1600,0 ± 600,0 (80 mg)	2,0	9,4 ± 3,8	95
Varfarina	2,5-10	R: 900 ± 400 S: 500 ± 200 (6,1 ± 2,3 mg/dia)	< 4	37 ± 15	99 ± 1

Fontes: Brunton; Lazo; Parker, 2006; Kim *et al.*, 2016; MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2011; WISHART *et al.*, 2008.

3.3.5 Métodos bioanalíticos para a determinação de fármacos anti-hipertensivos e antilipêmicos em plasma humano

Na literatura científica, são encontrados métodos bioanalíticos para a determinação simultânea, em plasma humano, de fármacos usados no tratamento de doenças consideradas os principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, tais como a hipertensão e as dislipidemias, empregando diferentes técnicas de preparo de amostra, de separação e de detecção.

Na **Tabela 3** (pág. 59), são descritos os métodos encontrados para a determinação simultânea de quatro ou mais fármacos anti-hipertensivos e/ou antilipêmicos em plasma humano. A busca foi realizada na base de dados Web of Science utilizando-se os termos: "hypertension" or "antihypertensive" or "hyperlipidemia" or "dyslipidemia" or "hypercholesterolemia" or "antilipemic" or "lipid-lowering" or "hypocholesterolemic" or "cardiovascular" em título, resumo ou palavras-chave. Além disso, os termos "liquid chromatography" or "HPLC" or "LC" or "UPLC" or "UHPLC" foram buscados no título. O termo "plasma" foi buscado em título, resumo ou palavras-chave. Métodos bioanalíticos publicados nos últimos 10 anos, de 2011 a 2020, foram incluídos nesta revisão.

Tabela 3 – Métodos para a determinação de fármacos anti-hipertensivos e antilipêmicos em plasma humano.

Fármaco / Metabólito	Preparo de amostra	Volume de amostra (µL)	Solvente / Sorvente	Cromatografia	Deteção	LIQ (ng/mL)	Recuperação (%)	Referência
Inibidores da enzima conversora de angiotensina (8), antagonistas do receptor de angiotensina-II (6), β-bloqueadores (29), diuréticos (2), antagonistas dos canais de cálcio (12), sulfonilureias (9), biguanidas (1), metiglinidas (1), tiazolidinedionas (1), anticoagulantes (2), hipocolesterolemiantes (5), antiagregantes plaquetários (2)	PPT	100	MeOH/0,1 mol/L ZnSO ₄ (4:1, v/v)	Fenil propil (150 x 2 mm, 4 µm) Eluente A: FA 0,1% com 1 mmol/L AF em H ₂ O Eluente B: FA 0,1% com 1 mmol/L AF em MeOH	ESI-MS/MS	0,38-9,10	23,0-74,5	(GONZALEZ <i>et al.</i> , 2011)
Atorvastatina ácida, orto-hidroxi-atorvastatina, para-hidroxi-atorvastatina lactona, orto-hidroxi-atorvastatina lactona, para-hidroxi-atorvastatina lactona	PPT	50	0,1% AA em ACN	Fenil (100 x 2,1 mm, 3,5 µm) Eluente A: MeOH-H ₂ O (10:90, v/v) com 0,1% AA Eluente B: MeOH-ACN (40:60, v/v)	ESI-MS/MS	0,05	88,6-111,0	(MACWAN <i>et al.</i> , 2011)
Atorvastatina, anlodipino, ramipril, benazepril	ELL	500	Acetato de etila	C ₁₈ (50 x 4,6 mm, 5 µm) FA 0,1% em H ₂ O e ACN (15:85, v/v)	ESI-MS/MS	0,05-0,74	53,6-74,8	(PILLI <i>et al.</i> , 2011)
Carvedilol, losartana, diltiazem, furosemida, propranolol	PPT	400	ACN/1,16 M ZnSO ₄	C ₁₈ (150 x 4,6 mm, 5 µm) ACN, 2-propanol e Na ₂ HPO ₄ 15 mmol/L (pH 2,00)	UV (225 nm)	25,0-50,0	68,0-112,0	(SOLTANI; JOUYBAN, 2011)
Atorvastatina, losartana, atenolol, ácido acetilsalicílico	PPT	1000	ACN	C ₁₈ (150 x 4,6 mm, 5 µm) KH ₂ PO ₄ 0,02 M (pH 3,4) e ACN (30:70, v/v)	UV (236 nm)	25-100	88,16-92,46	(BHATIA <i>et al.</i> , 2012)
Anticoagulantes (3), inibidores da enzima conversora de angiotensina (5), antagonistas do receptor de angiotensina-II (3), β-bloqueadores (4), antagonistas dos canais de cálcio (4), diuréticos (4), estatinas (4), vasodilatores (3), outros (5)	PPT	100	ACN refrigerada	C ₁₈ (50 x 2,1 mm, 1,8 µm) FA 0,1% em H ₂ O e FA 0,1% em ACN	ESI-MS/MS	0,1-100	n.e.	(DIAS <i>et al.</i> , 2013)

Tabela 3 – Métodos para a determinação de fármacos anti-hipertensivos e antilipêmicos em plasma humano (continuação).

Fármaco / Metabólito	Preparo de amostra	Volume de amostra (µL)	Solvente / Sorvente	Cromatografia	Deteção	LIQ (ng/mL)	Recuperação (%)	Referência
Anlodipino, olmesartana medoxomila, valsartana, hidroclorotiazida	ELL	1000	n-hexano-acetato de etila-álcool isoamílico (88:10:2, v/v/v)	CN (200 x 4,6 mm, 5 µm) PA 10 mmol/L em H ₂ O (pH 2,5), ACN, e MeOH (13:80:7, v/v/v)	UV (235 nm)	100-400	73,5-81,6	(TEKKELI, 2013)
Anlodipino, atorvastatina, orto-hidroxi atorvastatina e para-hidroxi atorvastatina	ELL	500	Metil terc-butil éter-acetato de etila (50:50, v/v)	SCX:C ₁₈ (1:4) (150 x 2,0, 5 µm) AAc 20 mmol/L e 0,3% FA em H ₂ O e ACN (50:50, v/v)	ESI-MS/MS	0,015-0,035	76,39-91,24	(ZHOU <i>et al.</i> , 2013)
Lovastatina, pravastatina, rosuvastatina, sinvastatina	RAM (column switching)	500	Coluna RAM-BSA (30 x 4,6 mm, 15 µm)	C ₈ (125 x 4,0 mm, 5 µm) KH ₂ PO ₄ 0,1 mol/L em H ₂ O (pH 2,5) e ACN	UV (237 nm)	125-500	n.e.	(FAGUNDES <i>et al.</i> , 2014)
Metoprolol, propranolol, carvedilol, diltiazem, verapamil	PPT e DLLME	660	PPT: ACN DLLME: ACN e DCM	Fase estacionária: n.e. Dimensões da coluna: 100 x 4,6 mm, 3,5 µm KH ₂ PO ₄ 0,02 M em H ₂ O (pH 3,8) e ACN (65:35, v/v)	UV (200 nm)	20,0	33,0-82,0	(JOUYBAN <i>et al.</i> , 2015)
Azilsartana medoxomila, azilsartana, azilsartana M-I, azilsartana M-II	EFS	100	Poli(divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona)	C ₁₈ (250 x 2,1 mm, 5 µm) H ₂ O, ACN e AA (40:60:0,05, v/v/v)	ESI-MS/MS	1,0	n.e.	(KUZE <i>et al.</i> , 2015)
Alisquireno, losartana, valsartana, hidroclorotiazida	PPT	50	ACN	HILIC (150 x 2,1 mm, 3,5 µm) AF 5 mmol/L em H ₂ O (pH 4,5) e ACN (10:90, v/v)	ESI-MS/MS	5,0	85,6-96,9	(MEIMAROG LOU <i>et al.</i> , 2015)
Anlodipino, atenolol, clonidina, clortalidona, doxazosina, hidroclorotiazida, nifedipino, olmesartana, ramipril e telmisartana	PPT	200	ACN	C ₁₈ (150 x 2,1 mm, 1,8 µm) FA 0,05% em H ₂ O e FA 0,05% em ACN	ESI-EM/EM	0,078-39,062	84,29-112,60	(DE NICOLÒ <i>et al.</i> , 2016)
Pravastatina e metabólitos, 3'α-hidroxi-pravastatina, pravalactona e 3' α-hidroxi-pravalactona	EFS	100	Poli(divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona)	C ₁₈ (100 x 2,1 mm, 1,8 µm) Eluente A: H ₂ O, ACN e acetato de metilamônio 0,1 mol/L pH 4,5 (89:10:1, v/v/v) Eluente B: ACN, H ₂ O e acetato de metilamônio 0,1 mol/L pH 4,5 (90:9:1, v/v/v)	ESI-EM/EM	0,00020 - 0,00021	93,6-107,8	(VAN HAANDEL <i>et al.</i> , 2016)

Tabela 3 – Métodos para a determinação de fármacos anti-hipertensivos e antilipêmicos em plasma humano (continuação).

Fármaco / Metabólito	Preparo de amostra	Volume de amostra (µL)	Solvente / Sorvente	Cromatografia	Deteção	LIQ (ng/mL)	Recuperação (%)	Referência
(R)-(+)-carvedilol, (S)-(-)-carvedilol e metabólitos (R)-(+)-hidroxifenil carvedilol, (S)-(-)-hidroxifenil carvedilol, (R)-(+)-desmetil carvedilol e (S)-(-)-desmetil carvedilol	ELL	1000	Éter Diisopropílico	Silica gel ligada à vancomicina (250 x 4,6 mm, 5 µm) Eluente A e Eluente B (99:1, v/v) Eluente A: EtOH e MeOH (60:40, v/v) Eluente B: AA 0,18% e TEA 0,02% em H ₂ O	ESI-EM/EM	0,02-0,05	83,70-98,11	(NARDOTTO <i>et al.</i> , 2016)
Sinvastatina, ramipril, atenolol, hidroclorotiazida e ácido acetilsalicílico	PPT	48	ACN	Fenil propil (30 x 2,0 mm, 4 µm) Modo positivo: AF 5 mmol/L em H ₂ O e ACN Modo negativo: FA 0,1% em H ₂ O e FA 0,1% em ACN	ESI-EM/EM	0,10-1,94	72,32-100,70	(DEVALAPALLI <i>et al.</i> , 2017)
Acenocumarol, amilorida, bisoprolol, fluvastatina, furosemida, glibenclamida, hidroclorotiazida, valsartana, verapamil e varfarina	PPT e EFS	500	PPT: ACN EFS: troca catiônica forte	C ₁₈ (50 x 2,1 mm, 1,7 µm) Eluente A: AAc 5 mmol/L em H ₂ O (pH 4,5) com 10% MeOH Eluente B: MeOH	UV e FL	40,0-300,0	51-95	(GONZÁLEZ MENDIA <i>et al.</i> , 2017)
Enalapril, perindopril, enalaprilato, perindoprilato, losartana, losartana ácida, valsartana, anlodipino, nifedipino, hidroclorotiazida, espironolactona e canrenona	PPT	50	ACN e MeOH (1:1, v/v)	C ₁₈ (100 x 2,1 mm, 1,7 µm) FA 0,1% em H ₂ O e MeOH	ESI-EM/EM	0,2-40,0	74-115	(VAN DER NAGEL <i>et al.</i> , 2017)
Benazepril, enalapril, enalaprilato, perindopril, perindoprilato, quinapril, quinaprilato, ramipril, trandolapril, trandolaprilato	EFS	50	EFS: resina mista, troca aniônica	C ₁₈ (150 x 3,0 mm, 3,5 µm) Eluente A: FA 1% e AF 2 mmol/L em H ₂ O Eluente B: FA 1% e AF 2 mmol/L em ACN	ESI-EM/EM	0,78	87,74-95,81	(ALI; LÄER; BURCKHARDT, 2018)
Benazepril, fosinopril, captopril e hidroclorotiazida	EFS	500	Poli(divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona)	C ₁₈ (50 x 2,1 mm, 1,8 µm) FA 0,1% em H ₂ O e MeOH (5:95, v/v)	ESI-EM/EM	5,0-100,0	90,60-99,38	(MAHROUSE, 2018)
Atorvastatina, 2-hidroxiatorvastatina, atorvastatina lactona, 2-hidroxiatorvastatina lactona, bisoprolol e clopidogrel ácido	PPT	50	0,3% AA em ACN	C ₁₈ (50 x 2,1 mm, 2,7 µm) Eluente A: FA 0,1% em H ₂ O Eluente B: FA 0,1% em ACN	ESI-EM/EM	0,5-15,0	92,7-108,5	(TURNER <i>et al.</i> , 2018)

Tabela 3 – Métodos para a determinação de fármacos anti-hipertensivos e antilipêmicos em plasma humano (continuação).

Fármaco / Metabólito	Preparo de amostra	Volume de amostra (µL)	Solvente / Sorvente	Cromatografia	Deteção	LIQ (ng/mL)	Recuperação (%)	Referência
Sinvastatina, sinvastatina ácida, atorvastatina, 2-hidroxi atorvastatina, 4-hidroxi atorvastatina e rosuvastatina	ELL	200	Acetato de etila	C ₁₈ (100 x 2,1 mm, 1,7 µm) Eluente A: AF 10 mmol/L e FA 0,04% em H ₂ O Eluente B: ACN	ESI-EM/EM	0,25	87,99-100,37	(EL-ZAILIK <i>et al.</i> , 2019)
Inibidores da enzima conversora de angiotensina (7), antagonistas do receptor de angiotensina-II (5), α-2 agonistas (2), antagonistas dos canais de cálcio (8), β-bloqueadores (9), diuréticos (8), antiagregantes plaquetários (4), inibidores de renina (1), vasodilatores (2), metabólitos (5), outros (1)	PPT	100	TCA 25%	C ₁₈ (150 x 2,1 mm, 1,7 µm) Eluente A: AF 10 mmol/L e FA 0,1% em H ₂ O Eluente B: FA 0,1% em MeOH	ESI-EM/EM	0,005-100	n.e.	(PUNT <i>et al.</i> , 2019)
Inibidores da enzima conversora de angiotensina (8), antagonistas do receptor de angiotensina-II (8), α-1 agonistas (1), α-2 agonistas (3), antagonistas dos receptores α-1 (2), antagonistas α e β (1), antagonistas dos canais de cálcio (8), β-bloqueadores (13), inibidores da MAO (1), diuréticos (13), inibidores de renina (1), antiarrítmicos (3), antagonista dos receptores de aldosterona (1), vasodilatores (3), metabólitos (6), outros (6)	PPT	250	ZnSO ₄ 35 mg/mL em H ₂ O:MeOH, (70:30 v/v)	Fenil hexil (100 x 2,1 mm, 2,6 µm) Eluente A: AF 2 mmol/L e FA 0,1% em H ₂ O (pH 3) Eluente B: ACN e MeOH (50:50, v/v) com 2 mmol/L AF, 0,1% FA, e 1% H ₂ O	ESI-EM/EM	n.a.	n.e.	(RICHTER <i>et al.</i> , 2019)
Metoprolol, anlodipino, canrenona e hidroclorotiazida	PPT	100	ACN	C ₁₈ (50 x 2,1 mm, 1,9 µm) FA 0,1% em H ₂ O e ACN	ESI-EM/EM	1,0-10,0	80,36-101,44	(JOHANNSEN <i>et al.</i> , 2019)

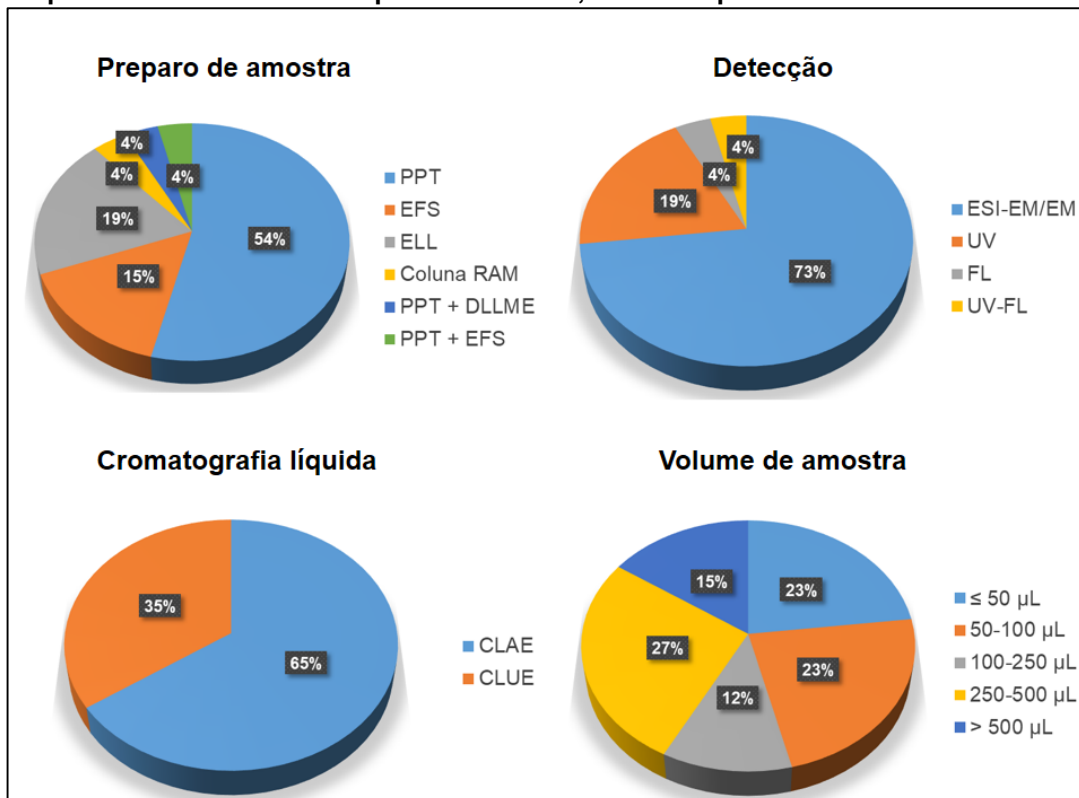
Tabela 3 – Métodos para a determinação de fármacos anti-hipertensivos e antilipêmicos em plasma humano (continuação).

Fármaco / Metabólito	Preparo de amostra	Volume de amostra (µL)	Solvente / Sorvente	Cromatografia	Deteção	LIQ (ng/mL)	Recuperação (%)	Referência
Olmesartana, losartana, irbesartana e valsartana	PPT	400	ACN	CN (250 X 4,6 mm, 5 µm) PA 0,1% em H ₂ O e ACN	FL exc.: 260 nm emis.: 370 nm	25,0-35,0	63,67-90,67	(SOUZA <i>et al.</i> , 2020)

AA, ácido acético; AAc, acetato de amônio; ACN, acetonitrila; AF, formiato de amônio; BSA, albumina sérica bovina; C₁₈, octadecilsilano; C₈, octilsilano; CN, cianopropil; DCM, diclorometano; DLLME, microextração líquido-líquido dispersiva; EFS, extração em fase sólida; ELL, extração líquido-líquido; ESI-EM/EM, ionização por electrospray com espectrometria de massas sequencial; EtOH, etanol; FA, ácido fórmico; FL, fluorescência; H₂O, água; HILIC, Cromatografia com interação hidrofílica; KH₂PO₄, fosfato de potássio monobásico; LIQ, limite inferior de quantificação; MeOH, metanol; n.a., não se aplica; n.e., não encontrado; Na₂HPO₄, fosfato de sódio dibásico; PA, ácido fosfórico; PPT, precipitação de proteínas; RAM, meio de acesso restrito; SCX, troca catiônica forte; TCA, ácido tricloroacético; TEA, trietilamina; THF, tetraidrofurano; UV, ultravioleta; ZnSO₄, sulfato de zinco.

Como é possível observar na **Figura 5**, 62% dos métodos desenvolvidos para a determinação simultânea de fármacos utilizados no tratamento da HAS e das dislipidemias empregaram a precipitação de proteínas como técnica de preparo de amostra, talvez pela sua inespecificidade, o que a torna mais abrangente. Dos trabalhos analisados nesta revisão, apenas um empregou uma técnica de preparo de amostra miniaturizada, a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), para a determinação simultânea de metoprolol, propranolol, carvedilol, diltiazem e verapamil por CLAE-UV (JOUYBAN *et al.*, 2015), demonstrando que estas técnicas ainda são pouco exploradas para o preparo de amostras contendo vários fármacos.

Figura 5 – Análise das informações sobre preparo de amostra, separação e detecção, bem como do volume de amostra empregado, para a determinação de fármacos anti-hipertensivos e hipocolesterolemiantes em plasma humano, obtidas a partir da revisão da literatura.



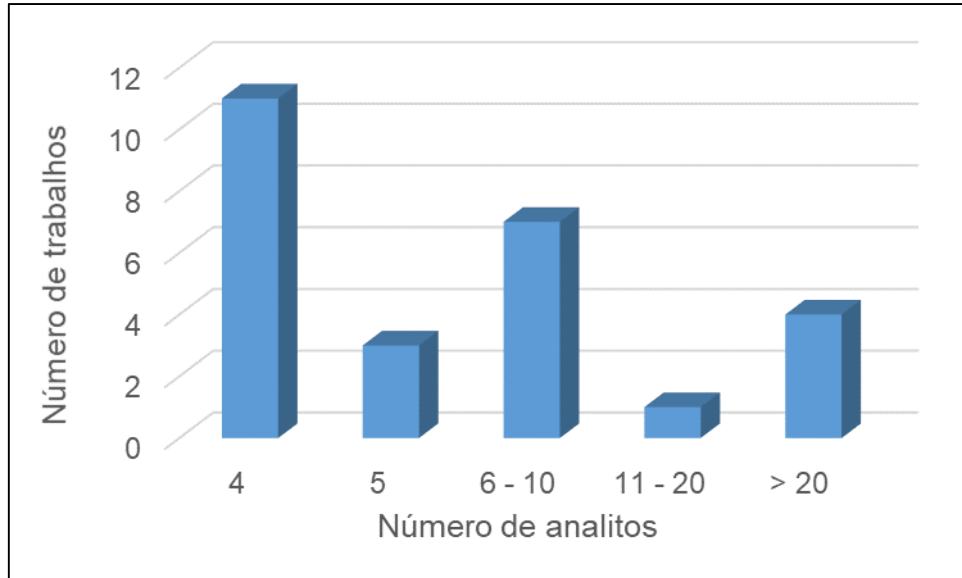
A CLAE ainda é a técnica de separação mais utilizada para a determinação de fármacos em plasma, com 65% dos métodos desenvolvidos, embora a cromatografia líquida de ultraeficiência (CLUE) também tenha ocupado um espaço importante nesse tipo de análise (35%).

A espectrometria de massas sequencial com ionização por electrospray já é a técnica mais utilizada para a detecção de fármacos em amostras biológicas, com 73% dos métodos desenvolvidos. Isso se deve à sua alta seletividade e detectabilidade, essenciais para a determinação de fármacos em matrizes biológicas. Porém, o efeito matriz ainda é uma limitação da LC-MS, podendo afetar a confiabilidade das quantificações realizadas empregando-se a técnica. O uso de métodos de preparo de amostra mais seletivos, a melhora da separação cromatográfica, a seleção apropriada da fonte de ionização, o uso de curva matrizada e de um padrão interno são alternativas para evitar problemas com efeito matriz (BECCARIA; CABOOTER, 2020; DE NICOLÒ; CANTÙ; D'AVOLIO, 2017).

Analisando-se a **Figura 5** (pág. 64), é possível observar também que a diminuição do volume de amostra empregada na análise parece ser uma tendência. Cerca de 46% dos métodos pesquisados utilizaram volume de plasma menor ou igual a 100 µL e apenas 15% dos métodos empregaram volumes maiores do que 500 µL. Com o uso de técnicas de separação e detecção altamente seletivas e sensíveis, como a CLUE e a espectrometria de massas, respectivamente, bem como de técnicas de preparo de amostra que permitem elevada concentração dos analitos, uma possível redução no volume de amostra poderá ser observada nos próximos anos.

Na **Figura 6**, é possível observar um gráfico que relaciona o número de trabalhos publicados e o número de fármacos determinados simultaneamente em plasma. É possível observar que o número de métodos para a determinação simultânea de quatro fármacos é o maior. Além disso, o número de métodos para a determinação simultânea de mais de 10 fármacos em plasma ainda é muito baixo. Portanto, o desenvolvimento de métodos multifármacos ainda é incipiente e deve se desenvolver bastante nos próximos anos, devido aos avanços em relação às técnicas de preparo de amostra, de separação e de detecção. O número de fármacos disponíveis para o tratamento da HAS e das dislipidemias é muito vasto e os esquemas de tratamento muito variados, de forma que esses métodos podem representar importantes ferramentas para diversas áreas das ciências bioanalíticas, entre elas a monitorização terapêutica e as análises toxicológicas.

Figura 6 – Número de trabalhos publicados sobre o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de fármacos anti-hipertensivos e hipocolesterolemiantes em plasma humano e o número de fármacos determinados simultaneamente.



4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Medicamentos

Comprimidos de irbesartana, fabricados por Sun Pharmaceutical Ind. Ltd. e importados e registrados por Ranbaxy Farmacêutica Ltda, lote 2860664, com validade até fevereiro/2019, foram utilizados.

4.1.2 Substâncias químicas de referência e insumos farmacêuticos ativos

As seguintes substâncias químicas de referências foram utilizadas neste estudo: atorvastatina cálcica (USP, 94,9%, lote G0J276), carvedilol (USP, 99,8%, lote F0G379), losartana potássica (USP, 99,8%, lote H1M331), cloridrato de diltiazem (Farmacopeia Brasileira, 100,2%, lote 1024), valsartana (USP, 99,7%, lote K0I386), varfarina (Sigma-Aldrich, 99,5%, lote BCBV7416). Também foram empregados os seguintes insumos farmacêuticos ativos: besilato de anlodipino (Purifarma, lote AMB/070/08/16), cloridrato de verapamil (Fagron, lote 16C04-B011-003142), espironolactona (Sigma-Aldrich, lote 036K1433), irbesartana (obtida e caracterizada neste trabalho, seção 4.2.1), olmesartana (Sequoia Research, lote SRP01204o) e candesartana cilexetila (Sun Chemical Trading CO LTD, lote 20131201).

4.1.3 Reagentes

- Água ultrapura, obtida de sistema de purificação MILLIPORE MILLI-Q DIRECT Q3.
- Reagentes grau analítico: ácido fórmico, ácido fosfórico 85%, trietilamina, ácido acético, bicarbonato de sódio, carbonato de sódio anidro, citrato de sódio tribásico diidratado, acetato de etila, diclorometano, hexano, clorofórmio, clorobenzeno, 1,2-dicloroetano, sulfato de cério e etanol anidro (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), cloreto de sódio, molibdato de amônio, sulfato de sódio anidro, ácido cítrico anidro, hidróxido de sódio e hidróxido de

amônio (Synth, Diadema, SP, Brasil), acetato de amônio e fosfato de sódio monobásico (Neon, São Paulo, SP, Brasil), formiato de amônio (Spectrum, Gardena, CA, EUA) e metil terc-butil éter (MTBE) (Vetec, Duque de Caxias, Brasil).

- Solução de CAM, preparada como descrito a seguir (WAGNER; BLADT; ZGAINSKI, 1984): a um erlenmeyer contendo 5,00 g de sulfato cérico e 25,00 g de molibdato de amônio foram adicionados, sob agitação, 450 mL de água destilada, seguidos de 50 mL de ácido sulfúrico concentrado. A solução final foi agitada por 1 hora e estocada na ausência de luz. Para revelação, borrifou-se essa solução nas placas cromatográficas seguido de aquecimento a 100 °C.
- Solvente para RMN: dimetilsulfóxido-d₆ (DMSO-d₆) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA).
- Solventes e reagentes grau CLAE: metanol (Scharlab, Sentmenat, Barcelona, Espanha), acetonitrila e ácido trifluoroacético (Tedia Company Inc., Fairfield, EUA).
- Vapor de iodo, obtido da seguinte forma: adicionou-se iodo sólido a uma cuba, que foi fechada para se obter uma atmosfera de vapor de iodo.

4.1.4 Amostras biológicas

Amostras de sangue branco (sem os analitos) foram coletadas de voluntários no Laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFMG. As amostras de sangue foram coletadas na parte da manhã de voluntários em jejum e armazenadas em tubos de vidro contendo heparina como anticoagulante. Em seguida, elas foram centrifugadas a 480 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante (plasma) foi armazenado em tubos de plástico em ultrafreezer a -70 °C. Amostras de diferentes voluntários, obtidas no Ambulatório de Anticoagulação do Serviço de Hematologia e Oncologia do Hospital das Clínicas da UFMG, que receberam medicamentos anti-hipertensivos e hipocolesterolemiantes como parte do seu tratamento, foram coletadas. Um questionário foi aplicado aos voluntários para se saber quais medicamentos eles utilizavam na época da coleta das amostras. Todos os voluntários que doaram amostras de sangue para esta pesquisa assinaram termos de consentimento livre e

esclarecido (TCLE) previamente. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFMG (protocolo n° 01455418.4.0000.5149). O parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é apresentado no **ANEXO A**.

4.1.5 Materiais, vidrarias e instrumentos

- Cartuchos MEPS C₁₈ contendo 4 mg de sorvente, tamanho de partícula 45 µm, tamanho do poro 60 Å, P/N 2900501, lote K06-A0495, SGE Analytical Science (Victoria, Austrália).
- Coluna cromatográfica AGILENT Poroshell EC 120, com partículas superficialmente porosas, octadecilsilano como fase ligada, com recobrimento para redução dos grupamentos silanóis residuais, comprimento de 150 mm, diâmetro interno de 2,1 mm e tamanho de partícula de 4 µm.
- Coluna cromatográfica PHENOMENEX Luna Cyano, com partículas superficialmente porosas, ciano como fase ligada, comprimento de 250 mm, diâmetro interno de 4,6 mm e tamanho de partícula de 5 µm.
- Coluna cromatográfica PHENOMENEX Onyx Monolithic C₁₈ (50 x 4,6 mm).
- Coluna cromatográfica WATERS Symmetry, octadecilsilano, com recobrimento para redução de grupos silanóis residuais, comprimento de 75 mm, diâmetro interno de 4,6 mm e tamanho de partícula de 3,5 µm.
- Dispositivo para filtração.
- Filtros de seringa de PVDF com diâmetro de 13 mm e tamanho de poro de 0,45 µm.
- Frasco do tipo vial total recovery com tampa de rosca e septos de silicone.
- Funil de Büchner.
- Membrana filtrante de celulose regenerada MILLIPORE com diâmetro de 47 mm e poros de 0,45 µm.
- Microtubos de polipropileno de 1,5 mL e de 2 mL.
- Papel de filtro quantitativo de filtração lenta (tarja azul), diâmetro de 12,5 cm (Unifil, Alemanha).
- Papel de filtro quantitativo de filtração rápida (tarja preta), diâmetro de 12,5 cm (Unifil, Alemanha).

- Pipeta automática BRAND Transferpette, com volume variável de 10 a 100 μL .
- Pipeta automática Gilson Pipetman P200, com volume variável de 50 a 200 μL .
- Pipeta automática LABMATE Soft, com volume variável de 100 a 1000 μL .
- Pipeta repetitiva eletrônica HandyStep, BRAND (Wertheim, Alemanha).
- Placa para cromatografia em camada delgada de Sílica Gel 60 F₂₅₄ (com indicador de fluorescência), espessura de 0,25 mm, MERCK (Darmstadt, Hesse, Alemanha).
- Ponteiras de polipropileno para uso em pipetas automáticas.
- Seringa para MEPS 250 μL , lote K12-C0009, SGE Analytical Science (Victoria, Austrália).
- Seringas de vidro graduadas de 100 μL , Hamilton (Reno, NV, EUA).
- Sistema de purificação de água MILLIPORE DIRECT Q3.
- Tubos criogênicos de 2 mL e de 5 mL.
- Tubos de polipropileno de 15 mL e de 50 mL com fundo cônico
- Tubos de vidro para coleta de sangue, 9 mL, contendo heparina sódica como anticoagulante.
- Vidrarias diversas: balão de fundo redondo, béqueres de 25 mL, de 50 mL, de 100 mL e de 250 mL, funil, frascos de penicilina, gral e pistilo, kitasato de 250 mL, proveta de 100 mL, bastões de vidro.

4.1.6 Equipamentos

- Agitador tipo vórtex HEIDOLPH Reax top.
- Agitador tipo vórtex VELP SCIENTIFICA F202A0175.
- Aparelho de ponto de fusão Microquímica MQAPF-307 (Laboratório de Química Farmacêutica, Faculdade de Farmácia da UFMG).
- Aparelho de ultrassom BRANSON 3210.
- Aparelho de ultrassom UNIQUE USC750.
- Balança analítica SARTORIUS com precisão de 0,01 mg modelo BP211D.
- Balança semi-analítica Ohaus TP2KS

- Bomba de vácuo WEG B480794.
- Câmara com lâmpada ultravioleta, com emissão em 254 nm.
- Centrífuga EPPENDORF 5424R.
- Centrífuga JOUAN b4i.
- Centrífuga JOUAN MR 23i.
- Concentrador de amostras TECNAL TecVap TE-0194.
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Agilent 1200 equipado com desgaseificador, bomba binária, forno de colunas, injetor automático e amostrador com refrigeração, acoplado a um espectrômetro de massas SCIEX QTRAP 5500, equipado com bomba de infusão.
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Waters Alliance 2695, equipado com desgaseificador, bomba quaternária, forno de colunas, injetor e amostrador automáticos, detector UV/DAD WATERS 2996 e detector de fluorescência SHIMADZU Prominence RF-20A.
- Espectrofluorímetro VARIAN Cary Eclipse (Laboratório de Espectroscopia UV-Vis, Departamento de Química da UFMG).
- Espectrofotômetro de absorção no infravermelho PERKIN ELMER Spectrum One com transformada de Fourier, equipado com acessório ATR.
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker Advance DRX 400, frequência de 400 MHz (Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução – LAREMAR, Departamento de Química da UFMG).
- Estufa JOUAN EU 55.
- Evaporador rotativo IKA RV 10 digital, equipado com banho-maria IKA HB 10 digital.
- Freezer vertical -70 °C REVCO UTL-2186.
- Potenciômetro METROHM 827 pH Lab.

4.2 Métodos

4.2.1 Obtenção de irbesartana a partir de comprimidos comerciais e sua caracterização

Para o desenvolvimento dos métodos analíticos descritos nas seções **4.2.2** e **4.2.3**, utilizaram-se substâncias químicas de referência farmacopeicas ou insumos farmacêuticos ativos dos analitos avaliados. No entanto, não se dispunha de irbesartana substância química de referência ou insumo farmacêutico ativo. Dessa forma, optou-se por adquirir comprimidos comerciais contendo irbesartana, extrair o fármaco e caracterizá-lo, para, posteriormente, utilizá-lo no desenvolvimento e validação dos métodos.

4.2.1.1 Extração de irbesartana a partir de comprimidos e sua purificação

Para realizar a extração, trituraram-se cinco comprimidos, contendo o equivalente a 1500 mg de irbesartana, em gral de vidro, com o auxílio de um pistilo. Transferiu-se o pó para um béquer de vidro de 250 mL e adicionaram-se 100 mL de diclorometano (DCM). Deixou-se o béquer em banho de ultrassom por 10 minutos à temperatura ambiente. Filtrou-se a suspensão obtida em papel de filtro quantitativo de filtração lenta e reservou-se o filtrado. Submeteu-se o pó retido no papel de filtro a uma nova extração. Para isso, colocou-se o papel filtro dentro do béquer de 250 mL, adicionaram-se mais 100 mL de DCM e deixou-se em banho de ultrassom por 10 minutos. Filtrou-se empregando papel de filtro quantitativo de filtração lenta. Os filtrados foram reunidos e filtrados empregando-se membrana de celulose regenerada com tamanho de poro de 0,45 μm . O filtrado foi seco com Na_2SO_4 anidro, o solvente eliminado em evaporador rotativo e o resíduo armazenado em frasco de penicilina. O sólido obtido foi armazenado em estufa à temperatura de 60 °C por 24 horas.

A irbesartana foi recristalizada em etanol absoluto (DIVI'S LABORATORIES, LTD. (IN), 2011). Para isso, 1000 mg do resíduo, obtidos na extração dos comprimidos, foram transferidos para um béquer de 100 mL e solubilizados a quente em cerca de 50 mL de etanol. Resfriou-se a solução à temperatura ambiente e, após 30 min, observou-se a formação de um precipitado branco, que foi filtrado a vácuo e seco em estufa a 60 °C por 24h.

4.2.1.2 Caracterização da substância obtida após a extração

A substância obtida foi caracterizada por cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV/DAD, determinação do ponto de fusão, espectroscopias de absorção no infravermelho e de ressonância magnética nuclear de ^1H , ^{13}C e DEPT 135.

4.2.1.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Aplicou-se solução metanólica contendo o sólido recristalizado obtido a 0,5 mg/mL em placa de CCD de sílica gel com indicador de fluorescência, a qual foi eluída com uma mistura de 10 mL de ACN e três gotas de HCl_{conc} . e revelada com lâmpada UV (254 nm), vapor de iodo e solução de molibdato cérico de amônio (CAM).

4.2.1.2.2 Espectroscopia de absorção no infravermelho

O espectro de absorção na região do infravermelho da substância foi obtido na faixa de números de onda de 4000 a 650 cm^{-1} em espectrofotômetro no infravermelho com reflexão total atenuada (ATR). Avaliou-se a presença de bandas de absorção características dos grupos funcionais da irbesartana e comparou-se com informações disponíveis na literatura.

4.2.1.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Preparou-se solução da substância obtida a 0,5 mg/mL em metanol. Para a análise por CLAE, realizou-se gradiente exploratório amplo empregando-se as condições cromatográficas apresentadas na **Tabela 4**.

Tabela 4 - Condições cromatográficas do gradiente exploratório amplo para a análise da substância obtida na extração por CLAE.

Parâmetros	Condições
Fase móvel	Ácido fórmico 0,1% (v/v) em água (A) e acetonitrila (B)
Modo de eluição	Gradiente (5 – 100% B em 60 minutos)
Vazão da fase móvel	1,0 mL/min
Volume de injeção	20 μL
Coluna	Waters Symmetry C_{18} 75 mm x 4,6 mm 3,5 μm
Temperatura da coluna	30 $^{\circ}\text{C}$
Comprimento de onda de detecção	254 nm
Tempo de corrida	60 minutos

Realizou-se gradiente exploratório também para o metanol utilizado para diluir a substância.

4.2.1.2.4 Determinação do ponto de fusão

A substância obtida foi dessecada em estufa à 60 °C por 2 horas. Colocou-se uma pequena quantidade do pó entre duas lamínulas e submeteu-se à determinação do ponto de fusão. Empregou-se taxa de aquecimento de 30 °C/min até se atingir a temperatura de 170 °C e, em seguida, taxa de aquecimento de 2 °C/min até a completa fusão do pó.

4.2.1.2.5 Ressonância magnética nuclear de ¹H, ¹³C e DEPT 135

Preparou-se solução da substância em DMSO-d₆. Para isso, pesaram-se 10 mg de irbesartana em frasco de penicilina. Adicionaram-se 600 µL de DMSO-d₆ e agitou-se até solubilização. Transferiu-se a solução para tubo de RMN.

Os deslocamentos químicos (δ) foram medidos em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Para processar os espectros utilizou-se o programa TopSpin 3.5 – Bruker.

4.2.2 Método bioanalítico para determinação de olmesartana, irbesartana, losartana e valsartana em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fluorescência (CLAE-FL)

4.2.2.1 Determinação dos comprimentos de onda de excitação e emissão para a detecção dos fármacos por fluorescência

Para a obtenção dos comprimentos de onda de excitação e emissão de candesartana cilexetila (CDC) (PI), irbesartana (IRB), losartana (LOS), olmesartana (OLM) e valsartana (VAL), prepararam-se soluções individuais dos fármacos a 0,5 mg/mL utilizando-se mistura de metanol e água (40:60, v/v) como diluente. Como o comprimento de onda de absorção máxima no ultravioleta normalmente é muito

próximo ao comprimento de onda de excitação para detecção por fluorescência (RANGEL; MERÇON, 2012), obtiveram-se os espectros de absorção no ultravioleta para os fármacos. Foram feitas varreduras de 200 a 400 nm utilizando-se cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm. Nos casos em que a faixa linear do equipamento foi ultrapassada, diluíram-se as soluções para a obtenção dos espectros.

Selecionou-se 260 nm como comprimento de onda de excitação para a obtenção dos espectros de emissão para a detecção por fluorescência. Prepararam-se soluções individuais dos fármacos a 0,5 mg/mL utilizando-se mistura de metanol e água (40:60, v/v) como diluente. Nos casos em que a faixa linear do equipamento foi ultrapassada, diluíram-se as soluções para a obtenção dos espectros. Foram feitas varreduras de 250 a 600 nm para a determinação dos comprimentos de onda de emissão dos fármacos, empregando-se cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm.

4.2.2.2 Otimização das condições cromatográficas

Prepararam-se soluções estoques de CDC, IRB, LOS, OLM e VAL a 0,1 mg/mL em metanol. As soluções foram transferidas para microtubos de plástico e armazenadas em freezer a -70 °C.

Para iniciar o desenvolvimento do método analítico, preparou-se solução contendo CDC, IRB, LOS, OLM e VAL a 0,01 mg/mL a partir das soluções estoque utilizando-se água como diluente.

No início do desenvolvimento do método, testou-se eluição no modo isocrático na tentativa de se separar os fármacos, mas esta se mostrou inadequada. Dessa forma, optou-se por empregar eluição no modo gradiente. As condições cromatográficas empregadas para o método inicial são apresentadas na **Tabela 5**. O gradiente testado inicialmente é apresentado na **Tabela 6**.

Tabela 5 - Condições cromatográficas iniciais para o desenvolvimento de método para determinação de CDC, IRB, LOS, OLM e VAL por CLAE-UV/DAD.

Parâmetros	Condições
Coluna	Waters Symmetry C ₁₈ 75 mm x 4,6 mm 3,5 µm
Fase móvel	Ácido fórmico 0,1% (v/v) em água (A) e metanol (B)
Vazão de fase móvel	1,0 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Temperatura da coluna	30 °C
Comprimento de onda de detecção	254 nm
Tempo de corrida	16 minutos

Tabela 6 – Gradiente inicial para a determinação de CDC, IRB, LOS, OLM e VAL por CLAE-UV/DAD.

Tempo (minutos)	A (%)	B (%)
0	60	40
10	0	100
11	0	100
12	60	40
16	60	40

No desenvolvimento do método analítico, testaram-se metanol e acetonitrila como eluentes orgânicos. Durante estes testes, utilizou-se solução de ácido fórmico 0,1% (v/v) como fase móvel aquosa. Após a definição do solvente orgânico a ser utilizado na composição da fase móvel, das condições cromatográficas e do gradiente, diferentes soluções aquosas foram testadas e comparadas, sendo elas ácido fórmico (AF) 0,1% (v/v), ácido acético 0,1% (v/v), ácido trifluoroacético (TFA) 0,05% (v/v), trietilamina (TEA) 0,1% (v/v), com pH ajustado para 3,0 com ácido fórmico, e ácido fosfórico 0,1% (v/v).

Para a definição da fase aquosa que proporcionou separação cromatográfica mais adequada, preparou-se solução contendo CDC, IRB, LOS, OLM e VAL a 0,01 mg/mL e injetou-se no cromatógrafo cinco vezes utilizando-se cada uma das fases aquosas testadas. Avaliaram-se os seguintes parâmetros cromatográficos relativos aos picos dos analitos testados: fator de cauda (T), número de pratos (N) e razão sinal/ruído (S/R).

Após a definição dos comprimentos de onda de excitação e emissão, descrita na seção anterior, diferentes colunas cromatográficas empacotadas com fases estacionárias distintas foram testadas, sendo elas C₈, C₁₈ e ciano. A coluna cromatográfica que proporcionou a melhor separação entre os picos dos analitos e os

dos interferentes endógenos do plasma foi selecionada para prosseguir com o desenvolvimento do método bioanalítico.

4.2.2.3 Preparo das soluções estoque, soluções de trabalho e padrão interno

Soluções padrão estoque de LOS, IRB, OLM e VAL (0,3 mg/mL), e CDC (PI) (0,1 mg/mL) foram preparadas pesando-se, com exatidão, as substâncias de referência e dissolvendo-as em metanol. Soluções de trabalho de IRB e OLM (5 µg/mL e 50 µg/mL), LOS (10 µg/mL e 50 µg/mL), VAL (3 µg/mL e 30 µg/mL) e CDC (900 ng/mL) foram preparadas a partir das soluções estoque em metanol. Todas as soluções foram armazenadas a -70 °C antes do uso (menos de uma semana).

4.2.2.4 Preparo de amostra

Antes das análises, as amostras de plasma foram descongeladas e deixadas na bancada até atingirem a temperatura ambiente. A extração simultânea de LOS, IRB, OLM e VAL foi comparada utilizando-se uma técnica miniaturizada (MEPS, microextração em sorvente empacotado) e duas convencionais (ELL, extração líquido-líquido; e PPT, precipitação de proteínas). Uma combinação de PPT e MEPS também foi testada. Diferentes condições para cada técnica de extração foram avaliadas e otimizadas, tendo sido estabelecidas levando-se em consideração os valores de log *D* fornecidos pelo software *log D predictor* (CHEMAXON, 2020).

4.2.2.4.1 Microextração em sorvente empacotado (MEPS)

Uma alíquota de 50 µL de CDC (PI) solução de trabalho foi adicionada a 400 µL de amostra de plasma contendo os analitos a 100 ng/mL e a mistura foi agitada em vórtex por 15 segundos. Em seguida, 400 µL de tampão citrato 0,1 mol/L pH 3,8 foram adicionados à amostra, que foi agitada em vórtex por 30 segundos. As amostras foram centrifugadas a 9400 *g* por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado utilizando-se um filtro de seringa de PVDF de 0,45 µm. Realizou-se a extração com MEPS, empregando-se 10 ciclos de aspiração e ejeção de 100 µL do sobrenadante. A seguir, o cartucho foi lavado com água (4 ciclos de 100 µL), para a remoção de interferentes,

e os analitos dessorvidos utilizando-se uma mistura de metanol e acetonitrila (60:40, v/v) com 1% de hidróxido de amônio (4 ciclos de 50 μL). O solvente foi evaporado em concentrador de amostras, sob uma corrente de ar comprimido, a 45 °C e o resíduo ressuspensionado em 200 μL de uma mistura de acetonitrila e água (20:80, v/v), agitado em vórtex por 30 segundos e transferido para vial. Quando se realizou a precipitação de proteínas, utilizando-se 800 μL de acetonitrila, antes da MEPS, o sobrenadante foi evaporado e o resíduo ressuspensionado em 400 μL de tampão citrato 0,1 mol/L pH 3,8, agitado em vórtex por 30 segundos e filtrado em filtro de seringa de PVDF de 0,45 μm . Em seguida foi realizada a MEPS.

4.2.2.4.2 Extração líquido-líquido (ELL)

Uma alíquota de 50 μL de CDC (PI) solução de trabalho foi adicionada a 400 μL de amostra de plasma contendo os analitos a 100 ng/mL e a mistura foi agitada em vórtex por 15 segundos. O pH da amostra foi ajustado para 5,0 pela adição de 15 μL de ácido fórmico 5% (v/v). Adicionaram-se 2 mL de metil terc-butil éter (MTBE) e agitou-se em vórtex por 60 segundos. As amostras foram centrifugadas a 1948 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi evaporado em concentrador de amostras, sob uma corrente de ar comprimido, a 45 °C, e o resíduo ressuspensionado em 200 μL de uma mistura de acetonitrila e água (20:80, v/v), agitado em vórtex por 30 segundos, filtrado em filtro de seringa de PVDF de 0,45 μm e transferido para vial.

4.2.2.4.3 Precipitação de proteínas (PPT)

Nos testes iniciais, a precipitação de proteínas proporcionou os melhores resultados para todos os analitos. Assim, o procedimento foi otimizado utilizando-se um planejamento fatorial em dois níveis, com triplicata no ponto central, avaliando-se o volume de amostra (200 μL , 300 μL e 400 μL) e a razão dos volumes de acetonitrila e plasma (2:1, 3:1 e 4:1), como variáveis que poderiam afetar a extração dos analitos. As razões sinal-ruído (S/R) para todos os analitos foram utilizadas como respostas. O planejamento experimental forneceu uma matriz composta por 7 experimentos (**Tabela 7**). O software Design-Expert[®] (versão 10, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, Estados Unidos) foi utilizado para o planejamento dos experimentos e para a análise

dos resultados. A análise de variância (ANOVA) foi empregada para avaliar a regressão, a falta de ajuste e a significância dos coeficientes dos modelos matemáticos. Antes da otimização, algumas variáveis foram avaliadas em experimentos preliminares para estabelecer as condições utilizadas no planejamento experimental, como solvente precipitante, a adição de ácido fórmico ou hidróxido de amônio ao solvente precipitante, o volume de amostra, a razão dos volumes de acetonitrila e plasma e o tempo de agitação.

Tabela 7 – Matriz do planejamento fatorial em dois níveis para a otimização do preparo de amostra por precipitação de proteínas.

Experimento	Valores testados (valores codificados)	
	X ₁ (volume de amostra, µL)	X ₂ (V _{ACN} /V _{plasma})
1	200 (-1)	2 (-1)
2	400 (+1)	2 (-1)
3	200 (-1)	4 (+1)
4	400 (+1)	4 (+1)
5	300 (0)	3 (0)
6	300 (0)	3 (0)
7	300 (0)	3 (0)

Após a otimização pelo planejamento fatorial, o procedimento para a precipitação de proteínas foi realizado como descrito a seguir. Uma alíquota de 50 µL de CDC (PI) solução de trabalho foi adicionada a 400 µL de amostra de plasma contendo os analitos a 100 ng/mL e a mistura foi agitada em vórtex por 15 segundos. Adicionaram-se 800 µL de acetonitrila e agitou-se em vórtex por 60 segundos. As amostras foram centrifugadas a 9400 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi evaporado em concentrador de amostras, sob uma corrente de ar comprimido, a 45 °C, e o resíduo ressuspendido em 200 µL de uma mistura de acetonitrila e água (20:80, v/v), agitado em vórtex por 30 segundos, filtrado em filtro de seringa de PVDF de 0,45 µm e transferido para vial.

4.2.2.5 Validação do método bioanalítico

Previamente à realização dos ensaios de validação, estabeleceram-se as faixas de concentração dos fármacos, com base nas suas concentrações plasmáticas máximas (C_{máx}) e nos seus tempos de meia-vida de eliminação. O limite inferior de quantificação dos fármacos foi calculado como a concentração plasmática após três tempos de

meia-vida de eliminação. Além disso, os analitos, nessas concentrações, deveriam apresentar picos com razão S/R de, no mínimo, 10, e DPR entre razões das alturas dos picos dos analitos e as alturas dos picos do padrão interno de no máximo 20%. O teste foi realizado em quintuplicata.

O método bioanalítico foi validado de acordo com as recomendações do guia de validação de métodos bioanalíticos do FDA – Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry (FDA, 2018), da Resolução RDC n° 27 de 17 de maio de 2012 da ANVISA (BRASIL, 2012) e o Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos da European Medicines Agency (EMA) (EMA, 2011). Foram avaliados os parâmetros seletividade, efeito residual, linearidade, precisão, exatidão, recuperação e estabilidade dos analitos na matriz biológica. Os dados foram analisados com o auxílio dos softwares Microsoft Excel® e Empower 3®.

4.2.2.5.1 Seletividade

A seletividade do método bioanalítico desenvolvido foi avaliada analisando-se seis amostras de plasma branco de diferentes fontes, sendo quatro normais, uma hemolisada e uma lipêmica. Para avaliar a porcentagem dos interferentes presentes nas amostras de plasma branco em relação aos analitos, prepararam-se duas amostras adicionadas dos analitos no limite inferior de quantificação (LIQ). As alturas dos picos interferentes foram comparadas com as médias das alturas dos picos dos analitos obtidas das amostras no LIQ. Os picos interferentes presentes deveriam possuir alturas inferiores a 20% das alturas dos analitos no LIQ e inferiores a 5% da altura do padrão interno no LIQ para que o método fosse considerado seletivo.

4.2.2.5.2 Efeito residual

O efeito residual foi avaliado por meio da injeção de uma amostra de plasma branco, uma injeção de uma amostra de plasma adicionada dos analitos no limite superior de quantificação (LSQ) e duas injeções subsequentes da mesma amostra de plasma branco anteriormente injetada. Para que o efeito residual fosse descartado, as alturas dos picos interferentes, observados nos tempos de retenção dos analitos nas duas

injeções subsequentes à amostra no LSQ, deveriam ser inferiores a 20% das alturas dos picos dos analitos no LIQ e inferiores a 5% da altura do pico do padrão interno no LIQ.

4.2.2.5.3 Linearidade

Amostras branco (sem os analitos e o PI), amostras zero (sem os analitos, mas com o PI) e amostras de calibração contendo todos os analitos em oito níveis de concentração foram preparadas em duplicata, em três dias diferentes, para a avaliação da linearidade do método bioanalítico desenvolvido.

Oito amostras de calibração foram preparadas pela adição das soluções de trabalho ou das soluções estoque a um *pool* de plasma branco. As concentrações das amostras de calibração são apresentadas na **Tabela 8**.

Tabela 8 – Concentrações de LOS, IRB, OLM e VAL nas amostras de plasma para a avaliação da linearidade do método bioanalítico.

Nível	Concentração (ng/mL)			
	LOS	IRB	OLM	VAL
1 (LIQ)	35,0	25,0	25,0	25,0
2	100,0	50,0	50,0	50,0
3	250,0	100,0	100,0	100,0
4	500,0	250,0	250,0	250,0
5	750,0	500,0	500,0	500,0
6	1000,0	1000,0	750,0	750,0
7	1750,0	1750,0	1000,0	1000,0
8 (LSQ)	2500,0	2500,0	1500,0	1500,0

LIQ, limite inferior de quantificação; LSQ, limite superior de quantificação; LOS, losartana; IRB, irbesartana; OLM, olmesartana; VAL, valsartana.

As curvas analíticas foram construídas utilizando-se as variáveis concentração e a razão das alturas dos picos dos analitos pela altura do pico do padrão interno. Avaliaram-se os modelos matemáticos empregados e a necessidade ou não de ponderação das curvas de calibração obtidas para todos os analitos.

Para que os padrões de calibração fossem considerados aprovados, o desvio da concentração obtida pelo modelo em relação à concentração nominal deveria ser de no máximo 20% para os padrões do LIQ e de no máximo 15% para os demais

padrões. Para que a curva analítica fosse considerada aprovada, pelo menos 75% dos padrões deveriam ser aprovados, incluindo os do LIQ e do LSQ.

4.2.2.5.4 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação para OLM, LOS, IRB e VAL foram estabelecidos pela injeção de amostras que levassem à obtenção de razões S/R igual a 3 e a 10, respectivamente. As concentrações obtidas para os limites de quantificação dos analitos foi empregada como limite inferior de quantificação (LIQ) na curva analítica.

4.2.2.5.5 Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão do método bioanalítico foram determinadas analisando-se cinco réplicas de amostras de controle de qualidade em cinco níveis de concentração, sendo eles o controle de qualidade no limite inferior de quantificação (CQLIQ), controle de qualidade de baixa concentração (CQB), controle de qualidade de média concentração (CQM), controle de qualidade de alta concentração (CQA) e controle de qualidade de diluição (CQD), em três dias diferentes, de forma a se avaliar a precisão e a exatidão intracorrida e intercorridas.

As amostras de controle de qualidade foram preparados pela adição das soluções de trabalho ou das soluções estoque a um *pool* de plasma branco. As concentrações das amostras de controle de qualidade são apresentadas na **Tabela 9**.

Tabela 9 – Concentrações de LOS, IRB, OLM e VAL nas amostras de plasma para a avaliação da precisão e exatidão do método bioanalítico.

Nível	Concentração (ng/mL)			
	LOS	IRB	OLM	VAL
CQLIQ	35,0	25,0	25,0	25,0
CQB	105,0	75,0	75,0	75,0
CQM	1250,0	1250,0	750,0	750,0
CQA	2000,0	2000,0	1250,0	1250,0
CQD	10000,0	10000,0	6000,0	6000,0

CQLIQ, controle de qualidade do limite inferior de quantificação; CQB, controle de qualidade de baixa concentração; CQM, controle de qualidade de média concentração; CQA, controle de qualidade de alta concentração; CQD, controle de qualidade de diluição; LOS, losartana; IRB, irbesartana; OLM, olmesartana; VAL, valsartana.

Para que o método bioanalítico fosse considerado aprovado, os valores de DPR deveriam ser inferiores a 20% no CQLIQ e a 15% nos demais controles de qualidade, ao passo que para ser considerado exato, os valores de EPR deveriam ser de $\pm 20\%$ no CQLIQ e de $\pm 15\%$ nos demais níveis.

4.2.2.5.6 Recuperação

A recuperação do método bioanalítico foi avaliada empregando-se as amostras de CQB, CQM e CQA analisadas em um dos três dias. Para a comparação, foram extraídas amostras de plasma branco e, ao final do preparo das amostras, estas foram ressuspensas com soluções nas concentrações de CQB, CQM e CQA. Cada um dos níveis de concentração foi preparado em quintuplicata. Para o cálculo da recuperação, utilizou-se a equação a seguir:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Altura do pico do analito}_{CQ}}{\text{Altura do pico do analito}_{SE}} \times 100$$

Em que:

*Altura do pico do analito*_{CQ} = altura do pico do analito nas amostras de controle de qualidade

*Altura do pico do analito*_{SE} = altura do pico do analito nas amostras de plasma branco extraídas e ressuspensas com soluções nas concentrações dos controles de qualidade.

4.2.2.5.7 Estabilidade dos analitos na matriz biológica

A estabilidade dos analitos em plasma foi avaliada em diferentes condições, sendo elas: estabilidade de curta duração (ECD), estabilidade pós-processamento (EPP), estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento (ECC) e estabilidade de longa duração (ELD). Para todas as condições, a estabilidade foi avaliada analisando-se amostras de CQB e CQA, em triplicata.

A estabilidade de curta duração (ECD) foi avaliada deixando-se as amostras em bancada pelo tempo que elas poderiam aguardar análise em uma rotina laboratorial. As amostras foram deixadas na bancada à temperatura ambiente por quatro horas e, em seguida, foram extraídas e injetadas.

A estabilidade pós-processamento foi avaliada reinjetando-se as amostras previamente extraídas e que haviam permanecido no injetor do cromatógrafo a 20 °C por 30 horas.

A estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento foi avaliada após três ciclos. As amostras foram congeladas em ultrafreezer a -70 °C e descongeladas até temperatura ambiente (25 °C). Em cada ciclo, as amostras foram mantidas congeladas por pelo menos 12 horas. Após o último ciclo de congelamento e descongelamento, as amostras foram extraídas e analisadas.

A estabilidade de longa duração (ELD) foi avaliada armazenando-se amostras em ultrafreezer a -70 °C durante 30 dias. Após esse período, as amostras foram extraídas e analisadas. Os analitos foram considerados estáveis na matriz biológica nas condições avaliadas se a variação do valor de EPR fosse de até $\pm 15\%$.

4.2.2.6 Aplicação do método bioanalítico

O método bioanalítico foi aplicado a 15 amostras de pacientes que faziam uso de medicamentos anti-hipertensivos, entre eles a losartana. Os voluntários fazem parte de grupo atendido no Ambulatório de Anticoagulação do Serviço de Hematologia e Oncologia do Hospital das Clínicas da UFMG.

4.2.3 Método bioanalítico para a determinação simultânea de fármacos anti-hipertensivos e hipocolesterolemiantes em plasma humano empregando microextração líquido-líquido assistida por vórtex (VALLME) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM)

4.2.3.1 Otimização das condições do espectrômetro de massas

A primeira etapa do desenvolvimento do método consistiu na otimização das condições para ionização e fragmentação dos analitos no espectrômetro de massas. Para isso, foi feita infusão direta de solução contendo os analitos no espectrômetro de massas. Prepararam-se soluções estoque de todos os fármacos na concentração de 0,1 mg/mL em metanol. Na sequência, preparou-se solução contendo todos os fármacos a 50 ng/mL em uma mistura de acetonitrila e água (50:50, v/v), acidificada com 0,1% (v/v) de ácido fórmico, a partir das soluções estoque.

Para se confirmar a presença dos íons de interesse, foram obtidos espectros de massas de varredura total, utilizando-se vazão de infusão de 10 μ L/min, posição do spray vertical e horizontal ajustada em 10 e em 5, respectivamente, 10 ciclos e taxa de varredura de 200 Da/s.

A partir da infusão direta dos analitos, determinaram-se as transições de massas (íon precursor – íon produto) para quantificação e confirmação. Também foram otimizados os parâmetros de ionização e fragmentação, como potencial de desagregação (DP, declustering potential) ou voltagem do cone, energia de colisão (CE, collision energy) e potencial de saída da célula de colisão (CXP, collision cell exit potential). O íon produto mais intenso foi definido para a transição de massas de quantificação e o segundo mais intenso para a transição de confirmação.

O modo de ionização, positivo ou negativo, foi definido pela avaliação visual das estruturas químicas dos analitos, observando-se a presença de grupos ionizáveis. Como a maioria dos analitos tende a ionizar preferencialmente no modo positivo, optou-se por utilizar este modo de ionização para prosseguir com o desenvolvimento do método.

Utilizando-se o modo de varredura total (*full scan*), confirmou-se a presença dos íons precursores referentes aos analitos nas soluções empregadas para a otimização das condições do espectrômetro de massas. Observaram-se os sinais dos íons $[M+H]^+$, bem como de seus possíveis adutos, para a confirmação dos íons precursores. Em

seguida, utilizou-se o modo de monitoramento de íon único (SIM, single ion monitoring), para verificar as intensidades dos sinais referentes aos diferentes analitos. Posteriormente, realizou-se a otimização automática dos parâmetros de ionização e fragmentação de todos os analitos, na qual o próprio equipamento otimiza os parâmetros DP (modo SIM – single ion monitoring), CE e CXP (modo MRM – multiple reaction monitoring).

Para a otimização dos parâmetros da fonte electrospray, primeiramente realizaram-se vários experimentos para a definição da composição e da vazão da fase móvel a serem utilizadas, já que essas variáveis podem influenciar os parâmetros da fonte de ionização.

Posteriormente, selecionou-se o analito que ionizou menos durante os testes de otimização dos parâmetros de ionização e fragmentação no espectrômetro de massas, a espirolactona. Preparou-se uma solução de espirolactona a 10 ng/mL em uma mistura de água e metanol (50:50, v/v) acidificada com 0,1% de ácido fórmico, a partir da solução estoque de espirolactona. Os parâmetros da fonte foram otimizados por análise por injeção em fluxo (FIA, flow injection analysis), na qual não se utiliza coluna cromatográfica entre o cromatógrafo e o espectrômetro de massas. Os parâmetros avaliados e as condições testadas durante a otimização são descritos na **Tabela 10**.

Tabela 10 – Parâmetros e condições testadas durante a otimização dos parâmetros da fonte electrospray.

Parâmetro	Condições testadas
Dissociação ativada por colisão (CAD)	Baixa; média; alta
Gás contra-corrente (psi)	10; 12; 15; 20
Voltagem do spray (V)	4000; 4500; 5000; 5500
Temperatura (°C)	450; 500; 550; 600; 650
Gás de nebulização (GS1) (psi)	40; 45; 50
Gás auxiliar (GS2) (psi)	40; 45; 50

As condições cromatográficas utilizadas na otimização dos parâmetros da fonte são apresentadas na **Tabela 11**.

Tabela 11 - Condições cromatográficas utilizadas para a otimização dos parâmetros da fonte electrospray.

Parâmetros	Condições
Fase móvel	Ácido fórmico 0,1% (v/v) e acetonitrila (50:50, v/v)
Vazão de fase móvel	1,0 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Tempo de corrida	0,7 min
Divisor de fluxo (<i>split</i>)	1:10

As condições da fonte e as de ionização e fragmentação otimizadas neste tópico foram utilizadas para a otimização das condições cromatográficas do método.

4.2.3.2 Otimização das condições cromatográficas

Para realizar o ajuste da composição da fase móvel e selecionar o modo de eluição empregado, levou-se em consideração as características físico-químicas dos analitos avaliados neste trabalho. Como os fármacos apresentam valores de log P muito distintos, optou-se por utilizar eluição em gradiente durante o desenvolvimento do método. Diferentes aditivos de fase móvel (ácido fórmico, formiato de amônio e acetato de amônio) e solventes orgânicos (acetonitrila e metanol) foram empregados na tentativa de se obter melhor detectabilidade e formato dos picos cromatográficos.

As condições cromatográficas empregadas para iniciar o desenvolvimento do método são apresentadas na **Tabela 12** e o gradiente utilizado na **Tabela 13**.

Tabela 12 - Condições cromatográficas iniciais para o desenvolvimento de método para a determinação dos fármacos por CLAE-EM/EM.

Parâmetros	Condições
Colunas	1) Poroshell EC C ₁₈ (150 x 2,1 mm, 4 µm) 2) Phenomenex Synergi Fusion (50 x 2,0 mm, 4 µm) 3) Onyx Monolithic C ₁₈ (50 x 4,6 mm)
Fases móveis aquosas	Ácido fórmico (0,01%; 0,05% e 0,1% v/v) Ácido fórmico 0,1% (v/v) + formiato de amônio 5 mmol/L Acetato de amônio (5 mmol/L e 10 mmol/L) pH 5,5 Formiato de amônio (5 mmol/L e 10 mmol/L) pH 4,0
Eluentes orgânicos	Metanol e acetonitrila
Modo de eluição	Gradiente
Vazões de fase móvel	0,4 mL/min (colunas 1 e 2) e 1,0 mL/min (coluna 3)
Volume de injeção	10 µL
Temperatura da coluna	30 °C
Tempo de corrida	15 minutos

Tabela 13 – Gradiente utilizado para iniciar o desenvolvimento do método por CLAE-EM/EM.

Tempo (minutos)	A (%)	B (%)
0	80	20
10	0	100
11	80	20
15	80	20

Todos os testes para a otimização das condições cromatográficas foram realizados com solução contendo 100 ng/mL de cada um dos fármacos avaliados, preparada a partir das soluções estoque, utilizando-se mistura de água e metanol (10:90, v/v) como diluente.

Para a obtenção de picos com formatos e número de pontos adequados, de forma a se obter boa precisão de injeção, otimizaram-se os valores de dwell time para todos os analitos por meio da equação a seguir:

$$Dwell\ time\ (ms) = \frac{Largura\ do\ pico}{\frac{Número\ de\ transições\ de\ massa}{Número\ de\ pontos}} \times 60.000$$

Em que:

Largura do pico = tempo em que o pico termina menos o tempo em que ele inicia, em minutos.

Número de transições de massas = número de transições de massas monitoradas simultaneamente, considerando-se uma transição de quantificação e uma de confirmação para cada analito.

Número de pontos = número de pontos estabelecido para cada pico.

Em seguida, o gradiente foi otimizado de forma a se obter fatores de retenção adequados ($k > 1$) e tempo de corrida curto.

Determinou-se a repetibilidade dos tempos de retenção dos fármacos injetando-se no cromatógrafo uma solução contendo todos os analitos a 100 ng/mL em quintuplicata e calculando-se o desvio padrão e o desvio padrão relativo (DPR) dos tempos de retenção de todos os fármacos.

4.2.3.3 Preparo das soluções estoque, soluções de trabalho e padrão interno

Soluções padrão estoque de atorvastatina (ATV), carvedilol (CVD), varfarina (VAR), valsartana (VAL), anlodipino (ANL) (0,2 mg/mL), espironolactona (ESP), losartana (LOS), diltiazem (DTZ), verapamil (VPM) (0,3 mg/mL) e irbesartana (IRB) (PI) (0,1 mg/mL) foram preparadas pesando-se, com exatidão, as substâncias de referência e dissolvendo-as em metanol. Soluções de trabalho contendo LOS, ESP, VPM e DTZ (0,8 µg/mL, 10,0 µg/mL, 25,0 µg/mL e 72,5 µg/mL), VAL e VAR (10,0 µg/mL, 50 µg/mL e 100,0 µg/mL), ATV (2,0 µg/mL, 5,0 µg/mL, 15,0 µg/mL e 35,0 µg/mL), CVD (2,0 µg/mL, 5,0 µg/mL, 15,0 µg/mL e 50,0 µg/mL), ANL (0,4 µg/mL, 2,0 µg/mL, 10,0 µg/mL e 20,0 µg/mL) e IRB (175 ng/mL) foram preparadas a partir das soluções estoque em metanol. Todas as soluções foram armazenadas a -70 °C antes do uso (menos de uma semana).

4.2.3.4 Otimização do método de preparo de amostra

4.2.3.4.1 Precipitação de proteínas

Inicialmente, realizou-se uma precipitação das proteínas do plasma. Foram testadas diferentes soluções precipitantes, como ácido tricloroacético a 10% (m/v), ácido trifluoroacético (TFA) a 10% (m/v) e solução saturada de sulfato de amônio. Após a adição de 40 µL de padrão interno solução de trabalho a 100 µL de plasma agitou-se em vórtex por 15 segundos. Foram adicionados 400 µL de cada um dos agentes precipitantes e agitou-se em vórtex por 60 segundos. Por fim, a amostra foi submetida à centrifugação por 5 minutos a 9400 g e 4 °C. Para selecionar a melhor solução precipitante, os sobrenadantes foram filtrados em filtro de seringa de PVDF de 0,45 µm e posteriormente injetados no sistema de CLAE-EM/EM. Todos os testes foram realizados em triplicata.

O sobrenadante obtido na etapa de precipitação de proteínas foi utilizado na sequência para a realização da microextração líquido-líquido assistida por vórtex (VALLME). Para os testes de otimização do método de preparo de amostras, empregou-se uma mistura dos analitos a 50 ng/mL em plasma.

4.2.3.4.2 Otimização da microextração líquido-líquido assistida por vórtex (VALLME)

Para a otimização da VALLME, foram avaliadas a influência das variáveis pH, concentração de cloreto de sódio (NaCl), volume de solução tampão, solvente extrator, volume de solvente extrator e tempo de agitação na extração dos analitos a partir da amostra de plasma.

Para a definição do pH da solução amostra que proporcionaria maior eficiência de extração dos analitos, prepararam-se soluções tampão a 100 mmol/L com diferentes valores de pH. A força iônica foi mantida constante entre os tampões pela adição de diferentes concentrações de NaCl. O preparo das soluções tampão é descrito na

Tabela 14.

Tabela 14 – Modo de preparo das soluções tampão para a avaliação do efeito do pH na extração dos analitos por VALLME.

Solução tampão (pH)	Modo de preparo
2,0	Pesaram-se 7,82 g de NaCl. Adicionaram-se 90 mL de água. Deixou-se em banho de ultrassom até a completa dissolução. Adicionaram-se 582 µL de ácido fosfórico. O pH foi ajustado para 1,99 pela adição de hidróxido de sódio diluído. Completou-se o volume para 100 mL com água e homogeneizou-se.
4,0	Pesaram-se 984 mg de citrato de sódio tribásico dihidratado, 1,28 g de ácido cítrico e 6,83 g de cloreto de sódio. Adicionaram-se 90 mL de água. Ajustou-se o pH para 3,99 pela adição de hidróxido de sódio diluído. Completou-se o volume para 100 mL com água e homogeneizou-se.
6,0	Pesaram-se 1,18 g de citrato de sódio tribásico dihidratado, 1,15 g de ácido cítrico e 6,6 g de cloreto de sódio. Adicionaram-se 90 mL de água. Ajustou-se o pH para 5,99 pela adição de hidróxido de sódio diluído. Completou-se o volume para 100 mL com água e homogeneizou-se.
8,0	Pesaram-se 1,2 g de fosfato de sódio monobásico e 6,4 g de NaCl e adicionaram-se 90 mL de água. Ajustou-se o pH para 8,00 pela adição de hidróxido de sódio diluído. Completou-se o volume para 100 mL com água e homogeneizou-se.
10,0	Pesaram-se 388 mg de bicarbonato de sódio, 571 mg de carbonato de sódio anidro e 7,04 g de cloreto de sódio e adicionaram-se 90 mL de água. Ajustou-se o pH para 10,00 pela adição de hidróxido de sódio diluído. Completou-se o volume para 100 mL com água e homogeneizou-se.

Para a realização do teste, transferiu-se o sobrenadante da precipitação de proteínas para um tubo cônico de plástico de 15 mL contendo 2,5 mL da respectiva solução tampão. A seguir, adicionaram-se 200 µL de diclorometano e agitou-se em vórtex a

3000 rpm por 120 segundos. As amostras foram centrifugadas à 2885 g e à temperatura ambiente. Posteriormente, o sedimento foi aspirado, utilizando-se uma seringa de vidro graduada, e transferido para um microtubo de plástico. O sedimento foi evaporado em concentrador de amostras sob fluxo de ar comprimido, a 45 °C. O resíduo foi ressuspenso com 50 µL de uma mistura de acetonitrila e água (20:80, v/v) e injetado no cromatógrafo. Os testes foram realizados em triplicata.

Em seguida, avaliou-se a concentração de NaCl que proporcionaria a melhor extração dos analitos. Para isso, prepararam-se soluções tampão 100 mmol/L, com pH ajustado para 6,0, contendo diferentes concentrações de NaCl (0%, 1%, 2%, 4%, 6%, 8% e 10% m/v). Para o teste, seguiu-se o procedimento descrito anteriormente, alterando-se apenas a solução tampão utilizada.

O volume de solução tampão a ser adicionado ao sobrenadante da precipitação de proteínas também foi avaliado. Para o teste, empregou-se solução tampão 100 mmol/L, com pH ajustado para 6,0, contendo 1% (m/v) de NaCl. Foram avaliados os seguintes volumes: 1,5 mL, 2,5 mL, 4,5 mL e 9,5 mL. O preparo das amostras foi realizado como descrito anteriormente, alterando-se apenas a solução tampão utilizada.

Para selecionar o solvente extrator que proporcionaria a melhor eficiência de extração dos analitos, testaram-se quatro solventes orgânicos clorados, com densidade maior do que a água, de forma que, ao fim da extração, o solvente sedimentasse no fundo do tubo. Foram testados os seguintes solventes: diclorometano, clorofórmio, clorobenzeno e 1,2-dicloroetano. Em seguida, o volume de solvente extrator (100 µL, 200 µL, 300 µL e 500 µL) também foi avaliado.

Por fim, com a finalidade de se obter os maiores rendimentos de extração para os analitos avaliados em um tempo de análise adequado, avaliaram-se diferentes tempos de agitação em vórtex (60 s, 120 s, 180 s e 300 s).

4.2.3.5 Validação do método bioanalítico

Previamente à realização dos ensaios de validação, estabeleceram-se as faixas de concentração dos fármacos, com base nas suas concentrações plasmáticas máximas ($C_{máx}$) e nos seus tempos de meia-vida de eliminação. O limite inferior de quantificação dos fármacos foi calculado como a concentração plasmática após três tempos de meia-vida de eliminação. Além disso, os analitos, nessas concentrações, deveriam apresentar picos com razão S/R de, no mínimo, 10, e DPR entre razões das áreas dos picos dos analitos e as áreas dos picos do padrão interno de no máximo 20%. O teste foi realizado em quintuplicata.

O método bioanalítico foi validado de acordo com as recomendações do guia de validação de métodos bioanalíticos do FDA – Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry (FDA, 2018), da Resolução RDC n° 27 de 17 de maio de 2012 da ANVISA (BRASIL, 2012) e o Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos da European Medicines Agency (EMA) (EMA, 2011). Foram avaliados os parâmetros seletividade, efeito residual, efeito matriz, linearidade, precisão, exatidão, recuperação e estabilidade dos analitos na matriz biológica. Os dados foram analisados com o auxílio dos softwares Microsoft Excel® e MultiQuant®.

4.2.3.5.1 Seletividade

O teste de seletividade foi realizado analisando-se oito amostras de plasma branco de diferentes fontes, sendo cinco normais, duas hemolisadas e uma lipêmica. Utilizaram-se como respostas as áreas dos picos dos analitos e do padrão interno.

Para que o método fosse considerado seletivo, as áreas dos picos de interferentes endógenos nos tempos de retenção dos analitos e do padrão interno deveriam ser de até 20% das áreas obtidas no LIQ, para os analitos, e de até 5% das áreas obtidas para o padrão interno no LIQ.

4.2.3.5.2 Efeito residual

O teste de efeito residual foi avaliado pela injeção subsequente de uma amostra de plasma branco, uma amostra no LSQ e duas injeções da mesma amostra de plasma

branco. Utilizaram-se como respostas as áreas dos picos dos analitos e do padrão interno.

Para que o efeito residual fosse descartado, as áreas dos picos dos analitos e do padrão interno, nas amostras de plasma branco injetadas após o LSQ, deveriam ser de até 20% das áreas obtidas para os analitos no LIQ e de até 5% das áreas obtidas para o padrão interno no LIQ.

4.2.3.5.3 Efeito matriz

Para a avaliação do efeito matriz, foram preparadas oito amostras de plasma branco de fontes diferentes, sendo quatro normais, duas hemolisadas e duas lipêmicas, em duplicata. As amostras foram ressuspensas com soluções padrão dos analitos no CQB e no CQA, de forma que todas as fontes foram avaliadas nos dois níveis de concentração. As soluções no CQB e no CQA foram injetadas no cromatógrafo, bem como as amostras de plasma branco ressuspensas com as mesmas soluções.

Os fatores de matriz normalizados (FMN) foram calculados para todas as fontes de plasma avaliadas, de acordo com a equação a seguir:

$$FMN = \frac{A_{PA}/A_{PI} (amostra)}{A_{analito}/A_{PI} (solução)}$$

Em que:

$A_{PA}/A_{PI} (amostra)$ = razão da área do pico do analito pela área do pico do padrão interno, obtida com a amostra de plasma branco extraída e posteriormente ressuspensa com a solução no CQB ou no CQA.

$A_{PA}/A_{PI} (solução)$ = razão da área do pico do analito pela área do pico do padrão interno, obtida com a solução no CQB ou no CQA.

Em seguida, calcularam-se os desvios padrões relativos (DPR) dos fatores de matriz normalizados. Para que o efeito matriz não prejudicasse a confiabilidade das análises realizadas com o método por CLAE-EM/EM, os valores de DPR deveriam ser de no máximo 15%.

4.2.3.5.4 Linearidade

O ensaio para a avaliação da linearidade do método bioanalítico foi realizado analisando-se amostras branco (sem os analitos e o padrão interno), zero (sem os analitos, mas com o padrão interno) e de calibração em oito níveis de concentração, incluindo o LIQ e o LSQ, em duplicata, em três dias diferentes. Após a injeção das amostras e o processamento dos resultados, construíram-se curvas analíticas para todos os analitos. Utilizaram-se como respostas as razões das áreas dos picos dos analitos pelas áreas do pico do padrão interno. Avaliou-se a necessidade de ponderação, no caso de heterocedasticidade, e o modelo matemático obtido. Para que os padrões de calibração fossem considerados aprovados, os valores de exatidão deveriam estar entre 80% e 120%, no LIQ, e entre 85% e 115% nos demais níveis.

As amostras de calibração foram preparadas pela adição das soluções de trabalho ou das soluções estoque a um *pool* de plasma branco. As concentrações das amostras de calibração são apresentadas na **Tabela 15**.

Tabela 15 – Concentrações dos analitos nas amostras de plasma para a avaliação da linearidade do método bioanalítico.

Nível	Concentração (ng/mL)								
	CVD	ESP	LOS	ATV	VPM	VAL	ANL	DTZ	VAR
1 (LIQ)	5,0	2,0	2,0	5,0	2,0	25,0	1,0	2,0	25,0
2	10,0	5,0	5,0	10,0	5,0	50,0	2,5	5,0	50,0
3	25,0	10,0	10,0	25,0	10,0	100,0	5,0	10,0	100,0
4	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	250,0	10,0	50,0	250,0
5	75,0	100,0	100,0	75,0	100,0	500,0	25,0	100,0	500,0
6	100,0	250,0	250,0	100,0	250,0	1000,0	50,0	250,0	1000,0
7	250,0	500,0	500,0	175,0	500,0	1500,0	75,0	500,0	1500,0
8 (LSQ)	500,0	1000,0	1000,0	250,0	1000,0	2000,0	100,0	1000,0	2000,0

LIQ, limite inferior de quantificação; LSQ, limite superior de quantificação; CVD, carvedilol; ESP, espironolactona; LOS, losartana; ATV, atorvastatina; VPM, verapamil; VAL, valsartana; ANL, anlodipino; DTZ, diltiazem; VAR, varfarina.

4.2.3.5.5 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação para os analitos foram estabelecidos pela injeção de amostras que levassem à obtenção de razões S/R igual a 3 e a 10, respectivamente. As concentrações obtidas para os limites de quantificação dos analitos foi empregada como limite inferior de quantificação (LIQ) na curva analítica.

4.2.3.5.6 Precisão e exatidão

O ensaio para a avaliação da precisão e da exatidão do método foi realizado analisando-se cinco réplicas de amostras de controle de qualidade em quatro níveis de concentração, representados por CQLIQ, CQB, CQM e CQA, em três dias diferentes, de forma a se avaliar a precisão e a exatidão intracorrida e intercorridas. Para VAL e VAR, também foram analisadas amostras de CQD. Para que o método fosse considerado exato, os valores de exatidão deveriam estar entre 80% e 120%, para as amostras de CQLIQ, e entre 85% e 115% para as demais amostras de controle de qualidade. O método foi considerado preciso quando os valores de DPR foram de no máximo 20%, para o CQLIQ, e de no máximo 15% para as demais amostras de controle de qualidade.

As amostras de controle de qualidade foram preparados pela adição das soluções de trabalho ou das soluções estoque a um *pool* de plasma branco. As concentrações das amostras de controle de qualidade são apresentadas na **Tabela 16**.

Tabela 16 – Concentrações dos analitos nas amostras de plasma para a avaliação da precisão e exatidão do método bioanalítico.

Nível	Concentração (ng/mL)								
	CVD	ESP	LOS	ATV	VPM	VAL	ANL	DTZ	VAR
CQLIQ	5,0	2,0	2,0	5,0	2,0	25,0	1,0	2,0	25,0
CQB	15,0	6,0	6,0	15,0	6,0	75,0	3,0	6,0	75,0
CQM	250,0	500,0	500,0	125,0	500,0	1000,0	50,0	500,0	1000,0
CQA	400,0	750,0	750,0	200,0	750,0	1700,0	80,0	750,0	1700,0
CQD	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	6000,0	n.a.	n.a.	3000,0

CQLIQ, controle de qualidade do limite inferior de quantificação; CQB, controle de qualidade de baixa concentração; CQM, controle de qualidade de média concentração; CQA, controle de qualidade de alta concentração; CQD, controle de qualidade de diluição; n.a., não se aplica; CVD, carvedilol; ESP, espirolactona; LOS, losartana; ATV, atorvastatina; VPM, verapamil; VAL, valsartana; ANL, anlodipino; DTZ, diltiazem; VAR, varfarina.

4.2.3.5.7 Recuperação

O ensaio para a avaliação da recuperação do método foi realizado analisando-se amostras de controle de qualidade (CQB, CQM e CQA) e amostras de plasma branco. As amostras de plasma branco foram extraídas empregando-se o mesmo procedimento aplicado às amostras de controle de qualidade. Ao final da análise, ao invés de se utilizar diluente, essas amostras foram ressuspensas com soluções

contendo os analitos nas concentrações do CQB, do CQM e do CQA. Para o cálculo das recuperações do método empregou-se a equação a seguir.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Área do pico do analito}_{CQ}}{\text{Área do pico do analito}_{SE}} \times 100$$

Em que:

$\text{Área do pico do analito}_{CQ}$ = área do pico do analito nas amostras de controle de qualidade.

$\text{Área do pico do analito}_{SE}$ = área do pico do analito nas amostras de plasma branco extraídas e ressuspensas com soluções nas concentrações dos controles de qualidade.

4.2.3.5.8 Estabilidade dos analitos na matriz biológica

O ensaio para a avaliação da estabilidade dos analitos na matriz biológica foi realizado analisando-se três amostras de CQB e de CQA submetidas a diferentes condições, como descrito a seguir.

A estabilidade de curta duração (ECD) foi avaliada deixando-se as amostras em bancada por quatro horas. A estabilidade pós-processamento foi avaliada reinjetando-se amostras previamente extraídas e que haviam permanecido no injetor do cromatógrafo a 6 °C por 24 horas. A estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento foi avaliada após três ciclos. As amostras foram congeladas em ultrafreezer a -70 °C e descongeladas à temperatura ambiente (25 °C). Para que os analitos fossem considerados estáveis, os valores de exatidão deveriam estar entre 85% e 115%.

A estabilidade de longa duração (ELD) foi avaliada armazenando-se amostras em ultrafreezer a -70 °C durante 30 dias. Após esse período, as amostras foram extraídas e analisadas. Os analitos foram considerados estáveis na matriz biológica nas condições avaliadas se os valores de exatidão estivessem entre 85% e 115%.

4.2.3.6 Aplicação do método bioanalítico

O método bioanalítico foi aplicado a 20 amostras de pacientes que faziam uso de medicamentos anti-hipertensivos e hipocolesterolemiantes, entre eles carvedilol, losartana, anlodipino, diltiazem, atorvastatina e varfarina. Estas informações foram obtidas por meio de questionário aplicado aos voluntários participantes da pesquisa. As análises foram realizadas em triplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção de irbesartana a partir de comprimidos comerciais e sua caracterização

Após a extração, foram obtidos 1000 mg de um sólido de coloração amarela clara, que foi submetido à recristalização. Após esta etapa, foram obtidos 585 mg de um sólido branco, com 39% de rendimento da extração.

5.1.1 Caracterização da substância obtida na extração

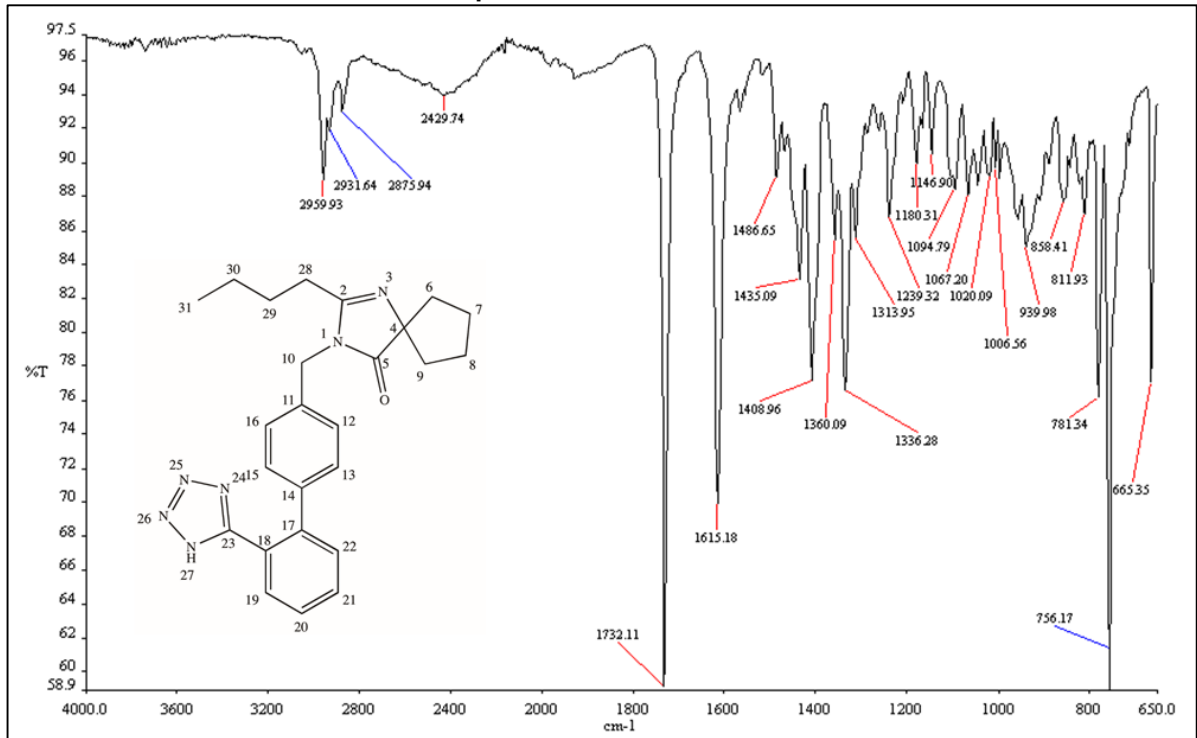
5.1.1.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A irbesartana apresentou boa eluição na placa cromatográfica, apresentando mancha intensa. Não foram observadas manchas secundárias com os três reveladores utilizados, o que sugere que a substância obtida possui pureza adequada.

5.1.1.2 Espectroscopia de absorção no infravermelho

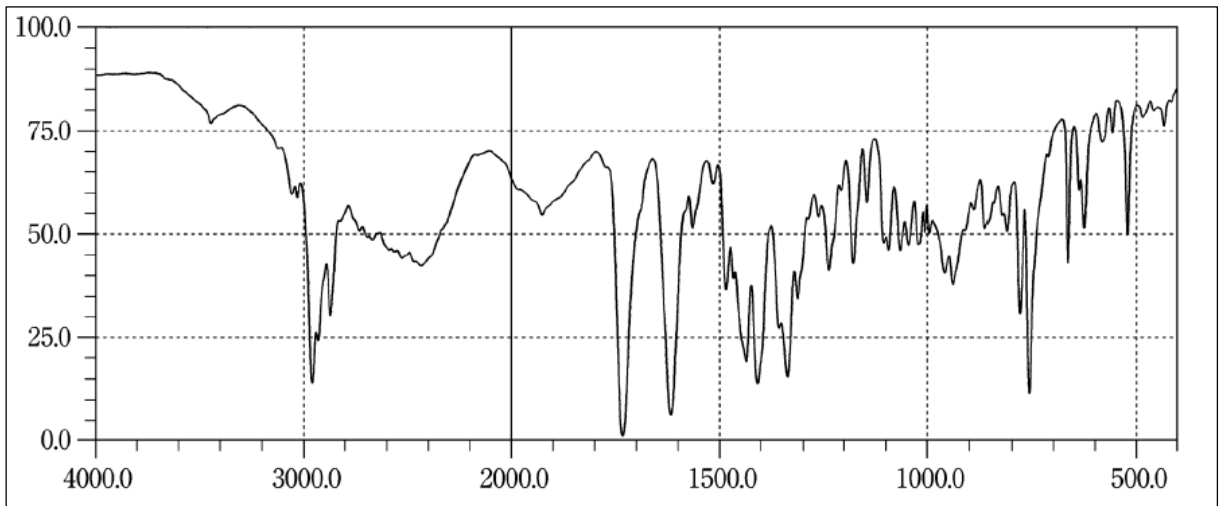
O espectro de absorção no infravermelho da substância obtida na extração (**Figura 7**) apresentou as principais bandas esperadas para a estrutura molecular da irbesartana, em 2959 cm^{-1} e 2931 cm^{-1} ($\nu\text{C-H}$ de alcano); 1732 cm^{-1} ($\nu\text{C=O}$ de carbonila lactâmica); 1615 cm^{-1} ($\nu\text{C=N}$); 1435 cm^{-1} ($\delta\text{C-H}$ de CH_2); 1360 cm^{-1} ($\delta\text{C-H}$ de CH_3) e 756 cm^{-1} ($\delta\text{C-H}$ de anel aromático) (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001; Franca *et al.*, 2009).

Figura 7 – Espectro de absorção no infravermelho da substância obtida na extração dos comprimidos de irbesartana.



As bandas de absorção obtidas para a substância foram comparadas com as obtidas em trabalho publicado anteriormente (FRANCA *et al.*, 2009). Além disso, o espectro de absorção no infravermelho da substância foi comparado com o espectro padrão de irbesartana (**Figura 8**), disponível na Farmacopeia Japonesa 17^a edição (JAPANESE, 2016).

Figura 8 – Espectro padrão da irbesartana, disponível na Farmacopeia Japonesa 17^a edição (JAPANESE, 2016), obtido por meio da preparação de pastilha de KBr, na faixa de número de ondas de 4000 a 400 cm⁻¹.

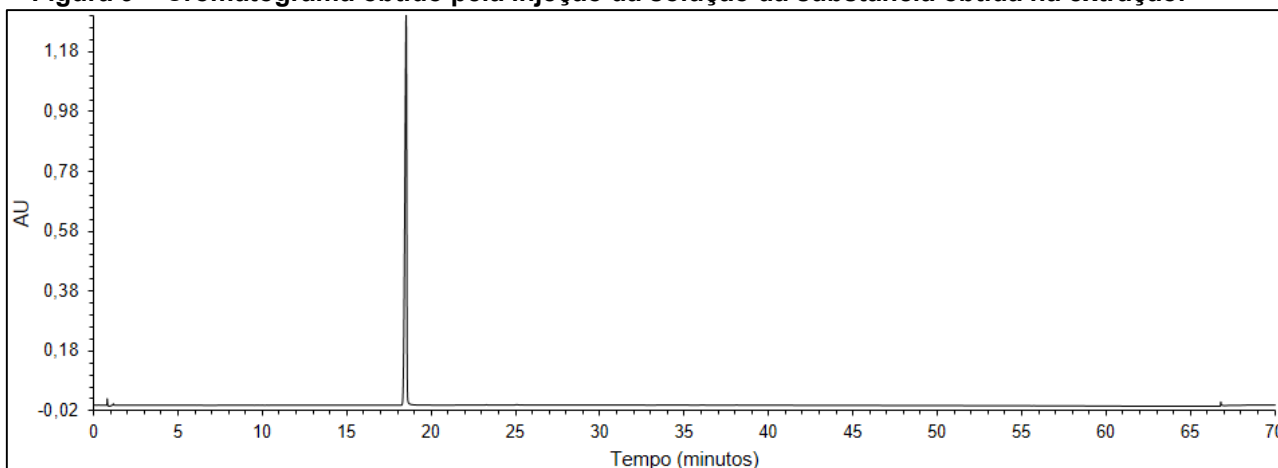


Embora o espectro padrão de irbesartana tenha sido obtido por meio da preparação de pastilhas contendo brometo de potássio, pode-se observar a presença de algumas bandas de absorção nos dois espectros, como 2960, 2430, 1732, 1615, 1435, 1408, 1336, 1180 e 756 cm^{-1} . Além disso, é possível observar nos espectros a sobreposição das bandas de absorção. Considerando-se que é pouco provável que duas substâncias diferentes apresentem espectros de infravermelho iguais e que o espectro de absorção no infravermelho pode ser considerado uma impressão digital molecular (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001), consideraram-se estes resultados uma evidência de que a substância obtida na extração se tratava da irbesartana.

5.1.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

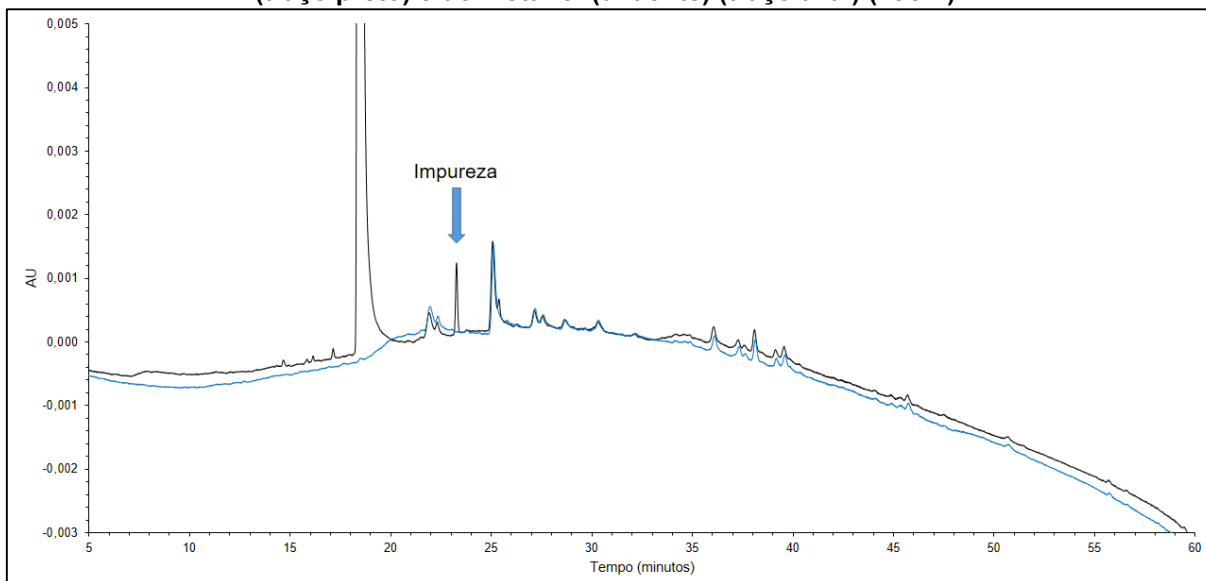
O cromatograma obtido a partir da injeção da solução da substância obtida na extração é apresentado na **Figura 9**.

Figura 9 – Cromatograma obtido pela injeção da solução da substância obtida na extração.



É possível observar no cromatograma a presença de apenas um pico principal, referente à substância. A **Figura 10** apresenta a sobreposição dos cromatogramas obtidos com a solução da substância obtida na extração com o cromatograma obtido com o metanol utilizado como diluente.

Figura 10 – Sobreposição dos cromatogramas da solução da substância obtida na extração (traço preto) e do metanol (diluyente) (traço azul) (zoom).



É possível observar, na sobreposição dos cromatogramas, que a maioria dos picos minoritários são provenientes do metanol. Apenas um pequeno pico, apontado pela seta, possivelmente corresponde à uma impureza presente na substância extraída e purificada, já que não aparece no cromatograma do metanol. Ao se integrar os picos das impurezas e da substância obtida na extração, obteve-se a porcentagem da área correspondente à substância obtida, que foi de 99,9% nas condições de análise, sugerindo que esta foi obtida com alto grau de pureza.

5.1.1.4 Determinação do ponto de fusão

Obteve-se faixa de fusão de 184,7 °C a 185,7 °C para o pó analisado. O ponto de fusão da irbesartana é de 180 – 181 °C (O'NEIL, 2006). Essa variação pode ter ocorrido devido à utilização de métodos diferentes para a determinação do ponto de fusão, já que não se conhece o método utilizado para a determinação do valor reportado acima. Entretanto, a faixa de fusão obtida pode fornecer informações sobre a pureza de uma substância (FESSENDEN; FESSENDEN; FEIST, 2000).

Uma substância possui faixa de fusão estreita se a variação de temperatura entre o início e o final da fusão for de, no máximo, 5 °C. Substâncias puras possuem faixas de fusão estreitas, ao passo que substâncias impuras possuem faixas de fusão

amplas (FESSENDEN; FESSENDEN; FEIST, 2000). Portanto, a faixa de fusão obtida pode ser considerada estreita, sendo condizente com uma substância pura.

5.1.1.5 Ressonância magnética nuclear de ^1H , ^{13}C e DEPT 135

Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e subespectro DEPT 135 da substância obtida são apresentados na **Figura 11** (pág. 103) e na **Figura 12** (pág. 104), respectivamente. As atribuições dos sinais do espectro de RMN de ^1H são apresentadas na **Tabela 17** (pág. 105), enquanto as atribuições dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C são apresentadas na **Tabela 18** (pág. 105).

É possível observar uma diferença nos valores de deslocamento químico entre os sinais do espectro de RMN de ^1H obtido para a substância recristalizada (**Tabela 17**) e os reportados na literatura (BAUER *et al*, 1998). Essa diferença foi atribuída ao fato dos sinais obtidos por Bauer e colaboradores (1998) terem sido calibrados em relação ao tetrametilsilano (TMS), ao passo que os obtidos neste trabalho foram calibrados em relação ao próprio solvente utilizado. A partir da atribuição dos sinais e da comparação dos valores dos deslocamentos químicos dos espectros de ^{13}C para a substância obtida com os relatados na literatura para a irbesartana, foi possível confirmar que o sólido branco obtido na recristalização se tratava da irbesartana. Além disso, estes resultados, aliados aos obtidos com os demais testes de caracterização, permitem afirmar que a irbesartana foi obtida com alto grau de pureza.

Figura 11 – Espectro de RMN de ^1H da substância extraída e purificada.

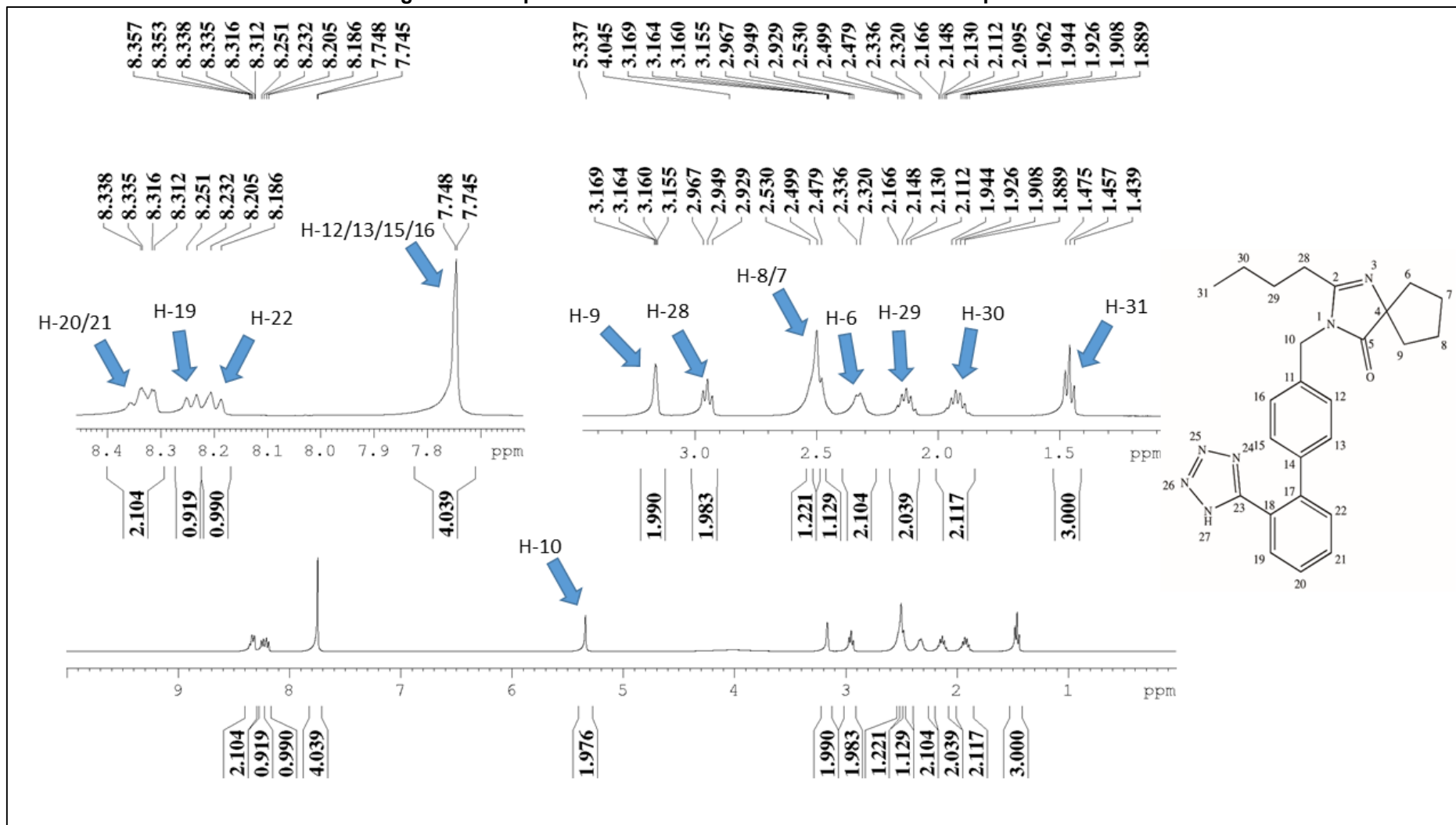


Figura 12 – Espectros de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135 obtidos para a substância extraída e purificada.

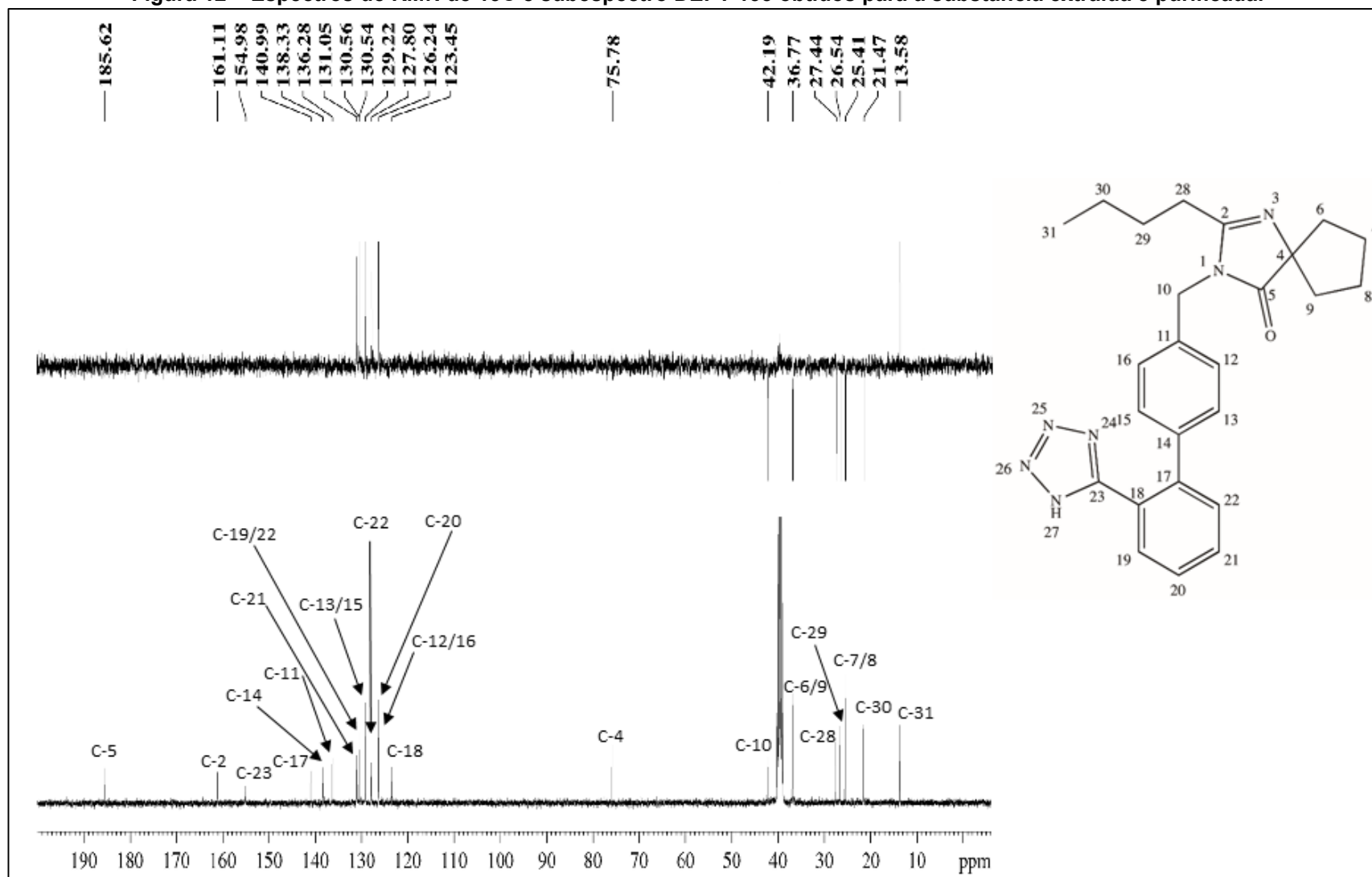


Tabela 17 – Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ¹H da substância extraída e purificada.

H	δ (ppm)	m	J (Hz)	δ(ppm) (BAUER et al., 1998)
6	2,3361 – 2,3197	m	-	1,64-1,83
7 e 8	2,5300 – 2,4792	m	-	1,83
9	3,1688 – 3,1554	m	-	1,64-1,83
10	5,3369	s	-	4,66
12, 13, 15 e 16	7,7483 – 7,7449	m	-	7,08
19	8,2417	d	7,52	7,65
20 e 21	8,3571 – 8,3116	m	-	7,56 -7,66
22	8,1957	d	-	7,52
28	2,9486	t	7,69	2,27
29	2,1299	quint.	7,42	1,46
30	1,9170	sext.	7,20	1,25
31	1,4566	t	7,17	0,79

m = multipeto; d=dupeto; t = tripeto; quint.= quinteto; sext.= sexteto.

Tabela 18 – Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ¹³C da substância extraída e purificada.

C		δ (ppm)	δ (ppm) (BAUER et al., 1998)
2	(C)	161,11	161,00
4	(C)	75,78	75,70
5	(CO)	185,62	185,60
7 e 8	(CH)	25,41	25,40
6 e 9	(CH)	36,77	36,70
10	(CH ₂)	42,19	42,20
11	(C)	136,28	136,70
12 e 16	(CH)	126,23	126,20
13 e 15	(CH)	129,22	129,20
14	(C)	138,33	138,30
17	(C)	140,99	141,00
18	(C)	123,45	123,40
19	(CH)	130,56	130,50
20	(CH)	127,80	127,70
21	(CH)	131,05	131,00
22	(CH)	130,54	130,50
23	(C)	154,98	155,00
28	(CH ₂)	27,44	27,40
29	(CH ₂)	26,54	26,50
30	(CH ₂)	21,47	21,40
31	(CH ₃)	13,58	13,50

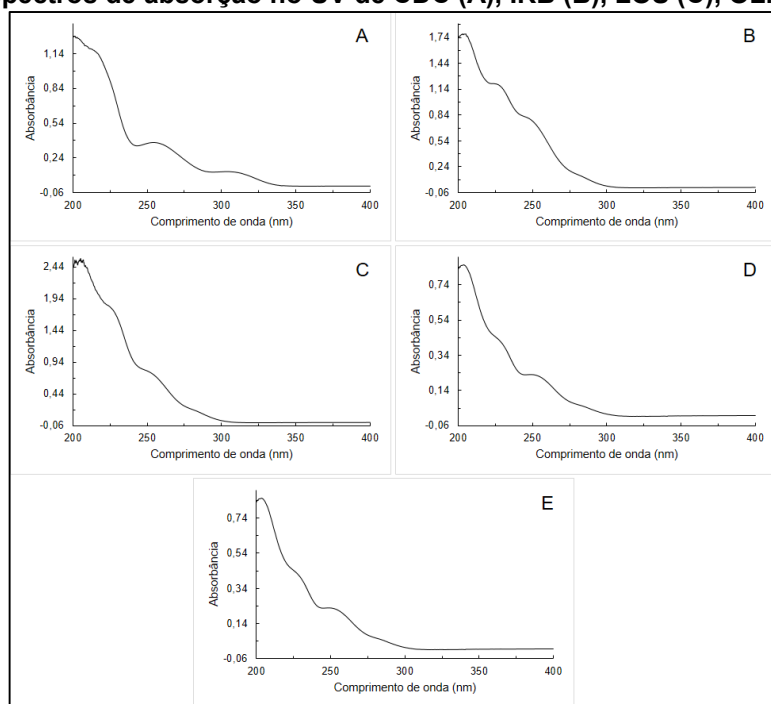
5.2 Método bioanalítico para determinação de olmesartana, irbesartana, losartana e valsartana em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (CLAE-FL)

5.2.1 Determinação dos comprimentos de onda de excitação e emissão para detecção dos fármacos por fluorescência

A presença de grupos fluoróforos nas moléculas de fármacos antagonistas dos receptores de angiotensina II, como os grupos bifenil, imidazol e benzimidazol, permite a determinação desses analitos empregando-se a detecção por fluorescência (CAGIGAL *et al.*, 2001), mais seletiva e sensível do que a detecção por UV. Por isso, optou-se por empregar detecção por fluorescência para a determinação desses analitos.

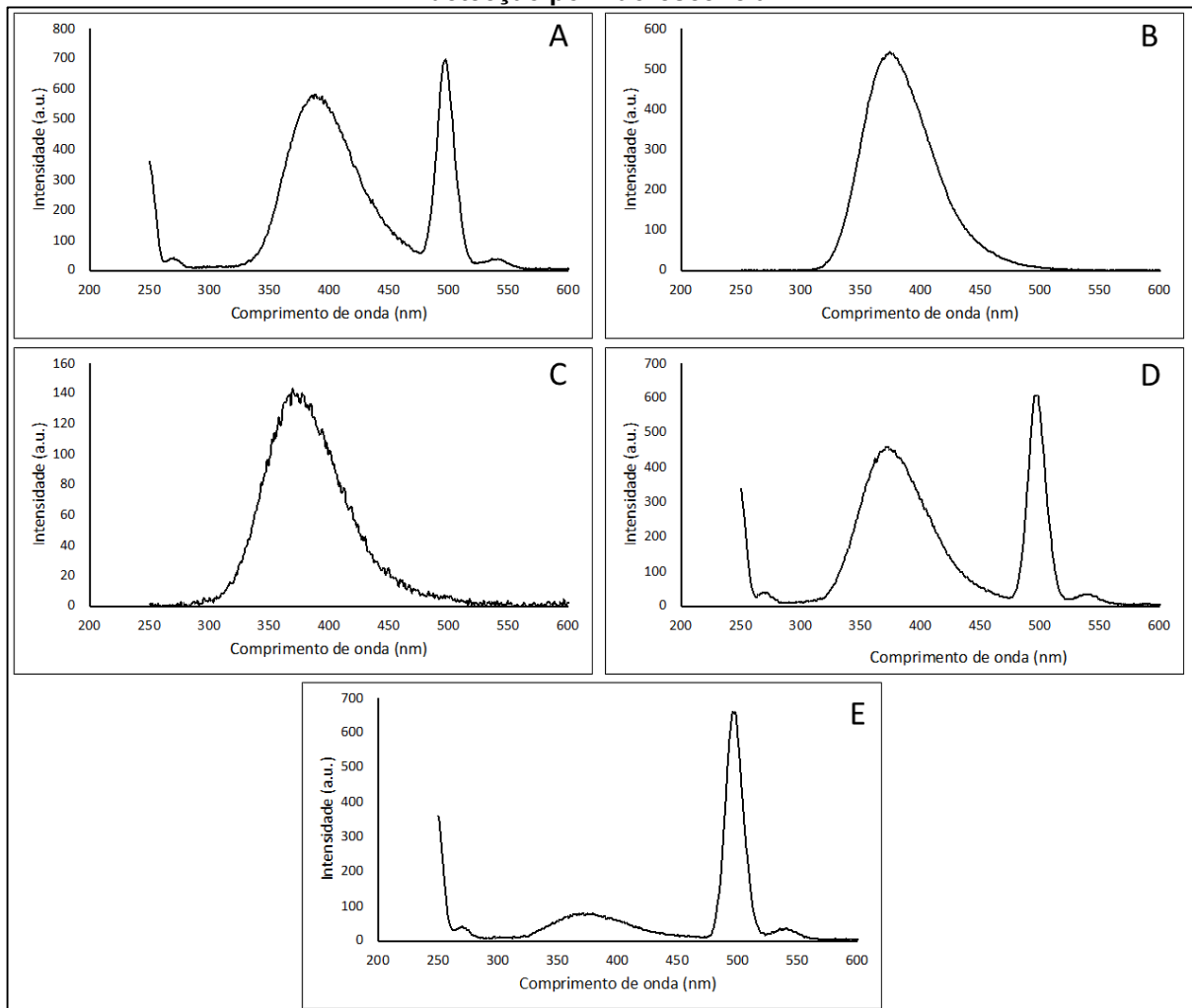
Analisando-se os espectros de absorção no ultravioleta, é possível observar que CDC, IRB, LOS, OLM e VAL apresentaram máximos de absorção próximos de 260 nm. Dessa forma, esse comprimento de onda foi selecionado para a obtenção dos espectros de emissão para a detecção por fluorescência. Os espectros de absorção dos fármacos no ultravioleta são apresentados na **Figura 13**.

Figura 13 - Espectros de absorção no UV de CDC (A), IRB (B), LOS (C), OLM (D) e VAL (E).



Os espectros de emissão dos fármacos são apresentados na **Figura 14**.

Figura 14 – Espectros de emissão de CDC (A), IRB (B), LOS (C), OLM (D) e VAL (E) para detecção por fluorescência.



Analisando-se os espectros de emissão dos fármacos, pode-se observar que todos os fármacos apresentam máximo de emissão por volta de 370 nm. Dessa forma, selecionou-se esse comprimento de onda para a detecção dos fármacos por fluorescência. Esses resultados são próximos aos encontrados na literatura (CHANG *et al.*, 1997; FARTHING *et al.*, 1997; YOSHIHARA *et al.*, 2005).

5.2.2 Otimização das condições cromatográficas

Ao se testar eluição isocrática para tentar separar os analitos, observou-se a coeluição de OLM e IRB com retenção mínima e o tempo de corrida foi muito longo para se

conseguir eluir a CDC. Além disso, como o método seria empregado para a análise dos fármacos em amostras de plasma, seria interessante desenvolver um método por gradiente para a separação de possíveis picos interferentes da amostra dos picos dos analitos.

Após a otimização do gradiente para a separação dos fármacos empregando-se metanol e ácido fórmico na fase móvel, obteve-se método com tempo de corrida de 5 minutos para a separação dos fármacos. Entretanto, observou-se efeito residual para a irbesartana, ainda que o gradiente contemplasse uma etapa com 100% de metanol para a limpeza da coluna.

O uso de acetonitrila como modificador orgânico na fase móvel proporcionou melhores resultados para os parâmetros de adequabilidade do sistema e de detectabilidade para a determinação dos analitos. Além disso, por possuir maior força eluente do que o metanol em cromatografia de fase reversa, a ACN foi utilizada para resolver o problema de efeito residual observado para a irbesartana. Alguns gradientes foram testados, tendo sido o gradiente apresentado na **Tabela 19** o melhor para a separação dos cinco fármacos em um tempo de corrida adequado.

Tabela 19 – Gradiente otimizado para a determinação de CDC, IRB, LOS, OLM e VAL por CLAE-FL empregando coluna Waters Symmetry C₁₈. A, ácido fórmico 0,1% (v/v); B, acetonitrila.

Tempo (minutos)	A (%)	B (%)
0	70	30
3	0	100
4	0	100
5	70	30
7	70	30

Em seguida, selecionou-se a melhor fase aquosa para a separação cromatográfica dos analitos. Os resultados dos parâmetros de adequabilidade do sistema e de detectabilidade referentes aos picos dos analitos testados são apresentados na **Tabela 20**.

Tabela 20 – Parâmetros de adequabilidade do sistema e de detectabilidade para a separação cromatográfica de CDC, IRB, LOS, OLM e VAL por CLAE-FL usando diferentes fases móveis aquosas e acetonitrila como modificador orgânico.

Parâmetro	CDC	IRB	Analito		
			LOS	OLM	VAL
Ácido acético 0,1%					
N	7,66 x 10 ⁴	2,35 x 10 ⁴	2,82 x 10 ⁴	2,89 x 10 ⁴	4,40 x 10 ⁴
T	1,16	1,29	1,22	1,28	1,16
S/R	890	1102	880	585	904
Ácido fórmico 0,1%					
N	7,71 x 10 ⁴	2,42 x 10 ⁴	2,96 x 10 ⁴	3,04 x 10 ³	4,49 x 10 ⁴
T	1,14	1,16	1,18	1,27	1,14
S/R	921	1187	907	595	915
Trietilamina 0,1% pH 3,0 (ajustado com ácido fosfórico)					
N	7,76 x 10 ⁴	3,28 x 10 ⁴	3,41 x 10 ⁴	3,50 x 10 ³	4,55 x 10 ⁴
T	1,13	1,17	1,16	1,25	1,16
S/R	672	672	728	435	675
Ácido trifluoroacético (TFA) 0,05%					
N	7,83 x 10 ⁴	2,26 x 10 ⁴	2,36 x 10 ⁴	3,10 x 10 ³	4,61 x 10 ⁴
T	1,14	1,25	1,20	1,27	1,17
S/R	999	1412	1019	667	1019
Ácido fosfórico 0,1%					
N	7,92 x 10 ⁴	2,98 x 10 ⁴	2,97 x 10 ⁴	3,30 x 10 ³	4,58 x 10 ⁴
T	1,13	1,16	1,15	1,24	1,15
S/R	1083	1625	1297	990	1253

CDC, candesartana cilexetila; IRB, irbesartana; LOS, losartana; OLM, olmesartana; VAL, valsartana; N, número de pratos; T, fator de cauda; S/R, razão sinal-ruído.

A fase aquosa contendo ácido fosfórico proporcionou maiores razões sinal/ruído para todos os fármacos, apesar de esses valores não terem sido muito superiores aos obtidos quando se empregou TFA. Esses resultados são corroborados pelos obtidos por El-Shaboury e colaboradores (2012), que avaliaram a intensidade de emissão de fluorescência de fármacos antagonistas dos receptores de angiotensina II dissolvidos em diferentes soluções aquosas. Embora eles tenham avaliado apenas um ácido orgânico (ácido acético), maiores intensidades de emissão foram obtidas quando se utilizou solução de ácido fosfórico. A fase aquosa contendo ácido fosfórico proporcionou, ainda, resultados adequados de número de pratos e fator de cauda para todos os fármacos, levando à obtenção de picos finos e simétricos. Além disso, por ser um ácido mais forte, a solução de TFA possui pH mais baixo, o que poderia diminuir o tempo de vida útil da coluna cromatográfica. Assim, optou-se por empregar a

solução de ácido fosfórico 0,1% (v/v) para prosseguir com o desenvolvimento do método.

Testes realizados com amostras de plasma contendo os analitos demonstraram que picos interferentes provenientes de substâncias endógenas da matriz biológica coeluíam com os picos dos analitos. Foram realizadas tentativas de separar os picos de interesse dos picos interferentes, porém sem sucesso. Dessa forma, outras colunas cromatográficas com fases estacionárias diferentes (C₈ e CN) foram avaliadas. A coluna ciano apresentou resolução adequada entre os picos dos analitos e os dos interferentes. Por isso, essa coluna foi selecionada para prosseguir com o desenvolvimento do método.

Como se observaram picos interferentes no tempo de retenção de CDC, foi necessário alterar o comprimento de onda de emissão durante a corrida cromatográfica. Dessa forma, o comprimento de onda de emissão foi de 370 nm até 8 minutos de corrida e de 410 nm após esse tempo.

As condições cromatográficas otimizadas e o gradiente que proporcionou os melhores resultados são apresentados na **Tabela 21** e na **Tabela 22**, respectivamente.

Tabela 21 - Condições cromatográficas otimizadas para a determinação de CDC, IRB, LOS, OLM e VAL por CLAE-FL.

Parâmetros	Condições
Fase móvel	Ácido fosfórico 0,1% (v/v) em água (A) e acetonitrila (B)
Vazão de fase móvel	1,2 mL/min
Coluna	Luna ciano 250 mm x 4,6 mm 5 µm
Temperatura da coluna	30 °C
Volume de injeção	80 µL
Limpeza da agulha (injetor)	Acetonitrila (2 ciclos de 26 segundos)
Tempo de corrida	13 minutos
Comprimento de onda de excitação	260 nm
Comprimento de onda de emissão	370 nm (de 0,00 a 8,00 minutos) 410 nm (de 8,01 a 13,00 minutos)
Frequência de aquisição	5 pontos por segundo

Tabela 22 – Gradiente otimizado para a determinação de CDC, IRB, LOS, OLM e VAL por CLAE-FL empregando-se coluna Luna ciano.

Tempo (minutos)	A (%)	B (%)
0,0	80,0	20,0
6,0	42,5	57,5
7,0	32,0	68,0

Tabela 22 – Gradiente otimizado para a determinação de CDC, IRB, LOS, OLM e VAL por CLAE–FL empregando-se coluna Luna ciano (continuação).

Tempo (minutos)	A (%)	B (%)
8,0	0,0	100,0
9,5	0,0	100,0
10,5	80,0	20,0
13,0	80,0	20,0

Com a finalidade de se aumentar a detectabilidade do método, optou-se por injetar 80 µL de amostra. Porém, como pode ser observado nos cromatogramas (Figura 15, pág. 112), os formatos dos picos são adequados. Nenhum alargamento de banda foi observado com este volume de injeção.

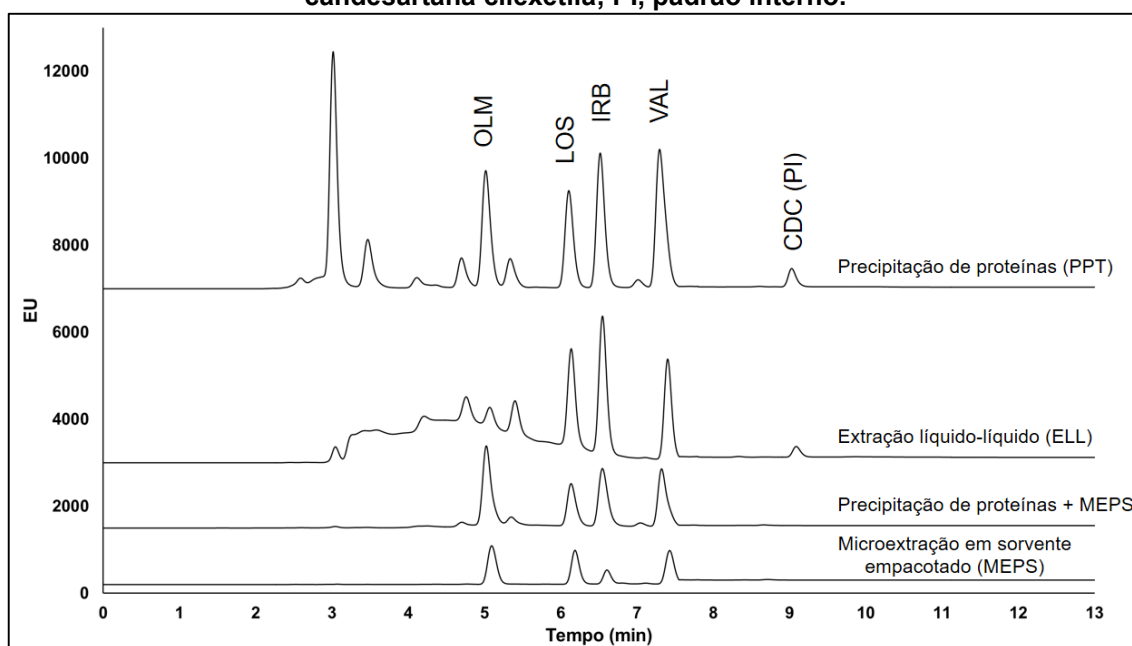
5.2.3 Preparo de amostra

Inicialmente, a MEPS foi avaliada para a extração de OLM, LOS, IRB e VAL das amostras de plasma. A MEPS é uma microtécnica com potencial para desenvolvimento de métodos com reduzido volume de amostra e solventes. Porém, nas condições empregadas neste estudo, baixas recuperações foram observadas para os analitos, possivelmente porque esses fármacos apresentam altas taxas de ligação a proteínas plasmáticas, sendo pouco extraídos pelo sorvente C₁₈. Além disso, os cartuchos de MEPS apresentaram tempo de vida útil curto, sendo possível a extração de menos de 20 amostras de plasma.

Com o objetivo de melhorar as recuperações dos analitos e estender o tempo de vida útil dos cartuchos de MEPS, uma etapa de precipitação de proteínas utilizando-se ACN como solvente precipitante foi introduzida antes da MEPS, que foi realizada a partir do sobrenadante da precipitação de proteínas. Entretanto, recuperações muito baixas ainda foram observadas para todos os analitos, possivelmente porque o sobrenadante da PPT continha uma alta porcentagem de solvente orgânico, afetando a extração dos analitos pelo cartucho C₁₈. Para aumentar a recuperação, o sobrenadante foi evaporado e o resíduo ressuspendido com uma solução tampão citrato 0,1 mol/L pH 3,8, já que neste pH OLM, LOS, IRB, VAL e CDC (PI) possuem valores elevados de log D (CHEMAXON, 2020) e, conseqüentemente, apresentam lipofilicidade adequada para serem extraídos pelo sorvente C₁₈.

A **Figura 15** apresenta os cromatogramas sobrepostos para a comparação das diferentes técnicas de preparo de amostra avaliadas neste estudo (MEPS, MEPS + PPT, ELL e PPT). As amostras utilizadas em cada uma das técnicas foram fortificadas com os analitos na mesma concentração (100 ng/mL), para possibilitar a comparação apresentada nos cromatogramas.

Figura 15 – Cromatogramas sobrepostos, obtidos pela análise de amostras de plasma adicionadas dos analitos no CQM, com as diferentes técnicas de preparo de amostras (MEPS, ELL e PPT). OLM, olmesartana; LOS, losartana; IRB, irbesartana; VAL, valsartana; CDC, candesartana cilexetila; PI, padrão interno.



Como pode ser observado, as alturas dos picos dos analitos obtidas com MEPS são muito menores do que as obtidas com a PPT e a ELL, com exceção de OLM, para a qual a MEPS foi melhor do que a ELL. O pico de CDC não foi observado nos cromatogramas obtidos com MEPS (MEPS e MEPS + PPT). A CDC ($\log D > 6,2$ em toda a faixa de pH) é mais lipofílica do que OLM, IRB, VAL e LOS (CHEMAXON, 2020). Portanto, a CDC pode ter permanecido retida no cartucho C_{18} , não tendo sido eluída nas condições empregadas para a dessorção dos analitos do cartucho (4 ciclos de MeOH:ACN 60:40, v/v, com 1% de hidróxido de amônio). Após a introdução da etapa de PPT antes da MEPS, melhores recuperações para OLM, IRB, LOS e VAL foram obtidas (**Tabela 23**). Entretanto, a MEPS não trouxe benefícios em relação à seletividade e à detectabilidade do método. Além disso, o procedimento para a MEPS demonstrou ser muito mais trabalhoso, demorado e caro do que a ELL e a PPT.

Tabela 23 – Resultados de recuperação obtidos para PPT + MEPS durante experimentos preliminares.

Réplica	Recuperação (%)			
	OLM	IRB	LOS	VAL
1	13,57	29,59	81,49	18,63
2	14,95	35,03	93,36	21,14
3	13,73	29,47	84,84	19,29
Média	14,09	31,36	86,57	19,69
Desvio padrão	0,76	3,18	6,12	1,30
DPR %	5,38	10,13	7,07	19,29

PPT, precipitação de proteínas; MEPS, microextração em sorvente empacotado; OLM, olmesartana; IRB, irbesartana; LOS, losartana; VAL, valsartana; DPR, desvio padrão relativo.

Sendo assim, a ELL e a PPT foram consideradas para o preparo das amostras. A ELL foi realizada utilizando-se acetato de etila, metil terc-butil éter (MTBE), diclorometano, hexano e uma mistura de acetato de etila, MTBE e diclorometano (4:3:3, v/v/v) como solventes extratores. A ELL proporcionou resultados adequados para seletividade e recuperações adequadas para todos os analitos, com exceção da OLM em todas as condições testadas. Os resultados obtidos para a ELL são apresentados na **Tabela 24**.

Tabela 24 – Resultados de recuperação obtidos para a extração líquido-líquido (ELL) durante experimentos preliminares.

Solvente	Recuperação (%) (DPR%) (n = 3)			
	Olmesartana	Irbesartana	Losartana	Valsartana
Acetato de etila	32,72 (4,49%)	61,67 (5,23%)	63,24 (3,98%)	60,94 (4,36%)
Metil tert-butil éter (MTBE)	12,17 (8,91%)	92,79 (5,12%)	90,59 (4,32%)	57,03 (5,23%)
Diclorometano	5,57 (9,77%)	50,23 (7,25%)	46,01 (8,02%)	43,20 (8,88%)
Hexano	0,00 (n.a.)	0,58 (10,85%)	0,30 (13,35%)	2,68 (12,23%)
Acetato de etila, MTBE e diclorometano (4:3:3, v/v/v)	35,18 (5,27%)	70,04 (4,01%)	69,98 (3,32%)	74,07 (2,86%)

DPR, desvio padrão relativo; n.a., não se aplica (não foi possível calcular esses resultados).

A PPT foi avaliada utilizando-se diferentes solventes orgânicos (MeOH, acetona e ACN, puros, acidificados com ácido fórmico e alcalinizados com hidróxido de amônio) como precipitantes. A PPT com ACN pura apresentou os melhores resultados para seletividade e recuperação (**Tabela 25**). Além disso, as recuperações de OLM na ELL foram inferiores às obtidas com a PPT. De forma geral, as recuperações obtidas para OLM com a PPT foram maiores do que as apresentadas na literatura (KUMAR; DWIVEDI; PRASAD, 2019). Além disso, a PPT se mostrou seletiva, simples, rápida e

de baixo custo. Portanto, a PPT foi escolhida para a extração dos fármacos das amostras de plasma e foi otimizada por planejamento fatorial em dois níveis.

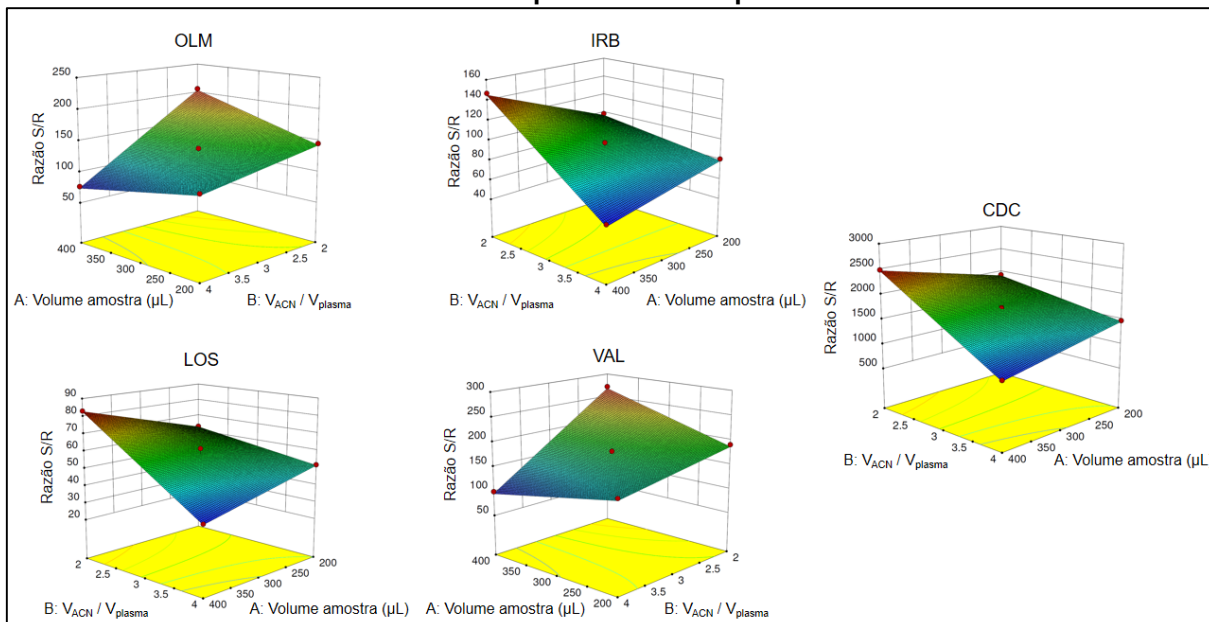
Tabela 25 – Resultados de recuperação obtidos para a precipitação de proteínas durante experimentos preliminares.

Condição	Recuperação (%) (DPR%) (n = 3)			
	OLM	IRB	LOS	VAL
MeOH	43,86 (4,25)	74,42 (5,58)	52,70 (4,32)	48,47 (8,08)
MeOH com 0,1% AF	46,23 (6,99)	78,49 (7,98)	55,67 (5,65)	49,51 (6,71)
MeOH com 0,1% NH ₄ OH	47,88 (3,35)	82,55 (8,33)	53,53 (4,86)	50,51 (5,99)
Acetona	47,67 (4,12)	69,63 (3,97)	53,52 (2,29)	50,24 (4,52))
Acetona com 0,1% AF	39,39 (5,95)	70,26 (4,29)	50,67 (3,67)	40,39 (5,39)
Acetona com 0,1% NH ₄ OH	49,03 (6,84)	71,38 (4,07)	56,64 (3,90)	51,70 (5,02)
ACN	49,76 (2,24)	84,91 (3,98)	57,41 (1,69)	53,24 (2,34)
ACN com 0,1% AF	31,93 (3,47)	54,96 (4,95)	40,88 (2,97)	31,94 (3,79)
ACN com 0,1% NH ₄ OH	43,08 (3,01)	59,73 (4,00)	48,61 (2,50)	46,41 (2,14)

DPR, desvio padrão relativo; MeOH, metanol; AF, ácido fórmico; NH₄OH, hidróxido de amônio; ACN, acetonitrila.

Como pode ser observado na **Figura 16**, um aumento no volume de amostra e na razão do volume de acetonitrila pelo volume de plasma (V_{ACN}/V_{plasma}) levaram a uma diminuição na razão S/R para todos os analitos. A interação entre volume de amostra e V_{ACN}/V_{plasma} foi negativa e estatisticamente significativa, de forma que um aumento simultâneo das duas variáveis levou a uma redução das razões S/R para todos os analitos. Entretanto, um aumento no volume de amostra e uma diminuição na V_{ACN}/V_{plasma} causaram um aumento na razão S/R para OLM, IRB, LOS, VAL e CDC. Utilizando-se os modelos matemáticos gerados pelo software Design Expert®, foi possível estabelecer as condições ótimas para a extração de OLM, IRB, LOS, VAL e CDC a partir das amostras de plasma. As razões S/R para todos os analitos foram maximizadas pelo uso de um volume de amostra de 400 µL e V_{ACN}/V_{plasma} igual a dois.

Figura 16 – Superfícies de resposta obtidas para razão sinal-ruído (S/R) dos picos de OLM, IRB, LOS, VAL e CDC na concentração de 100 ng/mL durante a otimização do método de preparo de amostra. OLM, olmesartana; LOS, losartana; IRB, irbesartana; VAL, valsartana; CDC, candesartana cilexetila; S/R, razão sinal-ruído; V_{ACN}/V_{plasma} , razão do volume de acetonitrila pelo volume de plasma.



Todos os modelos matemáticos apresentaram regressão estatisticamente significativa ($p < 0,05$) e ausência de falta de ajuste ($p > 0,05$), indicando que os modelos foram adequados para representar os dados experimentais. Os resultados das análises de variância para os modelos matemáticos empregados para todos os analitos são apresentados na **Tabela 26**, na **Tabela 27**, na **Tabela 28**, na **Tabela 29** e na **Tabela 30**.

Tabela 26 – Análise de variância do planejamento fatorial para a predição da extração de olmesartana.

Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	Valor-F	Valor-p
Modelo	9121,63	3	3040,54	53,76	0,0042
A – volume de amostra	150,30	1	150,30	2,66	0,2016
B – V_{ACN}/V_{plasma}	6589,46	1	6589,46	116,51	0,0017
AB	2381,87	1	2381,87	42,11	0,0074
Resíduo	169,67	3	56,56		
Falta de ajuste	59,57	1	59,57	1,08	0,4075
Erro puro	110,11	2	55,05		
Total	9291,31	6			

Tabela 27 – Análise de variância do planejamento fatorial para a predição da extração de losartana.

Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	Valor-F	Valor-p
Modelo	1174,61	3	391,54	53,60	0,0042
A – volume de amostra	4,73	1	4,73	0,65	0,4799
B – V_{ACN}/V_{plasma}	848,23	1	848,23	116,12	0,0017
AB	321,66	1	321,66	44,03	0,0070
Resíduo	21,91	3	7,30		
Falta de ajuste	0,89	1	0,89	0,085	0,7984
Erro puro	21,02	2	10,51		
Total	1196,53	6			

Tabela 28 – Análise de variância do planejamento fatorial para a predição da extração de irbesartana.

Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	Valor-F	Valor-p
Modelo	4397,73	3	1465,91	50,70	0,0045
A – volume de amostra	139,27	1	139,27	4,82	0,1157
B – V_{ACN}/V_{plasma}	2943,93	1	2943,93	101,82	0,0021
AB	1314,53	1	1314,53	45,47	0,0067
Resíduo	86,74	3	28,91		
Falta de ajuste	29,84	1	29,84	1,05	0,4134
Erro puro	56,89	2	28,45		
Total	4484,46	6			

Tabela 29 – Análise de variância do planejamento fatorial para a predição da extração de valsartana.

Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	Valor-F	Valor-p
Modelo	15925,76	3	5308,59	48,95	0,0048
A – volume de amostra	226,57	1	226,57	2,09	0,2441
B – V_{ACN}/V_{plasma}	11347,46	1	11347,46	104,64	0,0020
AB	4351,73	1	4351,73	40,13	0,0080
Resíduo	325,33	3	108,44		
Falta de ajuste	149,43	1	149,43	1,70	0,3223
Erro puro	175,89	2	87,95		
Total	16251,09	6			

Tabela 30 – Análise de variância do planejamento fatorial para a predição da extração de candesartana cilexetila (padrão interno).

Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	Valor-F	Valor-p
Modelo	1,210E+006	3	1,210E+006	98,45	0,0017
A – volume de amostra	2019,80	1	2019,80	0,49	0,5332

Tabela 30 – Análise de variância do planejamento fatorial para a predição da extração de candesartana cilexetila (padrão interno) (continuação).

Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	Valor-F	Valor-p
B – V_{ACN}/V_{plasma}	9,420E+005	1	9,420E+005	229,88	0,0006
AB	2,663E+005	1	2,663E+005	64,97	0,0040
Resíduo	12293,54	3	4097,85		
Falta de ajuste	2276,65	1	2276,65	0,45	0,5697
Erro puro	10016,89	2	5008,45		
Total	1,223E+006	6			

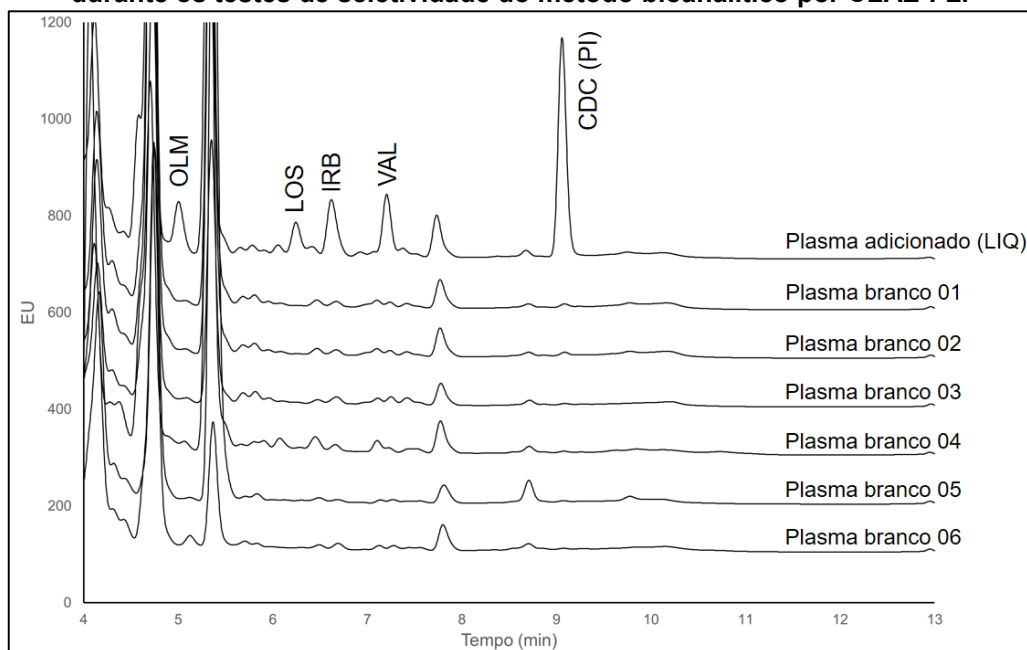
A etapa de preparo de amostras é, geralmente, necessária, em métodos cromatográficos para determinação de fármacos em matrizes biológicas. Diferentes técnicas têm sido utilizadas com essa finalidade, sejam elas convencionais ou miniaturizadas. Entretanto, não é comum na literatura a comparação de diferentes técnicas de preparo de amostras para a determinação de fármacos. Assim, os resultados apresentados no presente estudo podem auxiliar pesquisadores que pretendem desenvolver métodos para a determinação de antagonistas do receptor da angiotensina II em amostras biológicas, uma vez que pode fornecer dados para apoiar o desenho de estudos futuros. Outra conclusão importante deste estudo de comparação de técnicas de preparo de amostras é que, em algumas circunstâncias, o uso de técnicas consideradas convencionais pode ser vantajoso em relação ao uso de técnicas miniaturizadas.

5.2.4 Validação do método bioanalítico

5.2.4.1 Seletividade

Picos interferentes nos tempos de retenção de OLM, IRB, LOS e VAL apresentaram alturas inferiores a 20% das alturas dos respectivos picos no LIQ nas seis amostras de plasma branco avaliadas. Além disso, picos interferentes no tempo de retenção de CDC (PI) apresentaram altura inferior a 5% da altura do PI. Os cromatogramas utilizados na avaliação do teste de seletividade são apresentados na **Figura 17**.

Figura 17 – Cromatogramas das amostras de plasma branco e da amostra no LIQ obtidos durante os testes de seletividade do método bioanalítico por CLAE-FL.



5.2.4.2 Efeito residual

Não foi observado efeito residual nas duas injeções de plasma branco realizadas após a injeção de uma amostra no LSQ. Os picos interferentes observados nos tempos de retenção de OLM, IRB, LOS e VAL apresentaram alturas inferiores a 20% das alturas dos picos dos analitos no LIQ. Além disso, picos interferentes no tempo de retenção de CDC (PI) apresentaram altura inferior a 5% da altura do pico do PI.

5.2.4.3 Linearidade

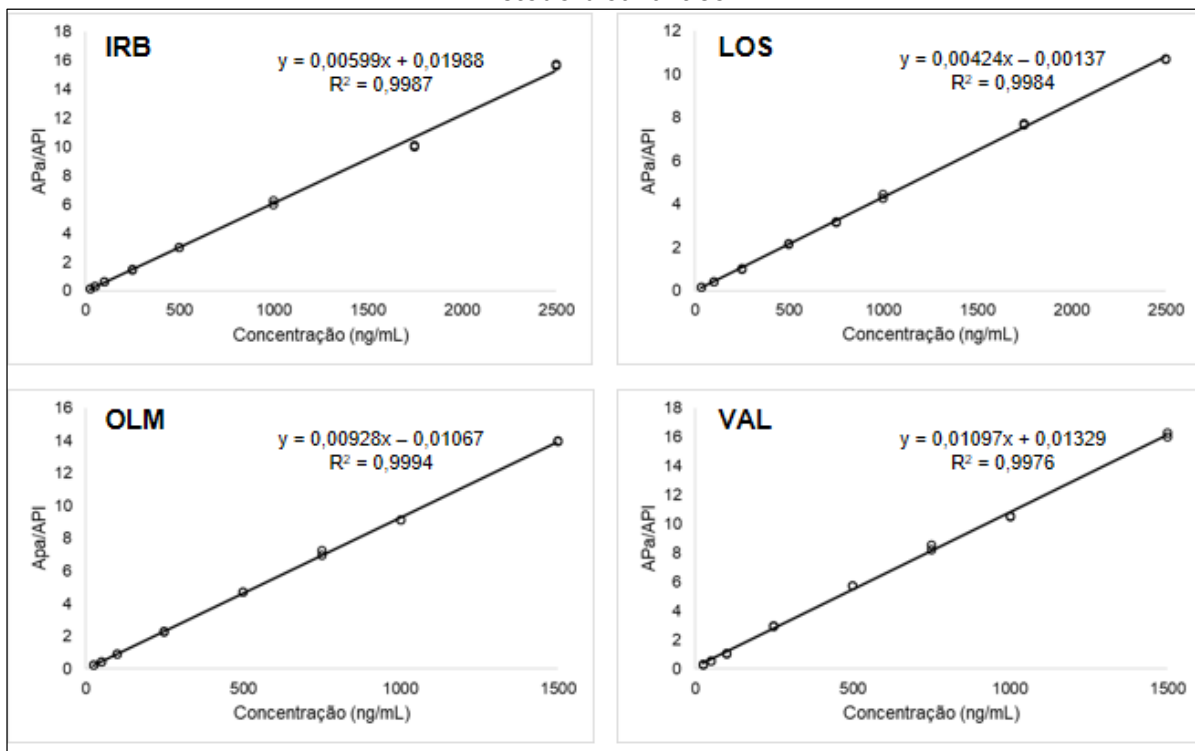
Todas as curvas analíticas obtidas, construídas utilizando-se as variáveis concentração (X, ng/mL) e razão das alturas dos picos dos analitos pelas alturas dos picos do PI (Y), foram lineares na faixa de concentração de 25,0 – 1500,0 ng/mL para OLM e VAL, de 25,0 – 2500,0 ng/mL para IRB e de 35,0 – 2500,0 ng/mL para LOS, com coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,99 para todos os analitos em todas as curvas analíticas. Os resultados das curvas analíticas são apresentados na **Tabela 31** e um exemplo de curva para cada analito é apresentado na **Figura 18**.

Tabela 31 – Parâmetros das curvas analíticas obtidas durante a validação do método por CLAE-FL.

Analito	Dia de análise	Faixa linear (ng/mL)	Regressão linear		
			Inclinação (b)	Intercepto (a)	R ²
LOS	1	35,0-2500,0	0,00424	-0,00137	0,9984
	2		0,00425	-0,00652	0,9963
	3		0,00431	-0,00636	0,9987
IRB	1	25,0-2500,0	0,00599	0,01988	0,9987
	2		0,00633	0,01118	0,9976
	3		0,00672	0,01381	0,9982
OLM	1	25,0-1500,0	0,00928	-0,01067	0,9994
	2		0,00936	-0,02926	0,9987
	3		0,00965	-0,01398	0,9991
VAL	1	25,0-1500,0	0,01097	0,01329	0,9976
	2		0,01138	-0,00778	0,9973
	3		0,01066	0,01847	0,9985

LOS, losartana; IRB, irbesartana; OLM, olmesartana; VAL, valsartana; R², coeficiente de determinação.

Figura 18 – Curvas analíticas obtidas para OLM, IRB, LOS e VAL durante a validação do método bioanalítico.



O melhor ajuste ao modelo linear e a menor soma dos desvios foram obtidos para as curvas analíticas de todos os analitos quando se usou fator de ponderação igual a

$1/X^2$. Todos os padrões de calibração apresentaram desvios dentro do limite de $\pm 20\%$ no LIQ e de $\pm 15\%$ para os demais níveis de concentração.

5.2.4.4 Limites de detecção e quantificação

Além de mais seletiva do que a detecção por UV, a detecção por fluorescência proporcionou limites de detecção e quantificação adequados. Os limites de detecção obtidos foram de 10,0 ng/mL para LOS e 7,0 ng/mL para OLM, IRB e VAL. Os limites de quantificação obtidos foram adequados para todos os analitos (35,0 ng/mL para LOS e 25,0 ng/mL para OLM, IRB e VAL), tendo em vista que são inferiores às concentrações plasmáticas máximas observadas para esses fármacos e próximos da concentração plasmática após aproximadamente três tempos de meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) para LOS e OLM e mais de cinco $t_{1/2}$ para IRB e VAL, o que faz com que o método seja adequado para a análise desses fármacos em amostras de plasma. Os limites de quantificação foram definidos como os limites inferiores de quantificação das curvas analíticas.

5.2.4.5 Precisão e exatidão

A **Tabela 32** apresenta os resultados obtidos durante os ensaios para a avaliação da precisão e exatidão do método bioanalítico.

Tabela 32 – Resultados obtidos durante os testes para a avaliação da precisão, da exatidão e da recuperação do método bioanalítico por CLAE-FL.

Analito	Nível	Precisão (DPR %)				Exatidão (EPR%)				Recuperação média (%) (DPR %)
		Intracorrída			Intercorrídas	Intracorrída			Intercorrídas	
		1º dia	2º dia	3º dia			1º dia	2º dia		3º dia
LOS	CQLIQ	3,36	2,11	13,95	6,61	3,24	6,48	13,82	7,85	n.a.
	CQB	2,31	3,29	6,72	3,32	-5,15	-4,17	13,73	1,47	90,67 (3,74)
	CQM	2,54	3,42	3,42	6,45	11,85	12,94	2,71	9,17	81,84 (3,60)
	CQA	2,34	3,45	1,37	7,80	-0,31	1,68	-2,80	-0,47	87,64 (3,67)
	CQD	2,11	3,26	5,32	7,43	-1,83	-0,17	-8,04	-3,35	n.a.
OLM	CQLIQ	3,48	1,88	15,72	10,02	-3,37	7,18	-5,12	-0,44	n.a.
	CQB	8,84	1,58	5,01	8,39	-7,79	0,98	-13,12	-6,64	70,20 (2,65)
	CQM	1,99	2,84	2,46	3,80	-0,46	1,70	6,75	2,66	75,05 (3,17)
	CQA	1,54	2,24	3,92	2,79	1,63	4,27	3,55	3,15	69,97 (2,47)
	CQD	1,69	2,74	4,95	3,73	1,60	5,70	1,28	2,86	n.a.

Tabela 32 – Resultados obtidos durante os testes para a avaliação da precisão, da exatidão e da recuperação do método bioanalítico por CLAE-FL (continuação).

Analito	Nível	Precisão (DPR %)				Exatidão (EPR%)				Recuperação média (%) (DPR %)
		Intracorrida			Intercorridas	Intracorrida			Intercorridas	
		1º dia	2º dia	3º dia		1º dia	2º dia	3º dia		
IRB	CQLIQ	1,22	2,15	7,73	5,85	0,81	4,76	-4,97	0,20	n.a.
	CQB	3,48	1,28	4,14	5,51	-7,71	1,84	-6,97	-4,28	76,20 (2,45)
	CQM	2,18	2,44	1,46	5,81	11,93	10,51	-0,74	7,23	83,50 (2,76)
	CQA	2,17	1,87	2,36	5,42	-3,96	-4,17	-13,65	-7,26	84,53 (2,09)
	CQD	2,22	2,72	3,19	5,33	-5,22	-5,86	-14,35	-8,48	n.a.
VAL	CQLIQ	5,50	2,19	6,51	8,08	1,17	6,13	-9,27	-0,66	n.a.
	CQB	0,73	5,84	5,76	8,96	-4,02	-14,95	2,34	-5,54	71,31 (3,03)
	CQM	4,60	3,13	4,31	7,98	1,86	1,92	-12,14	-2,78	63,67 (3,49)
	CQA	1,93	2,88	2,25	2,86	1,59	4,54	5,97	4,03	84,05 (3,08)
	CQD	2,25	2,76	4,80	3,51	1,88	4,61	1,17	2,55	n.a.

DPR, desvio padrão relativo; n.a., não se aplica; CQLIQ, controle de qualidade no limite inferior de quantificação; CQB, controle de qualidade de baixa concentração; CQM, controle de qualidade de média concentração; CQA, controle de qualidade de alta concentração; CQD, controle de qualidade de diluição; LOS, losartana; OLM, olmesartana; IRB, irbesartana; VAL, valsartana.

É possível observar que todas as amostras de controle de qualidade apresentaram erro padrão relativo dentro do limite de $\pm 20\%$ no LIQ e de $\pm 15\%$ nos demais níveis de concentração. Além disso, os valores de DPR obtidos nos diferentes níveis de controle de qualidade foram inferiores a 20% no LIQ e a 15% nos demais níveis. Os valores de erro padrão relativo e DPR entre as amostras analisadas nos três dias também atenderam os critérios acima. Dessa forma, o método foi considerado preciso e exato. Valores de erro padrão relativo dentro do limite de $\pm 15\%$ e valores de DPR inferiores a 15%, obtidos a partir das amostras de CQD, confirmaram a integridade da diluição.

5.2.4.6 Recuperação

Os resultados de recuperação dos analitos da amostra biológica são apresentados na **Tabela 32** (pág. 120). Recuperações superiores a 60% foram obtidas para todos os analitos e foram consideradas adequadas para o método proposto. Além disso, os valores de recuperação foram consistentes e reprodutíveis, já que os valores de DPR obtidos variaram de 2,09 a 3,74%. De acordo com o guia de validação de métodos bioanalíticos do FDA (FDA, 2018), valores de recuperação menores que 100% são aceitáveis, desde que sejam reprodutíveis e consistentes.

5.2.4.7 Estabilidade dos analitos na matriz biológica

Os resultados dos testes de estabilidade dos analitos em plasma são apresentados na **Tabela 33**.

Tabela 33 – Resultados obtidos durante os testes para a avaliação da estabilidade de LOS, OLM, IRB e VAL em plasma.

Analito	Tipo de controle	ECD (25 °C por 4 h)		EPP (20 °C por 30 h)		ECC (3 ciclos de -70 °C a 25 °C)		ELD (-70 °C por 30 dias)	
		Exatidão (EPR %)	Precisão (DPR %)	Exatidão (EPR %)	Precisão (DPR %)	Exatidão (EPR %)	Precisão (DPR %)	Exatidão (EPR%)	Precisão (DPR %)
LOS	CQB	-6,61	1,25	-9,33	2,46	-1,96	3,29	-9,10	10,63
	CQA	-0,12	0,66	0,76	2,67	-1,68	1,93	13,40	5,35
OLM	CQB	-2,10	0,71	2,87	2,15	-13,74	3,01	-3,61	11,66
	CQA	2,07	0,53	10,04	1,00	3,89	1,95	-13,89	7,25
IRB	CQB	1,95	0,21	-4,75	1,31	-13,08	2,35	-6,16	13,59
	CQA	-6,87	0,83	-10,18	2,85	-14,69	2,06	-1,03	4,32
VAL	CQB	12,38	0,65	12,33	2,07	-12,84	2,77	-4,02	12,83
	CQA	1,87	0,51	6,37	2,92	7,88	1,95	-12,02	3,07

ECD, estabilidade de curta duração; EPP, estabilidade de pós-processamento; ECC, estabilidade de congelamento e descongelamento; ELD, estabilidade de longa duração; DPR, desvio padrão relativo; EPR, erro padrão relativo; CQB, controle de qualidade de baixa concentração; CQA, controle de qualidade de alta concentração; LOS, losartana; VAL, valsartana; OLM, olmesartana; IRB, irbesartana.

Analisando-se os resultados apresentados, é possível observar que todos os valores de erro padrão relativo obtidos nos testes de estabilidade de curta duração, pós-processamento, após ciclos de congelamento e descongelamento e de longa duração estão dentro do limite de $\pm 15\%$, demonstrando que os analitos são estáveis na amostra biológica nas condições avaliadas.

5.2.5 Aplicação do método bioanalítico

Na **Tabela 34** são apresentados os resultados de concentração plasmática de losartana nas amostras analisadas utilizando-se o método bioanalítico desenvolvido. Exemplos de cromatogramas de amostras obtidas de voluntários são apresentados na **Figura 19**.

Tabela 34 – Concentração plasmática de losartana obtidas de amostras de voluntários com o método desenvolvido e validado.

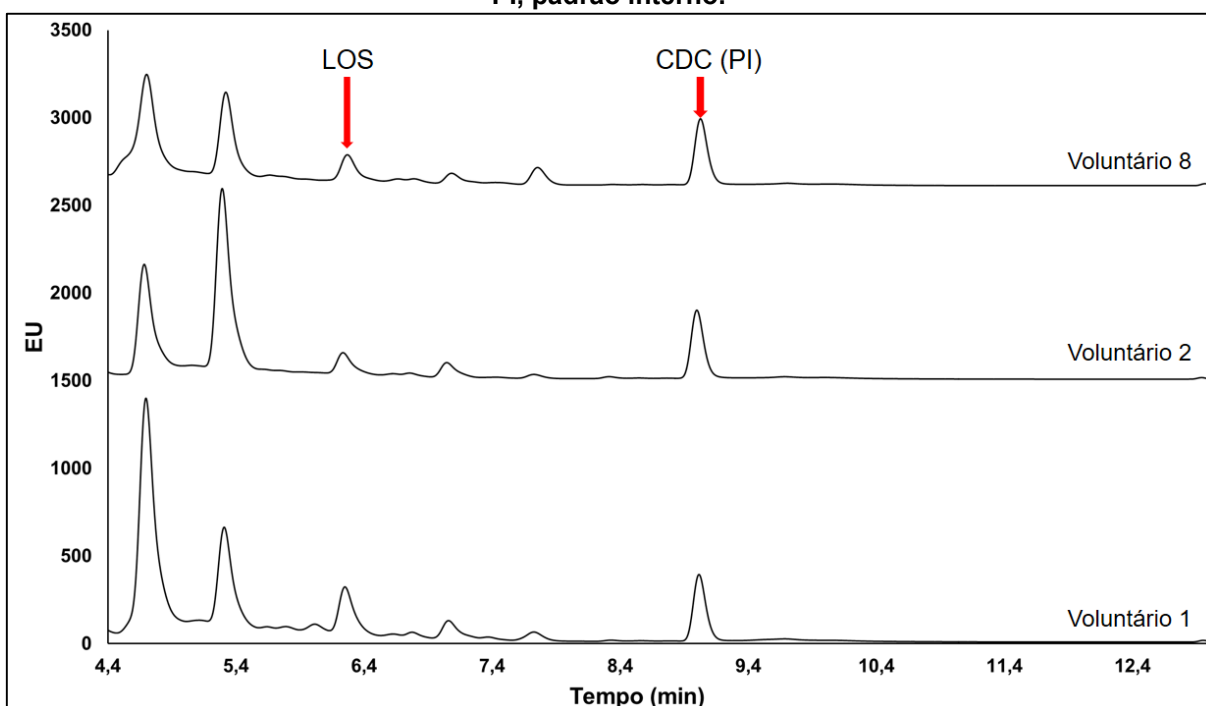
Voluntário	Concentração plasmática (ng/mL) (DPR%) (n = 3)
1	237,07 (7,91%)
2	103,48 (3,68%)
3	127,58 (2,40%)
4	351,85 (5,83%)

Tabela 34 – Concentração plasmática de losartana obtidas de amostras de voluntários com o método desenvolvido e validado (continuação).

Voluntário	Concentração plasmática (ng/mL) (DPR%) (n = 3)
5	392,22 (10,99%)
6	51,39 (2,41%)
7	373,86 (5,93%)
8	122,73 (6,72%)
9	301,95 (7,25%)
10	239,08 (3,53%)
11	398,67 (1,64%)
12	111,03 (1,22%)
13	248,11 (4,58%)
14	114,06 (1,60%)
15	134,91 (1,89%)

DPR, desvio padrão relativo.

Figura 19 – Cromatogramas de amostras reais obtidos utilizando-se o método validado. Concentrações de losartana obtidas para as amostras: voluntário 1 – 237,07 ng/mL, voluntário 2 – 103,48 ng/mL, voluntário 8 – 122,73 ng/mL. LOS, losartana; CDC, candesartana cilexetila; PI, padrão interno.



Como não se conhecia os regimes posológicos dos pacientes, nem o horário no qual eles haviam administrado os medicamentos, a concentração plasmática média não foi calculada. A aplicação do método a amostras reais comprovou a sua adequabilidade e confiabilidade para análise de amostras de plasma contendo losartana.

No caso das amostras analisadas só havia a presença de losartana. Entretanto, o método desenvolvido poderia ser aplicado na determinação de qualquer um dos

fármacos antagonistas do receptor de angiotensina II avaliados neste estudo, o que o torna abrangente para essa classe de compostos.

5.3 Método bioanalítico para a determinação simultânea de fármacos anti-hipertensivos e hipocolesterolemiantes em plasma humano empregando microextração líquido-líquido assistida por vórtex (VALLME) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM)

5.3.1 Otimização das condições do espectrômetro de massas

O espectrômetro de massas utilizado para o desenvolvimento do método, um Sciex QTRAP 5500, possui fonte de ionização electrospray e analisador de massas que consiste no acoplamento de um analisador do tipo quadrupolo e um ion trap linear. Analisadores desse tipo permitem a utilização de diferentes modos de varredura, possuindo capacidade para elucidação estrutural de moléculas desconhecidas e elevada detectabilidade para análises de quantificação, já que também podem funcionar como triplo quadrupolo (HOFFMANN; STROOBANT, 2007). Para a quantificação dos analitos avaliados neste trabalho, foi empregado modo de varredura do tipo MRM (monitoramento de reações múltiplas). Nesse tipo de varredura, os íons precursores com razões m/z pré-definidas foram selecionados no quadrupolo e foram direcionados para a célula de colisão. Após a fragmentação dos íons precursores, os íons produto foram direcionados para o analisador de armadilha de íons, onde foram selecionados apenas os íons produto com razões m/z definidas durante a otimização das condições de ionização e fragmentação.

Os espectros de massas de fragmentação para todos os analitos avaliados neste estudo são apresentados no **APÊNDICE A**. As condições para a detecção dos analitos por espectrometria de massas foram otimizadas. Foram propostas estruturas moleculares para os fragmentos mais intensos de todos os fármacos (NIESSEN, 2011; ALMEIDA, 2013, CHANDER *et al.*, 2013; DONG; LIANG; SUN, 2015). As transições de massas e os valores otimizados de DP, CE e CXP, bem como os de

dwell time, para a determinação dos fármacos no modo positivo são apresentados na **Tabela 35**.

Tabela 35 – Parâmetros otimizados para a determinação de fármacos anti-hipertensivos e hipocolesterolemiantes por CLAE-EM/EM.

Fármaco	Massa exata (g.mol ⁻¹)	Transição de massas (quantificação e confirmação)	Dwell time (ms)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
Anlodipino	408,145	409 → 238	70	76	15	16
		409 → 294			16	16
Atorvastatina	558,253	559 → 440	80	46	27	14
		559 → 250			55	18
Carvedilol	406,189	407 → 100	74	136	35	12
		407 → 224			33	6
Diltiazem	414,161	415 → 310	74	71	29	18
		415 → 178			31	16
Espironolactona	416,202	417 → 180	74	76	31	14
		417 → 111			85	18
Irbesartana	428,232	429 → 207	62	136	33	12
		429 → 180			61	8
Losartana	422,162	423 → 207	64	126	29	12
		423 → 205			69	26
Valsartana	435,227	436 → 207	95	136	33	12
		436 → 235			23	14
Varfarina	308,105	309 → 121	86	77	57	14
		309 → 173			41	12
Verapamil	454,283	455 → 165	72	141	37	14
		455 → 150			45	16

Em seguida, as condições da fonte electrospray foram otimizadas. As condições selecionadas para se prosseguir com o desenvolvimento do método são apresentadas na **Tabela 36**.

Tabela 36 – Parâmetros e condições otimizadas para a fonte electrospray.

Parâmetro	Condições otimizadas
Dissociação ativada por colisão (CAD)	média
Gás contra-corrente (psi)	10
Voltagem do spray (v)	5500
Temperatura (°C)	500
Gás de nebulização (GS1) (psi)	50
Gás auxiliar (GS2) (psi)	45

Essas foram as condições da fonte de ionização em que os sinais das transições de massas de quantificação e confirmação da espironolactona foram mais intensos. Essas condições foram selecionadas para prosseguir com o desenvolvimento do método, tendo em vista que esse analito apresentou os sinais menos intensos durante os testes de otimização das condições de ionização e fragmentação dos analitos.

5.3.2 Otimização das condições cromatográficas

Diferentes soluções foram testadas como fase móvel aquosa, como ácido fórmico em diferentes concentrações (0,01%, 0,05% e 0,1% v/v), tampão acetato de amônio (5 mmol/L e 10 mmol/L) pH 5,5, tampão formiato de amônio (5 mmol/L e 10 mmol/L) pH 4,0, e solução de ácido fórmico 0,1% v/v com formiato de amônio 5 mmol/L.

A fase móvel aquosa que proporcionou maior detectabilidade, evidenciada por maiores razões sinal-ruído, e melhores formatos dos picos foi aquela composta de solução de ácido fórmico 0,1% (v/v). Portanto, essa solução foi selecionada para prosseguir com o desenvolvimento do método.

Avaliaram-se acetonitrila e metanol como modificadores orgânicos. A utilização de acetonitrila favoreceu a obtenção de picos mais finos e intensos, além de diminuir o tempo de corrida cromatográfica, o que proporcionou maior detectabilidade e menor tempo de análise, respectivamente.

A coluna cromatográfica testada inicialmente, a Agilent Poroshell C₁₈ (uma coluna que contém partículas superficialmente porosas), não proporcionou picos com formato adequado. Outra coluna cromatográfica particulada, a Phenomenex Synergi 4 μ Fusion, que possui grupos polares ligados à superfície das partículas de sílica, além de cadeias carbônicas octadecilsilano, foi testada, porém apresentou elevado efeito residual para diltiazem e irbesartana, mesmo após a injeção de soluções pouco concentradas (100 ng/mL) e a utilização de solução de limpeza para a lavagem da agulha do injetor.

O efeito residual é um problema comum em análises por LC-MS e geralmente é proveniente do sistema de cromatografia líquida, principalmente quando são utilizados espectrômetros de massas mais modernos, como o empregado neste trabalho, nos quais os íons são ejetados rapidamente da célula de colisão, antes da próxima transição de massas a ser monitorada, o que evita que problemas de *cross-talk* sejam confundidos com efeito residual. Entretanto, pela elevada detectabilidade desses equipamentos, o efeito residual pode ser observado mais facilmente. O efeito residual pode prejudicar a precisão e a exatidão dos métodos, devendo ser solucionado (HUGHES *et al.*, 2007).

Para se determinar a origem do efeito residual, injetou-se a solução mistura contendo todos os analitos a 100 ng/mL também sem coluna cromatográfica e, em seguida, acetonitrila. Observou-se que não houve efeito residual, o que comprovou que o problema era oriundo da coluna Phenomenex Synergi. Por isso, optou-se por testar uma coluna monolítica, a Onyx Monolithic C₁₈. Com essa coluna, os picos apresentaram formato gaussiano e o efeito residual foi eliminado. As colunas monolíticas são muito porosas, tendo em sua estrutura macroporos, com diâmetros de aproximadamente 2 µm, e mesoporos, com diâmetros de cerca de 10 nm, o que faz com que seja possível empregar elevadas vazões de fase móvel sem aumentos consideráveis na pressão do sistema (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010). Possivelmente, a elevada porosidade desse tipo de coluna faz com que ela esteja menos propensa a ocorrência de efeito residual.

Com a finalidade de melhorar a separação cromatográfica, outros gradientes foram testados. O gradiente com o qual se obteve a melhor separação cromatográfica é apresentado na **Tabela 37**.

Tabela 37 – Gradiente com o qual se obteve a melhor separação cromatográfica para a determinação de fármacos anti-hipertensivos e hipocolesterolemiantes por CLAE-EM/EM.

Tempo (minutos)	A (%)	B (%)
0,0	80	20
1,5	60	40
2,5	5	95
4,5	5	95
5,0	80	20
8,0	80	20

A utilização de eluição em gradiente é muito comum em métodos multianalitos, nos quais uma grande variedade de substâncias, com características físico-químicas muito distintas, é analisada simultaneamente. Os analitos avaliados neste trabalho possuem valores de log P muito distintos (seção 3.3.3, pág. 51), o que faz com que tenham diferentes graus de retenção na coluna cromatográfica, que possui grupos octadecilsilano ligados quimicamente à superfície da sílica. Dessa forma, a eluição em gradiente foi necessária para que todos os analitos fossem eluídos da coluna em um tempo de corrida adequado. Além disso, para a análise de matrizes complexas, como o plasma, a utilização de gradiente possibilita a eluição de componentes mais apolares da matriz biológica, proporcionando melhor limpeza da coluna e, conseqüentemente, aumentando a sua vida útil.

As condições cromatográficas otimizadas para a separação dos fármacos anti-hipertensivos e hipocolesterolemiantes por CLAE-EM/EM são apresentadas na

Tabela 38.

Tabela 38 - Condições cromatográficas otimizadas para a determinação de fármacos anti-hipertensivos e hipocolesterolemiantes por CLAE-EM/EM.

Parâmetros	Condições
Fase móvel	Ácido fórmico 0,1% (v/v) (A) e acetonitrila (B)
Vazão de fase móvel	1,0 mL/min
Volume de injeção	10 µL
Coluna	Phenomenex Onyx Monolithic C ₁₈ (50 x 4,6 mm)
Temperatura da coluna	30 °C
Tempo de corrida	8 minutos
Solução de limpeza da agulha do injetor	Mistura de água, metanol e acetona (40:40:20, v/v/v), acidificada com 0,1% de ácido fórmico
Tempo de limpeza	40 segundos
Divisor de fluxo (split)	1:10

As condições cromatográficas descritas acima proporcionaram fatores de retenção adequados para todos os picos ($k > 2,5$), bem como picos simétricos e com razões sinal-ruído adequadas. Os tempos de retenção e os fatores de retenção obtidos para todos os picos são apresentados na **Tabela 39**.

Tabela 39 – Tempos de retenção médios obtidos para os analitos utilizando-se as condições cromatográficas otimizadas.

Fármaco	Tempo de retenção (min) (média ± desvio padrão)	Fator de retenção (k)
Carvedilol (CVD)	3,19 ± 0,01	2,84
Espironolactona (ESP)	3,00 ± 0,00	2,61
Losartana (LOS)	3,51 ± 0,00	3,22

Tabela 39 – Tempos de retenção médios obtidos para os analitos utilizando-se as condições cromatográficas otimizadas (continuação).

Fármaco	Tempo de retenção (min) (média ± desvio padrão)	Fator de retenção (k)
Atorvastatina (ATV)	3,90 ± 0,01	3,69
Verapamil (VPM)	3,27 ± 0,00	2,94
Valsartana (VAL)	3,79 ± 0,00	3,56
Anlodipino (ANL)	3,20 ± 0,01	2,85
Irbesartana (IRB)	3,36 ± 0,01	3,04
Diltiazem (DTZ)	2,98 ± 0,01	2,59
Varfarina (VAR)	3,84 ± 0,00	3,62

Analisando-se os tempos de retenção dos analitos e seus respectivos desvios padrões, é possível observar que a variabilidade foi muito baixa. Dessa forma, considerou-se o tempo de reequilíbrio do gradiente adequado, já que proporcionou tempos de retenção reprodutíveis para todos os fármacos. Além disso, fatores de retenção adequados diminuem a possibilidade de efeito matriz, já que a coeluição dos analitos juntamente com componentes da matriz se torna menos provável.

5.3.3 Otimização do método de preparo de amostra

5.3.3.1 Precipitação de proteínas

Para a realização da etapa de precipitação de proteínas, se fazia necessário escolher um agente precipitante que não tivesse solvente orgânico em sua composição, já que na microextração líquido-líquido assistida por vórtex não se usa solvente dispersante. A dispersão das microgotículas do solvente orgânico extrator na amostra é promovida pelo fluxo turbulento proveniente da agitação em vórtex.

Não foi necessário realizar uma comparação estatística entre as diferentes soluções precipitantes avaliadas (ácido tricloroacético a 10% (m/v), ácido trifluoroacético (TFA) a 10% (m/v) e solução saturada de sulfato de amônio), já que alguns dos analitos não foram recuperados da amostra quando se utilizou ácido tricloroacético e solução saturada de sulfato de amônio. Além disso, esses agentes precipitantes levaram ao aparecimento de vários picos interferentes no cromatograma. Apesar do método de preparo de amostra contemplar uma etapa adicional de extração (VALLME), optou-se por não empregar esses agentes precipitantes também para evitar o surgimento de picos interferentes no cromatograma e a ocorrência de efeito matriz.

A condição final estabelecida para a etapa de precipitação de proteínas está descrita a seguir. A 100 µL da amostra de plasma, adicionaram-se 40 µL de padrão interno solução de trabalho e agitou-se em vórtex por 15 segundos. Adicionaram-se 400 µL de TFA 10% (m/v) e agitou-se em vórtex por 60 segundos. Centrifugou-se a amostra por 5 minutos a 9400 g e 4 °C. O sobrenadante obtido na etapa de precipitação de proteínas foi utilizado na sequência para a realização da microextração líquido-líquido assistida por vórtex (VALLME).

5.3.3.2 Microextração líquido-líquido assistida por vórtex (VALLME)

A otimização das condições utilizadas na VALLME foi realizada de forma univariada, testando-se um parâmetro por vez, na sequência em que é apresentada a seguir. Após estabelecimento da melhor condição de um parâmetro, essa era mantida na avaliação do parâmetro seguinte.

5.3.3.2.1 pH

O pH da amostra é uma variável que influencia significativamente a extração de substâncias ionizáveis da amostra biológica. O pH que favorece a forma não ionizada da molécula pode favorecer sua extração pelo solvente orgânico na extração líquido-líquido. Na VALLME, além do efeito direto sobre a ionização das moléculas, diferentes valores de pH podem promover a adsorção preferencial de íons H_3O^+ ou OH^- na interface, podendo levar à formação de duplas camadas elétricas na superfície das microgotículas do solvente extrator, o que pode afetar a eficiência da extração para analitos ionizados (PSILLAKIS, 2019).

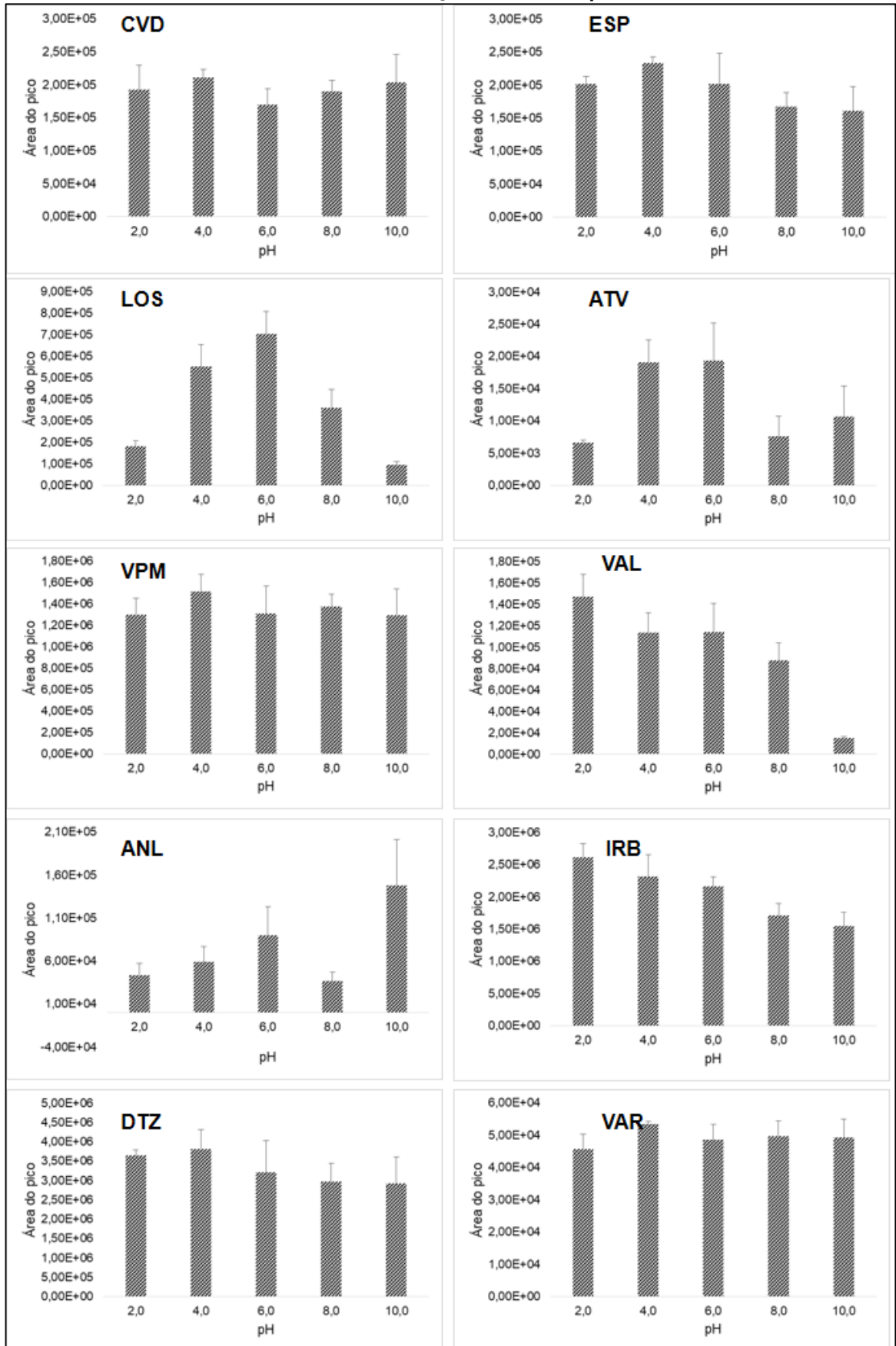
Os resultados obtidos para as áreas dos picos dos analitos avaliados em relação ao pH da solução tampão adicionada à amostra são apresentados na **Figura 20** (pág. 132).

Analisando-se os gráficos de pH em função da área do pico de cada analito, pode-se observar que a alteração do pH da amostra influencia de formas diferentes a extração

dos analitos do plasma. Isso acontece porque os analitos avaliados neste trabalho são de classes químicas diferentes, ou seja, possuem diferentes grupos funcionais e ionizáveis, apresentando diferentes valores de pKa e de log D. É possível observar também que valores de pH baixos ($\text{pH} \leq 4$) diminuem muito a extração de anlodipino, ao passo que valores de pH elevados reduzem significativamente a extração de losartana da amostra biológica. Dessa forma, optou-se por selecionar um pH intermediário, que proporcionaria melhor extração do anlodipino, bem como dos demais analitos, para o método de preparo de amostra. O anlodipino apresenta baixa concentração plasmática e, por isso, requer um limite de quantificação baixo. Além disso, pode-se observar também, pela análise das barras de erro dos gráficos, que não houve diferença estatística significativa para a extração dos analitos em diferentes valores de pH, principalmente entre o pH 4 e o pH 6. Entretanto, o pH 6,0 foi escolhido para prosseguir com o desenvolvimento do método, já que tende a apresentar maior rendimento de extração para anlodipino e losartana.

Com o método desenvolvido anteriormente (seção **5.2**, pág. 106), a extração de losartana e valsartana a partir de amostra de plasma por ELL, utilizando-se diclorometano como solvente extrator, apresentou recuperação média de 46,01% e 43,20%, respectivamente. Com a VALLME, as recuperações de losartana e valsartana foram de 40,69% e 14,86%, respectivamente. A extração de losartana não diferiu significativamente entre os dois métodos, ao passo que a extração de valsartana foi muito superior empregando-se a ELL. Isso pode ser explicado pelo fato de que, antes da ELL, o pH da amostra foi ajustado para 5,0, ao passo que para a VALLME o pH escolhido para a condição final foi igual a 6,0. Analisando-se o gráfico de log D (**APÊNDICE B**) para ambos os analitos, pode-se observar que o valor de log D entre os dois valores de pH (5,0 e 6,0) difere significativamente para a valsartana, o que não ocorre para a losartana.

Figura 20 – Áreas dos picos dos analitos em função do pH da solução tampão adicionada à amostra durante a otimização do método por VALLME.



5.3.3.2.2 Concentração de NaCl

Geralmente, na VALLME, o aumento da força iônica da solução amostra melhora a eficiência de extração para diferentes analitos devido ao efeito salting out. Em altas concentrações de sal, porém, as eficiências de extração são reduzidas, já que concomitantemente há um aumento da viscosidade do meio e uma diminuição da solubilidade do solvente orgânico extrator na solução amostra (PAPADOPOULOU *et al.*, 2011; ABU-BAKAR; MAKAHLEH; SAAD, 2014).

É possível observar, pela análise dos gráficos da **Figura 21** (pág. 135), que a concentração de cloreto de sódio não influenciou significativamente a extração dos analitos da amostra. Apesar de não ser observada diferença estatisticamente significativa quando se adicionou NaCl ao meio, carvedilol e losartana parecem ter sido melhor extraídos na presença de uma pequena concentração de NaCl. Por isso, selecionou-se a concentração de 1% (m/v) de NaCl para prosseguir com o desenvolvimento do método.

5.3.3.2.3 Volume de solução tampão

Avaliou-se, também, se o volume de solução tampão adicionado ao sobrenadante proveniente da precipitação de proteínas influenciava a extração dos analitos da amostra. É possível observar nos gráficos apresentados na **Figura 22** (pág. 136) que o volume de tampão parece influenciar significativamente na extração de alguns analitos da amostra, como carvedilol, espirolactona, verapamil e diltiazem. De forma geral, volumes menores de tampão favoreceram a extração desses analitos. Isso pode ser explicado pelo fato de que maiores volumes de tampão proporcionam a esses analitos maior solubilidade na fase aquosa, o que faz com que sejam menos extraídos pelo solvente orgânico extrator, diminuindo as eficiências de extração.

5.3.3.2.4 Solvente extrator

Diferentes solventes extratores (diclorometano, clorofórmio, clorobenzeno e 1,2-dicloroetano) foram avaliados para a extração dos analitos da matriz biológica. A

Figura 23 (pág. 138) apresenta os gráficos construídos a partir das áreas dos picos dos analitos em função do solvente orgânico utilizado.

Analisando-se os gráficos, pode-se observar que o 1,2-dicloroetano proporcionou maior extração para a maioria dos analitos. Porém, o solvente apresentou rendimento de extração muito menor para o anlodipino, ao passo que o diclorometano extraiu significativamente este analito. É possível observar também que o diclorometano extraiu satisfatoriamente os demais analitos, o que fez com que fosse escolhido para prosseguir com o desenvolvimento do método.

5.3.3.2.5 Volume de solvente extrator

A **Figura 24** (pág. 139) apresenta os gráficos construídos a partir das áreas dos picos dos analitos em função do volume de diclorometano utilizado.

Analisando-se os gráficos, é possível inferir que o aumento do volume de diclorometano de 100 μL para 200 μL aumentou consideravelmente a extração de todos os analitos. Além disso, é possível observar que não houve diferença estatisticamente significativa na quantidade dos analitos extraída quando se utilizaram 200 μL , 300 μL ou 500 μL de diclorometano, com exceção do anlodipino, para o qual a utilização de 300 μL de diclorometano proporcionou maior eficiência de extração. Dessa forma, optou-se por utilizar 300 μL de diclorometano para prosseguir com o desenvolvimento do método.

A utilização de volumes de diclorometano maiores que 300 μL aumentaria significativamente o tempo gasto para a coleta do sedimento após a centrifugação das amostras, aumentando-se o tempo total de análise, além de reduzir as vantagens de se utilizar a VALLME em detrimento da ELL.

Figura 21 – Áreas dos picos dos analitos em função da concentração de cloreto de sódio na solução tampão adicionada à amostra durante a otimização do método por VALLME.

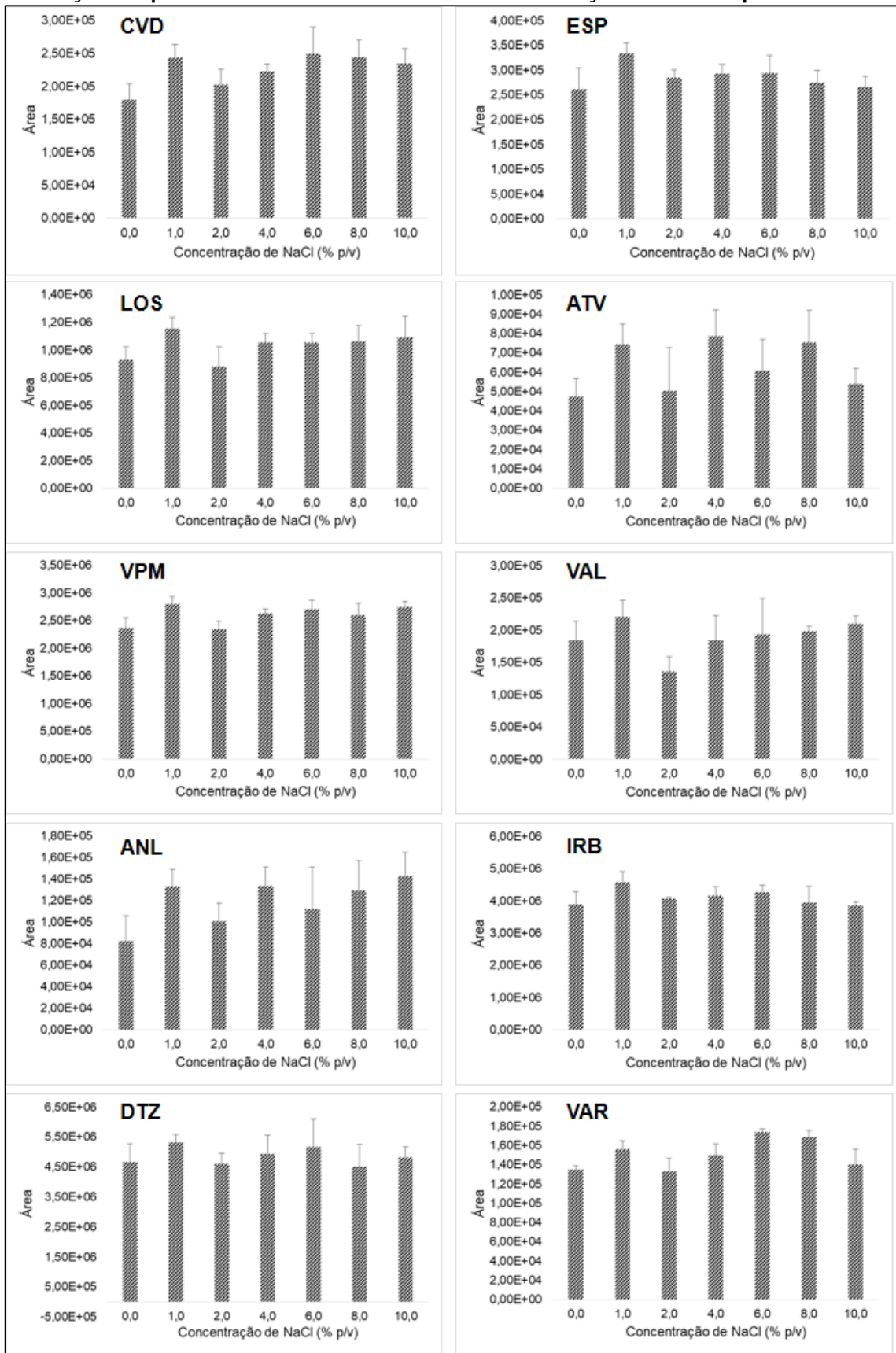
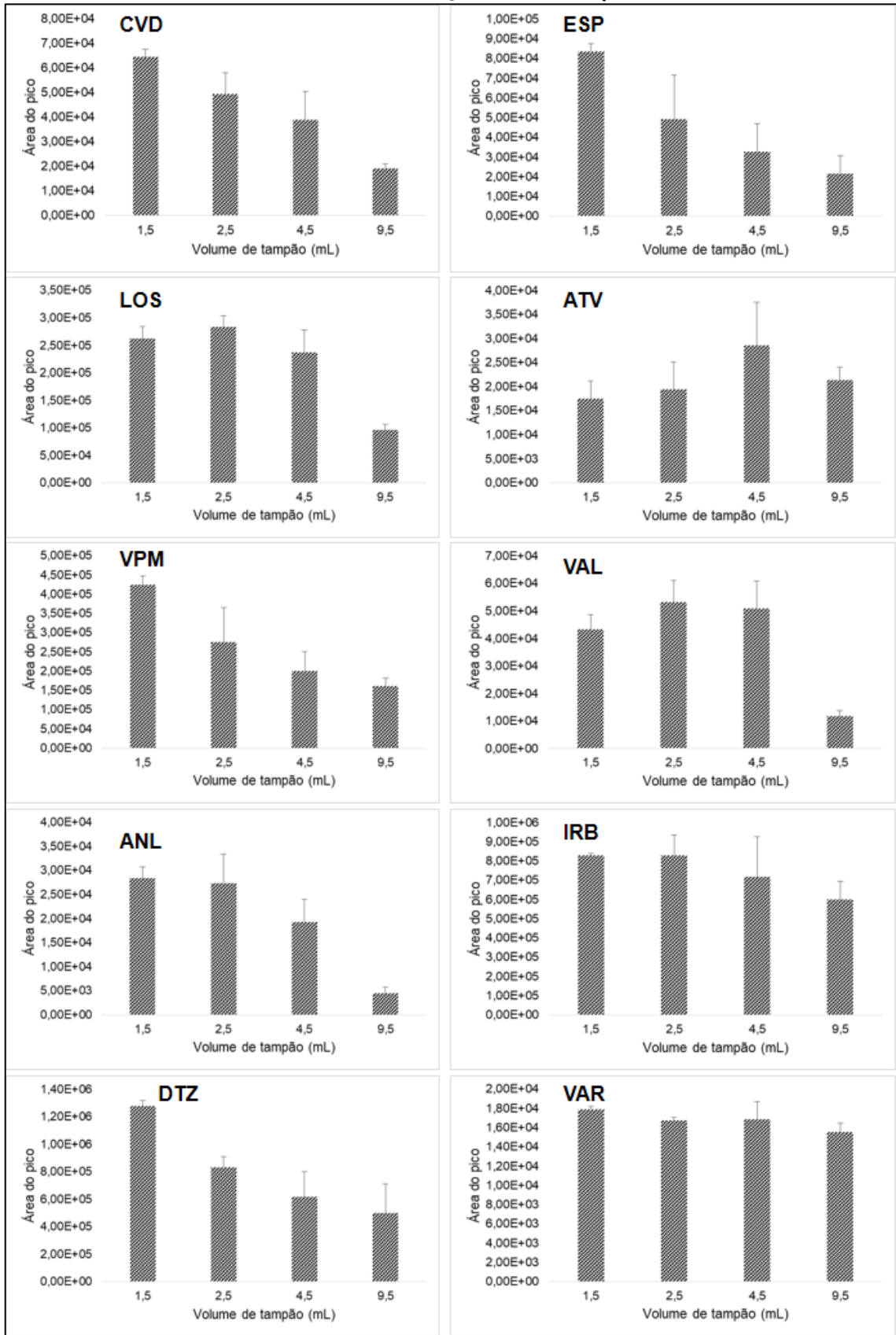


Figura 22 – Áreas dos picos dos analitos em função do volume de solução tampão adicionado à amostra durante a otimização do método por VALLME.



5.3.3.2.6 Tempo de agitação

Altas velocidades de agitação favorecem a formação de um fluxo turbulento dentro do tubo durante a etapa de formação da emulsão, ou seja, da dispersão das microgotículas do solvente extrator na amostra. Isso faz com que menores tempos de agitação sejam requeridos para que o sistema atinja o equilíbrio de partição (OJEDA; ROJAS, 2014; OJEDA; ROJAS, 2018). É importante que o sistema atinja o equilíbrio de partição, já que apenas dessa forma é possível obter extrações reproduzíveis, essenciais para análises com fins quantitativos.

A **Figura 25** (pág. 140) apresenta os gráficos construídos a partir das áreas dos picos dos analitos em função do tempo de agitação empregado para a dispersão das microgotículas do solvente orgânico. Analisando-se os gráficos, é possível observar que não houve diferença estatisticamente significativa na extração de todos os analitos da amostra entre os tempos de agitação avaliados, o que sugere que as altas velocidades de agitação empregadas (3000 rpm) fizeram com que o sistema atingisse o equilíbrio rapidamente. Além disso, observou-se que os desvios padrões para os diferentes analitos, obtidos por meio da análise em triplicata, foram baixos, demonstrando a reprodutibilidade da extração. Dessa forma, optou-se por utilizar 60 segundos como tempo de agitação para a extração dos analitos da amostra biológica, para que fosse obtido um procedimento mais rápido.

Figura 23 – Áreas dos picos dos analitos em função do solvente extrator utilizado durante a otimização do método por VALLME. DCM, diclorometano; CLF, clorofórmio; CLB, clorobenzeno; DCE, 1,2-dicloroetano.

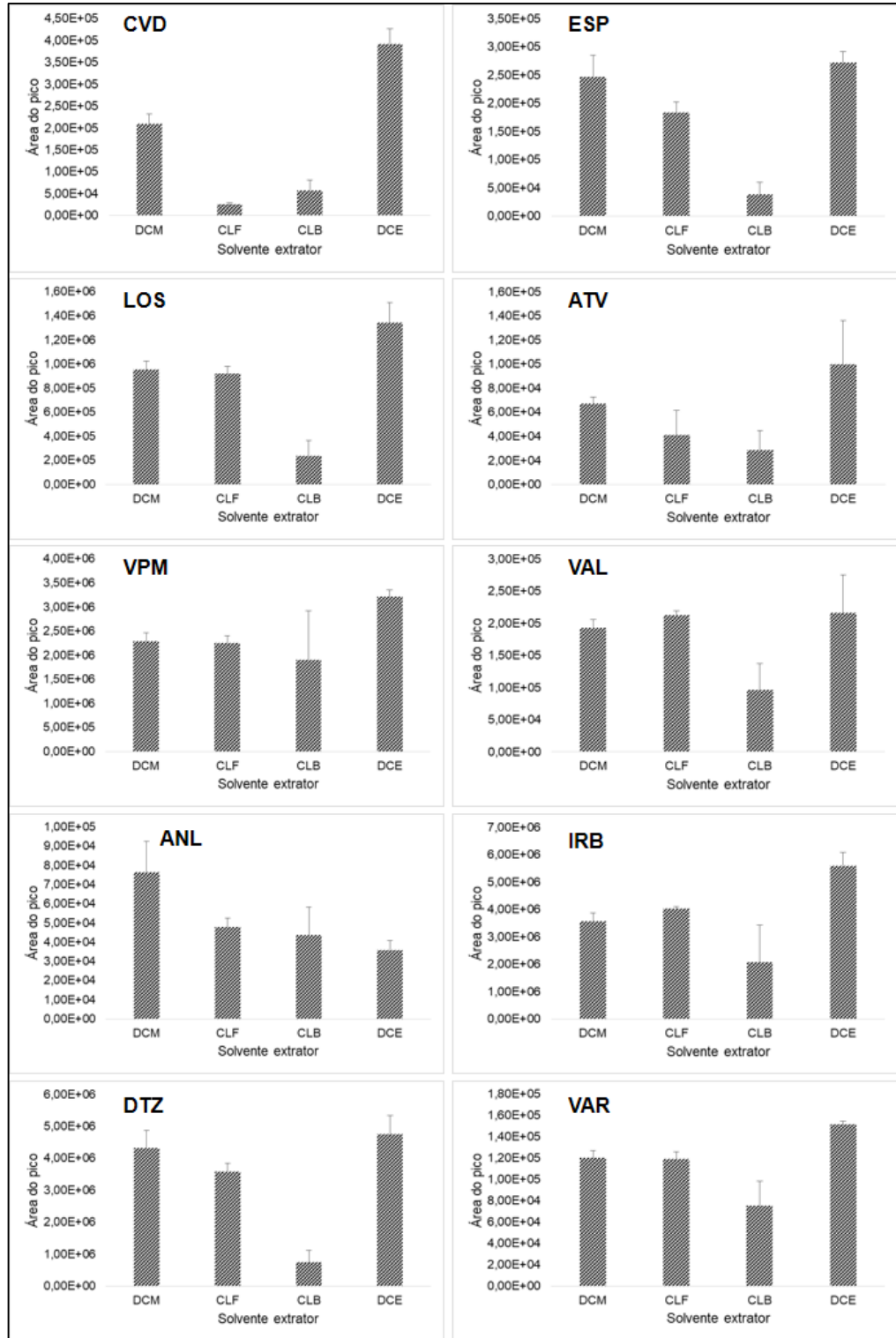


Figura 24 – Áreas dos picos dos analitos em função do volume de solvente extrator (diclorometano) utilizado durante a otimização do método por VALLME.

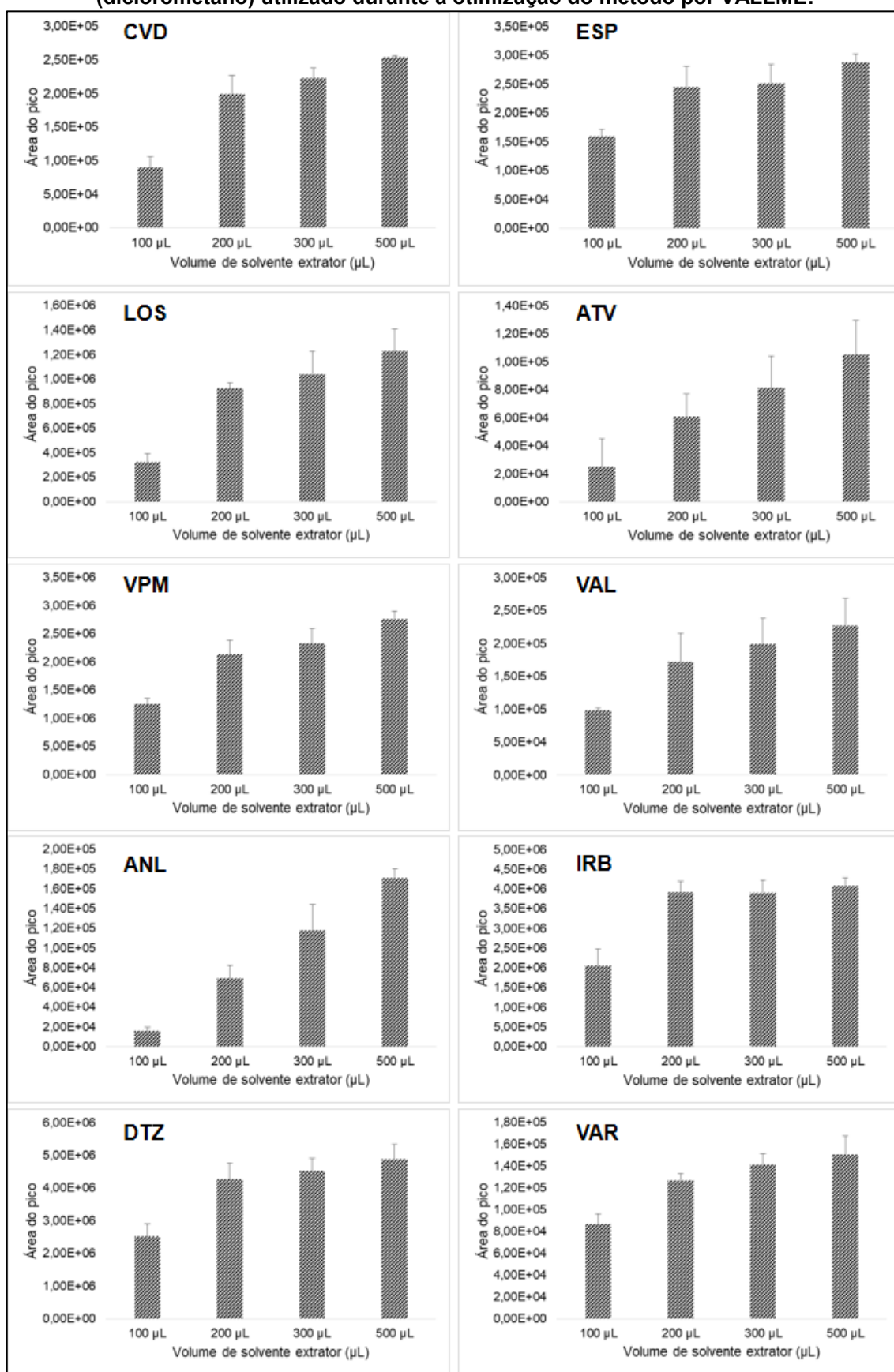
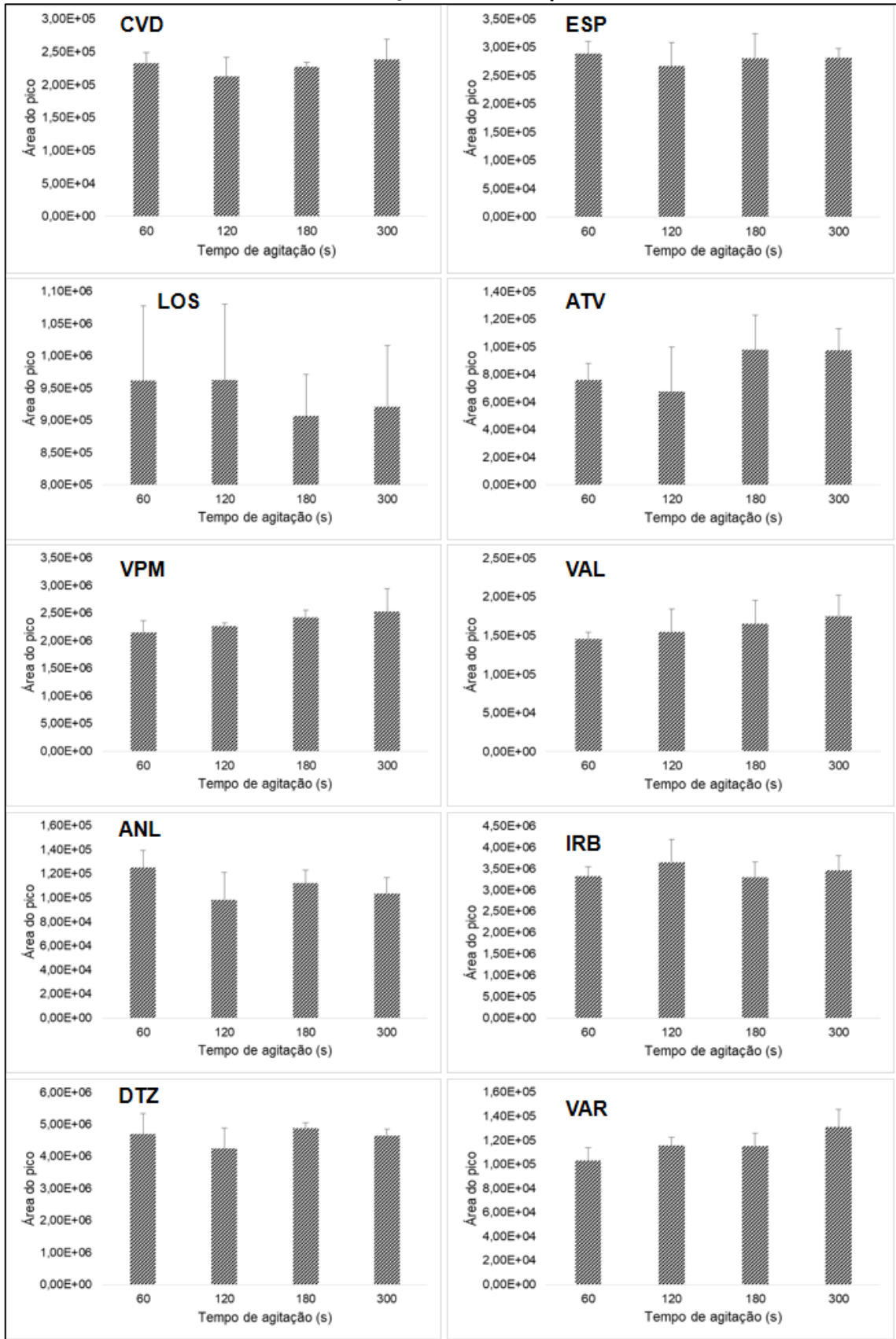
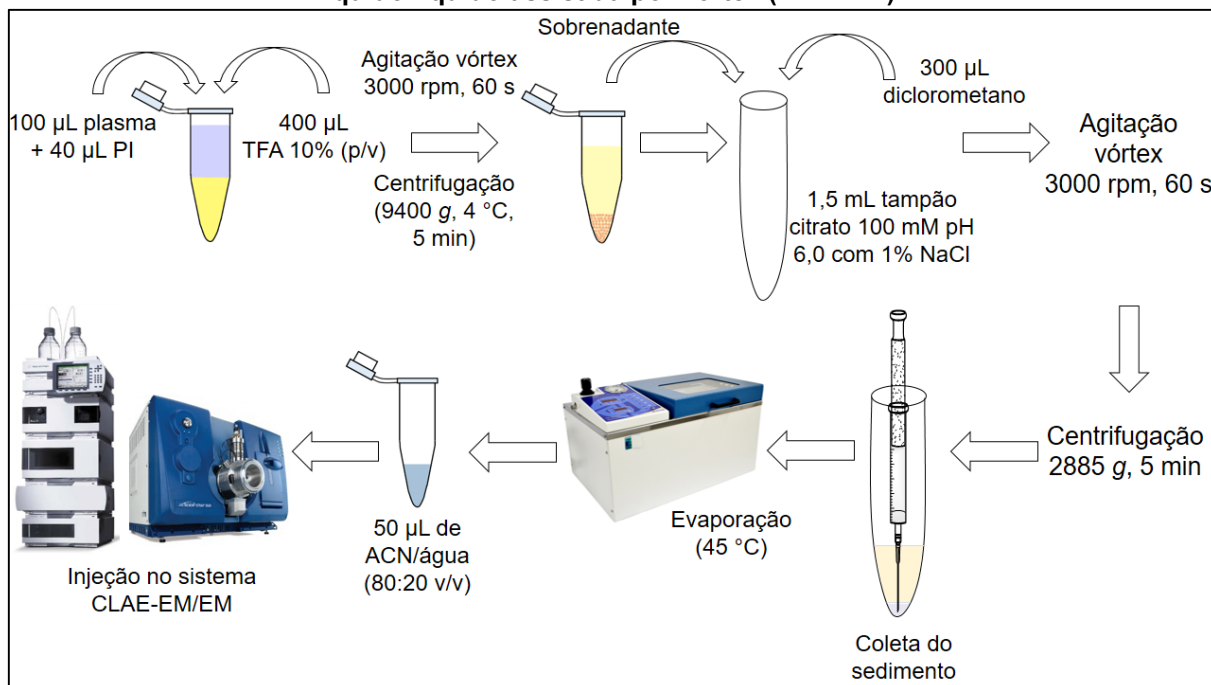


Figura 25 – Áreas dos picos dos analitos em função do tempo de agitação em vórtex utilizado durante a otimização do método por VALLME.



As condições finais da etapa de preparo de amostras, obtidas após a etapa de otimização, são essas descritas a seguir. A 100 μL da amostra de plasma, adicionaram-se 40 μL de IRB (PI) solução de trabalho e agitou-se em vórtex por 15 segundos. Adicionaram-se 400 μL de TFA 10% (m/v) e agitou-se em vórtex por 60 segundos. Centrifugou-se a amostra por 5 minutos a 9400 g e 4 $^{\circ}\text{C}$. Transferiu-se o sobrenadante para um tubo cônico de plástico de 15 mL contendo 1,5 mL de tampão citrato de sódio 100 mmol/L pH 6,0, contendo 1% de NaCl. A seguir, adicionaram-se 300 μL de diclorometano e agitou-se em vórtex a 3000 rpm por 60 segundos. As amostras foram centrifugadas a 2885 g e temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, o sedimento foi aspirado, utilizando-se uma seringa de vidro graduada, e transferido para um microtubo de plástico. O sedimento foi evaporado em concentrador de amostras sob fluxo de ar comprimido, a 45 $^{\circ}\text{C}$. O resíduo foi ressuspendido com 50 μL de uma mistura de acetonitrila e água (20:80, v/v) e injetado no cromatógrafo. Uma representação esquemática do método de preparo de amostra otimizado por VALLME é apresentado na **Figura 26**.

Figura 26 – Representação esquemática do método de preparo de amostra por microextração líquido-líquido assistida por vórtex (VALLME).



Poucos métodos para a determinação simultânea de vários fármacos em matrizes biológicas estão disponíveis na literatura científica. Alguns deles realizaram a

determinação simultânea de aproximadamente o mesmo número de analitos que o método desenvolvido neste trabalho.

A determinação simultânea de 10 fármacos anti-hipertensivos em plasma humano, empregando-se volume de amostra de 200 μL , o dobro da utilizada neste trabalho, foi realizada por De Nicolò e colaboradores (2016). Os autores empregaram a precipitação de proteínas para o preparo de amostra e a CLUE-EM/EM para a separação e detecção dos analitos. Apesar de utilizar a CLUE como técnica de separação, o tempo de corrida cromatográfica foi de 10 minutos, maior do que o obtido com o método desenvolvido e validado neste trabalho.

Por outro lado, a quantificação de 10 fármacos, incluindo-se valsartana, verapamil e varfarina, foi realizada por CLUE-UV-FL, com tempo de corrida de 8,5 minutos (GONZÁLEZ MENDIA *et al.*, 2017), próximo ao obtido neste trabalho. Entretanto, o método apresentou limites de quantificação elevados, mesmo utilizando-se volume de plasma de 500 μL .

A determinação de fármacos e metabólitos da classe dos inibidores da ECA, totalizando 10 analitos, foi realizada empregando-se apenas 50 μL de plasma. A separação e a detecção foram realizadas por CLAE-EM/EM, com tempo de corrida razoável, de 10 minutos. Os autores obtiveram limites de quantificação e recuperações adequados (ALI; LÄER; BURCKHARDT, 2018). No entanto, é importante ressaltar que o preparo das amostras foi realizado empregando-se uma técnica pouco seletiva, a precipitação de proteínas. Além disso, os analitos são da mesma classe, de forma que as condições ótimas para a extração possivelmente são semelhantes.

Apenas um método para a determinação simultânea de fármacos anti-hipertensivos foi desenvolvido empregando-se uma técnica de preparo de amostra miniaturizada, a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), após a precipitação das proteínas do plasma (JOUYBAN *et al.*, 2015). O método, para a determinação de metoprolol, propranolol, carvedilol, diltiazem e verapamil em plasma humano, realizou a separação e detecção dos analitos por CLAE-UV, com tempo de corrida de 7 minutos.

Os autores obtiveram limites de quantificação de 20 ng/mL. Apesar disso, um volume de amostra elevado, de 660 μ L, foi utilizado, além de um volume significativo de acetonitrila (1340 μ L), que foi empregada como solvente dispersante.

Na literatura, poucos métodos para a determinação de analitos em amostras biológicas por VALLME são encontrados. Um método para a determinação de metformina em plasma por CLAE-UV, com tempo de corrida de 8 minutos, foi desenvolvido e validado (ALSHISHANI *et al.*, 2016). O método emprega um elevado volume de amostra (10 mL) e obteve um elevado limite inferior de quantificação (20 μ g/mL), muito superior à concentração plasmática máxima do fármaco ($1,6 \pm 0,2$ μ g/mL) (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2006).

Até onde se sabe, essa é a primeira vez que a microextração líquido-líquido assistida por vórtex (VALLME) foi empregada para a determinação simultânea de nove fármacos. O método desenvolvido emprega pequenos volumes de plasma e de solvente orgânico, apresentou tempo de corrida cromatográfica razoável, de 8 minutos, e baixos limites de quantificação para a determinação de analitos com características físico-químicas significativamente diferentes.

5.3.4 Validação do método bioanalítico

5.3.4.1 Seletividade

Picos interferentes nos tempos de retenção de CVD, ESP, LOS, ATV, VPM, VAL, ANL, DTZ e VAR, avaliados nos cromatogramas extraídos das transições de massas de quantificação de cada analito, apresentaram áreas inferiores a 20% das áreas dos picos no LIQ nas oito amostras de plasma branco avaliadas. Além disso, picos interferentes no tempo de retenção de IRB (PI) apresentaram área inferior a 5% da área do PI. Os resultados do teste de seletividade são apresentados na **Tabela 40** e na **Figura 27** (pág. 145).

Tabela 40 – Resultados obtidos durante a avaliação da seletividade do método bioanalítico por CLAE-EM/EM.

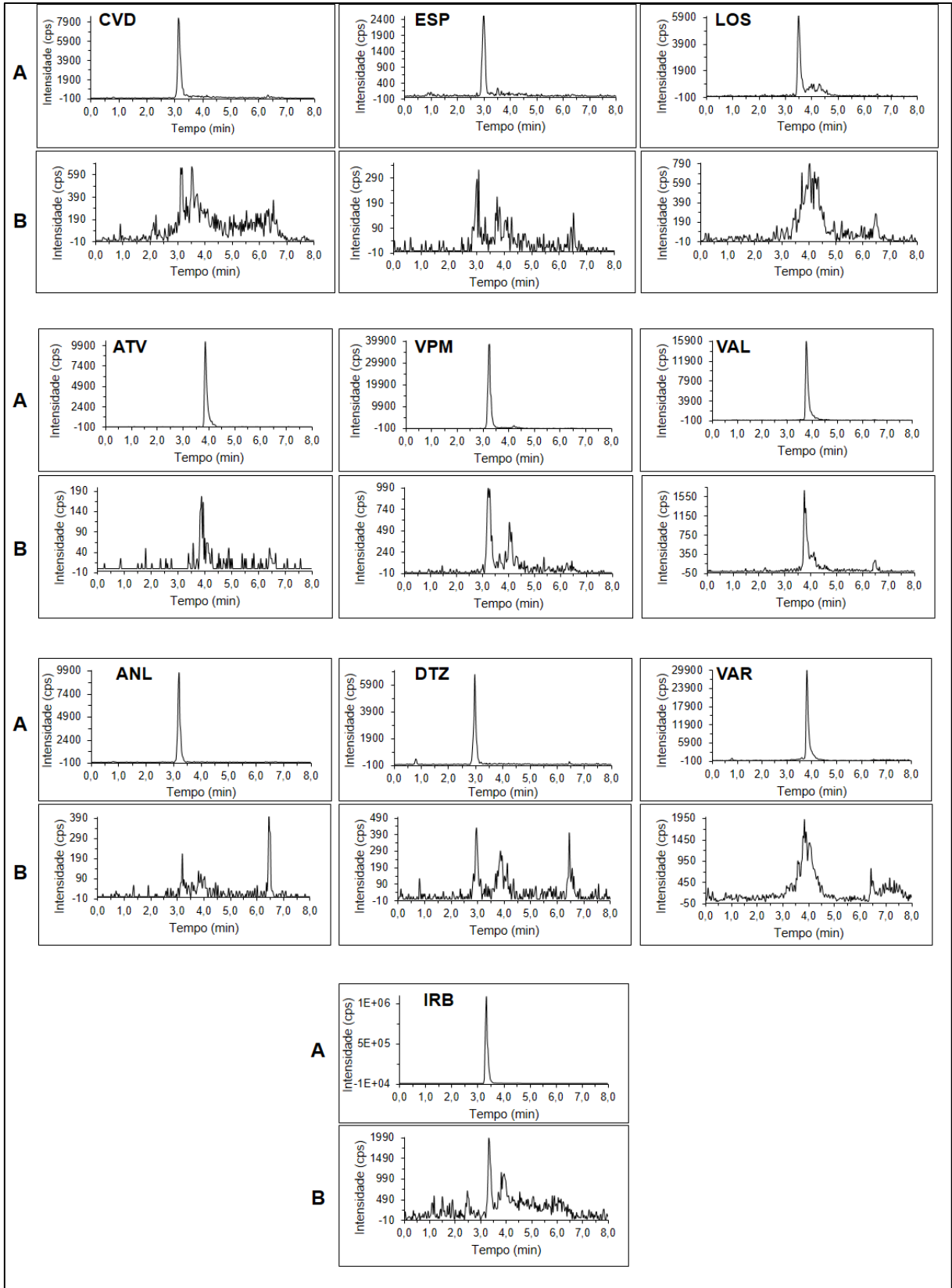
Analito	Porcentagem da área de picos interferentes em relação ao LIQ (%)							
	Plasma normal 1	Plasma normal 2	Plasma normal 3	Plasma normal 4	Plasma normal 5	Plasma hemolisado 1	Plasma hemolisado 2	Plasma lipêmico
CVD	9,24	6,50	5,99	0,00	0,00	2,48	8,32	2,67
ESP	8,58	11,58	13,70	11,15	12,86	13,91	14,57	10,98
LOS	2,08	2,42	1,87	5,31	5,38	4,37	2,49	1,37
ATV	6,68	13,14	12,09	9,01	6,51	9,53	6,77	14,76
VPM	1,92	3,58	3,36	5,52	9,44	4,68	15,60	15,15
VAL	4,80	8,01	7,53	5,71	6,67	5,44	7,31	7,09
ANL	8,67	10,91	14,39	8,87	11,31	10,24	8,51	12,80
IRB	0,18	0,30	0,27	0,46	0,39	0,34	0,26	0,28
DTZ	1,49	15,96	14,05	5,81	13,91	9,63	15,62	14,76
VAR	3,98	14,47	11,31	4,76	12,15	3,97	12,29	4,35

LIQ, limite inferior de quantificação; CVD, carvedilol; ESP, espirolactona; LOS, losartana; ATV, atorvastatina; VPM, verapamil; VAL, valsartana; ANL, anlodipino; DTZ, diltiazem; VAR, varfarina.

5.3.4.2 Efeito residual

Picos interferentes nos tempos de retenção de CVD, ESP, LOS, ATV, VPM, VAL, ANL, DTZ e VAR, avaliados nos cromatogramas extraídos das transições de massas de quantificação de cada analito, apresentaram áreas inferiores a 20% das áreas dos picos no LIQ nos cromatogramas das duas injeções de plasma branco realizadas após a injeção de uma amostra no LSQ. Além disso, picos interferentes no tempo de retenção de IRB (PI) apresentaram área inferior a 5% da área do PI. Portanto, não foi detectado efeito residual no método desenvolvido.

Figura 27 – Cromatogramas obtidos para uma amostra no LIQ (A) e uma amostra de plasma branco normal (plasma normal 1) (B) para avaliação da seletividade do método bioanalítico. Os cromatogramas (A) e (B) estão em escalas diferentes.



5.3.4.3 Efeito matriz

Os resultados para efeito matriz são apresentados na **Tabela 41**. Analisando-se os valores de FMN pode-se observar que para alguns dos analitos ocorre supressão ($FMN < 1$) ou indução iônica ($FMN > 1$). Entretanto, a normalização das áreas dos analitos com as áreas do padrão interno fez com que os valores de desvio padrão relativo, calculados para os valores de FMN das oito amostras avaliadas, fossem inferiores a 15%. Dessa forma, considerou-se que o efeito matriz observado não prejudica a confiabilidade do método bioanalítico, já que é constante para diferentes amostras de plasma avaliadas, sendo elas normais, hemolisadas ou lipêmicas. Além disso, esses resultados reforçam a necessidade de se empregar sempre curvas matrizadas durante as análises realizadas com o método desenvolvido.

Tabela 41 – Resultados obtidos para a avaliação do efeito matriz do método bioanalítico por CLAE-EM/EM.

Analito	CQB		CQA	
	FMN (média)	CV (%)	FMN (média)	CV (%)
CVD	0,87	6,01	1,32	6,92
ESP	1,86	8,27	1,54	5,09
LOS	0,64	3,89	1,07	4,14
ATV	0,61	4,41	1,02	6,98
VPM	1,85	6,18	1,34	5,03
VAL	0,59	5,29	0,97	5,19
ANL	4,51	4,82	2,11	15,04
DTZ	1,70	7,11	1,36	3,76
VAR	0,57	6,46	0,98	4,43

CQB, controle de qualidade de baixa concentração; CQA, controle de qualidade de alta concentração; FMN, fator de matriz normalizado; CV (%), coeficiente de variação porcentual; CVD, carvedilol; ESP, espirolactona; LOS, losartana; ATV, atorvastatina; VPM, verapamil; VAL, valsartana; ANL, anlodipino; DTZ, diltiazem; VAR, varfarina.

5.3.4.4 Linearidade

As curvas analíticas para todos os analitos foram avaliadas priorizando-se a escolha do modelo matemático mais simples. Avaliou-se se as variâncias dos desvios das concentrações obtidas com os modelos utilizados em relação às concentrações nominais eram constantes nas faixas de concentração dos analitos. Para a escolha do melhor fator de ponderação para as curvas analíticas avaliadas, calcularam-se as somas dos desvios obtidos com cada fator. O fator de ponderação que apresentou a

menor soma dos desvios foi escolhido para cada curva. Na **Tabela 42** são apresentados os resultados obtidos após a análise das curvas analíticas de todos os analitos, com exceção do anlodipino. As curvas analíticas do ANL não foram consideradas aprovadas utilizando-se nenhum dos modelos matemáticos e fatores de ponderação disponíveis no software. Por isso, os resultados obtidos com as curvas analíticas de ANL e com os demais ensaios de validação, descritos a seguir, não são apresentados. As curvas analíticas dos demais analitos, obtidas no dia em que foi feita a aplicação do método bioanalítico a amostras reais, são apresentadas na **Figura 28** (pág. 148).

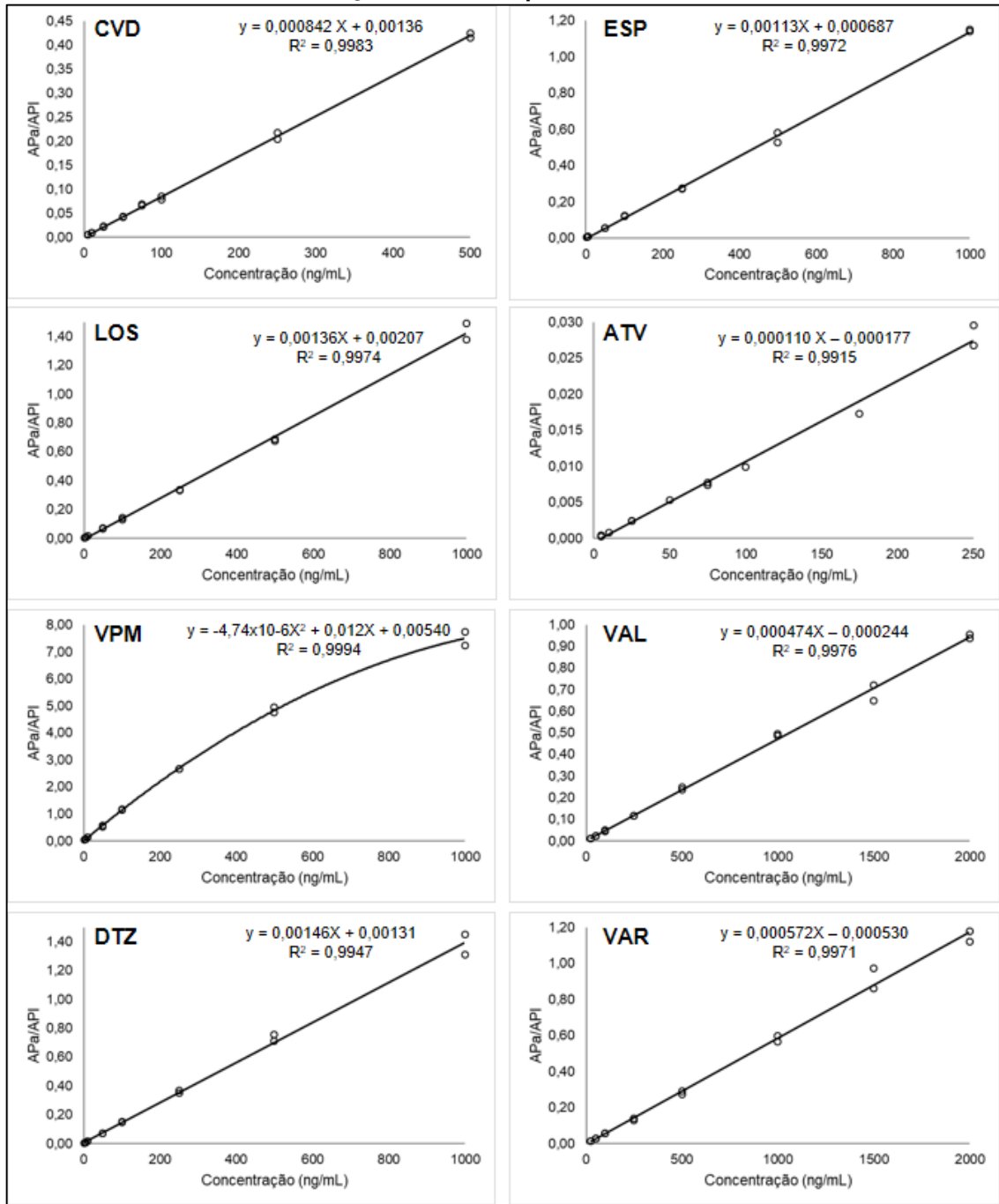
Tabela 42 – Parâmetros das três curvas analíticas obtidas para cada analito durante a validação do método bioanalítico por CLAE-EM/EM.

Analito	Curva analítica	Modelo matemático	Ponderação	Faixa de concentração (ng/mL)	Equação da reta	R ²
CVD	1	Linear	1/Y ²	5,0 – 500,0	0,000842 X + 0,00136	0,9983
	2				0,000959X + 0,00169	0,9966
	3				0,000751X + 0,00283	0,9973
ESP	1	Linear	1/Y ²	2,0 – 1000,0	0,00113X + 0,000687	0,9972
	2				0,00107X + 0,000946	0,9907
	3				0,000948X + 0,000188	0,9956
LOS	1	Linear	1/X ²	2,0 – 1000,0	0,00136X + 0,00207	0,9974
	2				0,00140X + 0,00170	0,9941
	3				0,00346X + 0,00505	0,9951
ATV	1	Linear	1/X ²	5,0 – 250,0	0,000110 X – 0,000177	0,9915
	2				0,000168X + 9,55x10 ⁻⁶	0,9949
	3				0,000227X + 0,000166	0,9943
VPM	1	Quadrático	1/X	2,0 – 1000,0	-4,74x10 ⁻⁶ X ² + 0,012X + 0,00540	0,9994
	2				-4,59x10 ⁻⁶ X ² + 0,011X + 0,0236	0,9990
	3				-4,89x10 ⁻⁶ X ² + 0,011X + 0,00938	0,9962
VAL	1	Linear	1/X ²	25,0 – 2000,0	0,000474X – 0,000244	0,9976
	2				0,000536X + 0,000298	0,9980
	3				0,000434X – 0,00213	0,9957
DTZ	1	Linear	1/X ²	2,0 – 1000,0	0,00146X + 0,00131	0,9947
	2				0,00145X + 0,00149	0,9941
	3				0,00115X + 0,000460	0,9949
VAR	1	Linear	1/Y ²	25,0 – 2000,0	0,000572X – 0,000530	0,9971
	2				0,000633X + 0,00869	0,9963
	3				0,000337X + 0,00298	0,9952

R², coeficiente de determinação; CVD, carvedilol; ESP, espirolactona; LOS, losartana; ATV, atorvastatina; VPM, verapamil; VAL, valsartana; DTZ, diltiazem; VAR, varfarina.

Como é possível observar, todas as curvas analíticas apresentaram coeficientes de determinação superiores a 0,99, demonstrando o ajuste dos modelos matemáticos selecionados. Além disso, em todas as curvas, pelo menos 75% dos padrões de calibração foram considerados aprovados, ou seja, apresentaram exatidão entre 80% e 120% no LIQ e entre 85% e 115% nos demais níveis de concentração.

Figura 28 – Curvas analíticas obtidas durante a avaliação da linearidade no primeiro dia da validação do método por CLAE-EM/EM.



5.3.4.5 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção obtidos com o método por CLAE-EM/EM foram de: 1,5 ng/mL para CVD e ATV, 0,6 ng/mL para LOS, ESP, VPM e DTZ, 7,5 ng/mL para VAL e VAR, e 0,3 ng/mL para ANL. Os limites de quantificação foram de: 5,0 ng/mL para CVD e ATV, 2,0 ng/mL para LOS, ESP, VPM e DTZ, 25,0 ng/mL para VAL e VAR. Embora não tenha sido obtido modelo matemático satisfatório para a determinação de ANL, o seu limite de quantificação, calculado com base na razão S/R, foi de 1,0 ng/mL. Os limites de detecção e quantificação obtidos para a análise desses fármacos por CLAE-EM/EM reforça a elevada detectabilidade dessa técnica.

5.3.4.6 Precisão e exatidão

A **Tabela 43** apresenta os resultados obtidos durante os ensaios para a avaliação da precisão e exatidão do método bioanalítico.

Tabela 43 – Resultados obtidos durante os testes para a avaliação da precisão, da exatidão e da recuperação do método bioanalítico por CLAE-EM/EM.

Analito	Nível	Precisão (DPR %)				Exatidão (%)				Recuperação média (%) (DPR %)
		Intracorrida			Intercorridas	Intracorrida			Intercorridas	
		1º dia	2º dia	3º dia		1º dia	2º dia	3º dia		
CVD	CQLIQ	4,58	10,52	16,22	12,71	96,13	91,56	80,20	89,30	n.a.
	CQB	5,01	8,57	7,59	7,35	100,52	103,95	96,78	100,42	27,00 (13,28)
	CQM	2,70	3,09	3,98	3,56	99,26	97,28	101,51	99,35	30,28 (11,98)
	CQA	0,53	5,13	7,44	5,18	108,56	105,99	110,49	108,35	32,76 (9,59)
ESP	CQLIQ	9,96	2,71	8,43	10,87	99,62	83,95	98,60	94,05	n.a.
	CQB	4,13	13,06	11,08	10,30	106,36	105,47	114,96	108,93	88,68 (9,76)
	CQM	5,54	2,90	3,79	3,91	100,28	100,87	100,95	100,70	77,24 (13,50)
	CQA	5,16	10,27	4,79	9,58	99,47	91,82	108,70	100,00	66,47 (5,25)
LOS	CQLIQ	8,90	9,52	2,00	15,46	80,81	83,60	109,03	88,79	n.a.
	CQB	8,40	4,07	3,84	6,00	95,08	101,25	97,50	97,70	38,66 (11,48)
	CQM	6,47	5,99	5,65	7,85	102,17	106,48	93,54	100,32	40,46 (9,89)
	CQA	3,60	3,14	13,65	8,16	102,68	107,38	103,21	104,21	42,96 (6,40)
ATV	CQLIQ	6,68	4,66	5,22	9,81	105,52	92,14	110,82	100,31	n.a.
	CQB	9,96	9,65	8,73	9,25	110,51	104,44	112,74	109,57	3,20 (12,19)
	CQM	4,91	4,25	4,49	5,06	102,82	97,77	104,40	101,94	3,46 (12,09)
	CQA	5,94	4,85	1,68	5,36	107,97	101,66	108,29	105,95	3,90 (8,39)
VPM	CQLIQ	11,23	9,24	6,87	13,61	103,03	81,71	86,79	91,14	n.a.
	CQB	1,73	8,93	6,23	6,92	113,88	104,79	113,20	110,62	72,34 (6,37)
	CQM	9,80	3,45	4,89	6,16	101,10	102,25	100,73	101,36	80,32 (7,37)
	CQA	1,63	6,91	8,30	6,91	98,91	102,40	109,90	102,79	85,05 (5,69)

Tabela 43 – Resultados obtidos durante os testes para a avaliação da precisão, da exatidão e da recuperação do método bioanalítico por CLAE-EM/EM (continuação).

Analito	Nível	Precisão (DPR %)				Exatidão (%)				Recuperação média (%) (DPR %)
		Intracorrida			Intercorridas	Intracorrida			Intercorridas	
		1º dia	2º dia	3º dia		1º dia	2º dia	3º dia		
VAL	CQLIQ	2,63	3,58	11,08	9,85	103,05	86,24	95,22	94,84	n.a.
	CQB	6,25	3,09	4,16	6,12	102,65	96,60	106,90	102,05	14,16 (8,12)
	CQM	6,46	3,49	4,77	9,73	108,16	91,07	109,55	102,93	15,25 (8,38)
	CQA	5,77	6,32	4,45	9,81	103,85	91,85	112,14	102,61	15,17 (13,23)
	CQD	1,92	13,17	7,52	9,10	110,18	96,44	104,55	104,25	n.a.
DTZ	CQLIQ	5,35	10,09	14,66	11,12	83,59	83,30	91,25	86,05	n.a.
	CQB	3,63	8,75	7,90	8,02	103,99	114,79	112,36	110,38	87,50 (9,38)
	CQM	4,89	6,73	2,99	5,64	102,04	94,80	99,80	98,88	81,30 (4,80)
	CQA	3,56	9,62	7,48	8,17	101,45	93,55	104,32	99,77	65,71 (4,44)
	CQD	4,26	10,15	14,18	15,80	112,51	89,92	95,73	98,87	n.a.
VAR	CQB	3,21	8,87	6,26	9,85	111,22	93,92	95,95	100,37	28,61 (6,19)
	CQM	5,03	5,73	6,59	9,23	103,89	87,88	101,68	97,82	27,45 (9,59)
	CQA	4,61	8,60	8,14	9,28	102,94	95,16	110,56	102,89	27,45 (7,80)
	CQD	11,14	3,87	2,46	7,88	105,09	95,22	100,08	100,13	n.a.

DPR, desvio padrão relativo; n.a., não se aplica; CQLIQ, controle de qualidade no limite inferior de quantificação; CQB, controle de qualidade de baixa concentração; CQM, controle de qualidade de média concentração; CQA, controle de qualidade de alta concentração; CQD, controle de qualidade de diluição; CVD, carvedilol; ESP, espironolactona; LOS, losartana; ATV, atorvastatina; VPM, verapamil; VAL, valsartana; DTZ, diltiazem; VAR, varfarina.

É possível observar que todas as amostras de controle de qualidade apresentaram exatidão entre 80% e 120% no LIQ e entre 85% e 115% nos demais níveis de concentração. Além disso, os valores de DPR obtidos nos diferentes níveis de controle de qualidade foram inferiores a 20% no LIQ e a 15% nos demais níveis. Os valores de exatidão e DPR intercorridas também atenderam os critérios acima. Dessa forma, o método foi considerado preciso e exato. Exatidão entre 85% e 115% e valores de DPR inferiores a 15%, obtidos a partir das amostras de CQD, confirmaram a integridade da diluição.

5.3.4.7 Recuperação

Os resultados de recuperação dos analitos da amostra biológica são apresentados na **Tabela 43** (pág. 149). Embora para alguns analitos (CVD, ATV, VAL e VAR) os valores de recuperação sejam baixos, observou-se que estes foram constantes em toda a faixa de concentração avaliada. Além disso, obtiveram-se limites inferiores de quantificação adequados para todos os analitos.

5.3.4.8 Estabilidade dos analitos na matriz biológica

Os resultados dos testes de estabilidade dos analitos em plasma são apresentados na **Tabela 44**.

Tabela 44 – Resultados obtidos durante a avaliação da estabilidade dos analitos em plasma.

Analito	Tipo de controle	ECD (25 °C por 4 h)		EPP (6 °C por 24 h)		ECC (3 ciclos de -70 °C a 25 °C)		ELD (-70 °C por 30 dias)	
		Exatidão (%)	Precisão (DPR %)	Exatidão (%)	Precisão (DPR %)	Exatidão (%)	Precisão (DPR %)	Exatidão (%)	Precisão (DPR %)
CVD	CQB	108,38	10,31	110,27	14,17	103,98	5,91	104,36	6,00
	CQA	106,96	6,51	105,97	7,37	112,74	5,21	109,34	7,36
ESP	CQB	111,97	4,01	111,35	1,94	113,99	1,59	109,05	8,23
	CQA	109,84	7,08	101,61	1,65	102,74	3,10	100,83	4,00
LOS	CQB	112,35	3,83	110,23	3,95	101,32	4,77	112,90	12,10
	CQA	102,29	6,06	99,23	4,59	106,16	4,93	97,14	3,30
ATV	CQB	113,92	9,92	112,41	9,51	108,67	9,43	107,62	6,25
	CQA	112,87	1,94	109,92	7,07	102,68	9,04	101,23	5,82
VPM	CQB	109,04	6,54	107,21	4,61	110,09	7,35	111,70	6,04
	CQA	110,48	11,46	110,06	9,36	109,28	10,38	106,18	10,49
VAL	CQB	111,92	4,87	113,24	1,86	114,32	6,10	114,31	11,15
	CQA	111,75	3,43	113,29	3,08	107,15	5,38	99,28	2,26
DTZ	CQB	109,71	3,06	111,43	13,94	111,67	5,07	112,41	9,70
	CQA	107,52	7,45	102,81	1,52	104,25	6,24	101,09	3,33
VAR	CQB	114,90	9,03	112,34	7,54	96,64	10,78	107,05	14,12
	CQA	114,07	2,41	114,91	1,76	111,22	7,34	106,15	2,22

ECD, estabilidade de curta duração; EPP, estabilidade de pós-processamento; ECC, estabilidade de congelamento e descongelamento; ELD, estabilidade de longa duração; DPR, desvio padrão relativo; CQB, controle de qualidade de baixa concentração; CQA, controle de qualidade de alta concentração; CVD, carvedilol; ESP, espironolactona; LOS, losartana; ATV, atorvastatina; VPM, verapamil; VAL, valsartana; DTZ, diltiazem; VAR, varfarina.

Analisando-se os resultados apresentados, é possível observar que todos os valores de exatidão obtidos nos testes de estabilidade de curta duração, pós-processamento, após ciclos de congelamento e descongelamento e de longa duração estão entre 85% e 115%, demonstrando que os analitos são estáveis na amostra biológica nas condições empregadas para a avaliação, e que são aquelas usualmente empregadas na execução do método bioanalítico.

5.3.5 Aplicação do método bioanalítico

Na **Tabela 45** são apresentados os resultados de concentração plasmática para CVD, LOS, DTZ, ATV e VAR, obtidos com o método desenvolvido e validado. A **Figura 29** (pág. 153) apresenta os cromatogramas obtidos para uma das amostras analisadas.

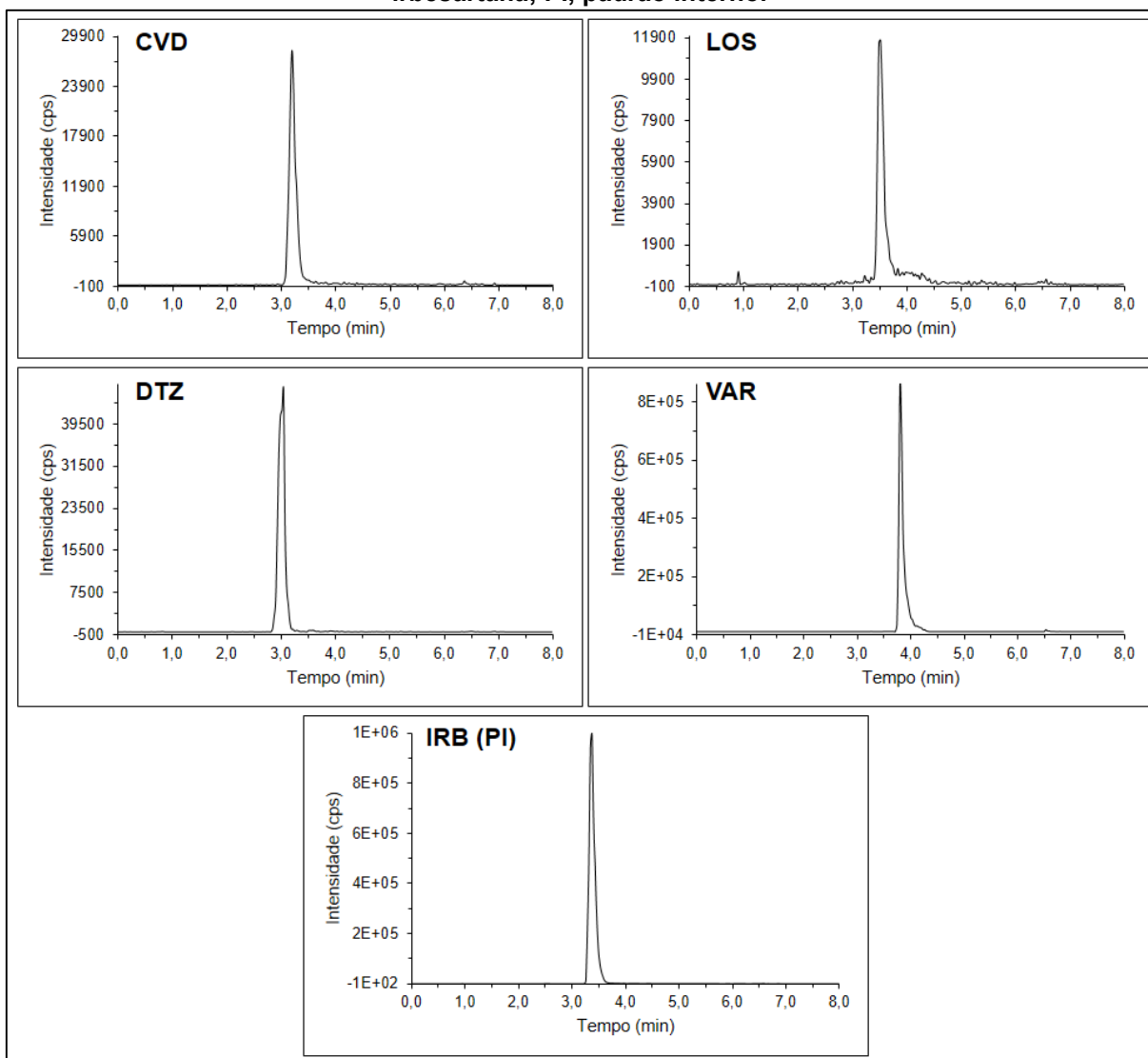
Tabela 45 – Resultados de concentração plasmática obtidos para CVD, LOS, DTZ, ATV e VAR nas amostras reais avaliadas, obtidos com o método desenvolvido e validado.

Amostra	Fármaco – concentração plasmática (ng/mL) (DPR %) (n = 3)				
	CVD	LOS	DTZ	ATV	VAR
01	n.d.	4,55 (2,53)	348,53 (5,77)	n.d.	1966,67 (4,77)
02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	617,90 (3,55)
03	34,80 (0,25)	n.d.	n.d.	n.d.	883,47 (6,08)
04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1733,33 (3,71)
05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1270,67 (2,05)
06	176,90 (4,03)	n.d.	n.d.	n.d.	1054,93 (8,81)
07	134,57 (12,19)	23,88 (0,59)	n.d.	n.d.	1793,00 (6,91)
08	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2091,00 (12,58)*
09	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1064,77 (14,24)
10	100,35 (10,52)	59,43 (7,16)	n.d.	n.d.	1232,00 (6,20)
11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	940,63 (8,83)
12	61,09 (6,84)	3,32 (1,77)	44,29 (2,88)	n.d.	1810,67 (11,21)
13	n.d.	n.d.	n.d.	8,44 (5,78)	1513,00 (14,83)
14	47,65 (11,01)	24,54 (5,17)	n.d.	n.d.	1181,33 (0,42)
15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1570,67 (4,60)
16	86,13 (5,38)	96,68 (2,65)	n.d.	n.d.	1947,33 (3,23)
17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1784,00 (10,01)
18	15,32 (8,90)	n.d.	n.d.	n.d.	2317,00 (4,10)*
19	47,77 (11,53)	97,06 (0,57)	n.d.	n.d.	994,37 (6,61)
20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	840,60 (5,35)

CVD, carvedilol; LOS, losartana; DTZ, diltiazem; ATV, atorvastatina; VAR, varfarina; n.d., não detectado; *para a quantificação inequívoca, essa amostra deveria ter sido diluída.

A aplicação do método a amostras reais comprovou a sua adequabilidade e confiabilidade para análise de amostras de plasma contendo carvedilol, losartana, diltiazem, atorvastatina e varfarina. Apesar de as amostras analisadas não conterem espironolactona, verapamil e valsartana, estes fármacos também poderiam ser determinados. O método desenvolvido mostrou, assim, ser abrangente para a determinação de oito fármacos comumente utilizados na terapia da hipertensão arterial e dislipidemias.

Figura 29 – Cromatogramas obtidos para a amostra 12 utilizando-se o método validado. Concentrações plasmáticas: CVD – 61,09 ng/mL, LOS – 3,32 ng/mL, DTZ – 44,29 ng/mL, VAR – 1810,67 ng/mL. CVD, carvedilol; LOS, losartana; DTZ, diltiazem; VAR, varfarina; IRB, irbesartana; PI, padrão interno.



Além disso, como pode ser notado na **Tabela 45** (pág. 152), todas as amostras apresentaram varfarina, em diferentes níveis de concentração, variando de 617,90 a 2317,00 ng/mL. Como as amostras foram obtidas de voluntários atendidos em Ambulatório de Anticoagulação do Hospital das Clínicas da UFMG, esse resultado era esperado. O conhecimento da concentração plasmática de varfarina é muito útil para a monitorização terapêutica de pacientes acometidos por diferentes doenças tromboembólicas. Este fármaco apresenta ampla variabilidade de dose-resposta ao tratamento, sendo de baixo índice terapêutico. Normalmente, a eficiência e segurança da terapia anticoagulante são avaliadas pela determinação da Razão Normalizada Internacional (RNI), que é um exame calculado a partir da atividade de protrombina e

reflete o tempo de coagulação sanguínea (AHOUAGI *et al.*, 2013). Assim, a determinação da concentração plasmática de varfarina pode ser uma informação adicional para o ajuste de dose e acompanhamento da adesão ao tratamento.

6 CONCLUSÕES

Irbesartana, insumo farmacêutico ativo, foi obtida e utilizada nos desenvolvimentos de métodos bioanalíticos. O fármaco foi extraído de comprimidos comerciais e purificado por recristalização, tendo sido caracterizado por cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência, determinação do ponto de fusão e espectroscopias de absorção no infravermelho e de ressonância magnética nuclear de ^1H , ^{13}C e DEPT 135. A irbesartana obtida apresentou alto grau de pureza.

Duas técnicas de preparo de amostra convencionais (precipitação de proteínas e extração líquido-líquido) e uma miniaturizada (microextração em sorvente empacotado – MEPS) foram comparadas para a extração de olmesartana, irbesartana, losartana e valsartana de amostras de plasma humano. A precipitação de proteínas apresentou seletividade comparável às demais técnicas e os melhores valores de recuperação para todos os analitos.

Método bioanalítico para a determinação simultânea, em plasma humano, de irbesartana, losartana, olmesartana e valsartana, fármacos amplamente utilizados na terapia anti-hipertensiva, foi desenvolvido por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (CLAE-FL) e preparo de amostra por precipitação de proteínas. O método de preparo de amostra foi otimizado por planejamento fatorial em dois níveis. O método bioanalítico demonstrou ser simples, rápido e barato, apresentando recuperações razoáveis e tempo de corrida cromatográfica de 13 minutos. O método foi validado, demonstrando ser seletivo, preciso, exato e linear na faixa de 25,0 – 1500,0 ng/mL para olmesartana e valsartana, de 25,0 – 2500,0 ng/mL para irbesartana e de 35,0 – 2500,0 ng/mL para losartana. O método foi aplicado com sucesso na análise de amostras de plasma humano provenientes de voluntários.

Método bioanalítico para a determinação simultânea, em plasma humano, de anlodipino, carvedilol, espirolactona, losartana, atorvastatina, verapamil, valsartana, diltiazem e varfarina foi desenvolvido por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM) e preparo de amostra por microextração líquido-líquido assistida por vórtex (VALLME). O

método bioanalítico demonstrou ser simples e rápido, apresentando recuperações razoáveis e tempo de corrida cromatográfica de 8 minutos. O método foi validado, demonstrando ser seletivo, preciso, exato e linear para todos os analitos, com exceção do verapamil e do anlodipino. As curvas analíticas obtidas para o verapamil se ajustaram melhor ao modelo quadrático, ao passo que não foi possível obter um modelo satisfatório para o anlodipino, de forma que não se pode quantificar este fármaco empregando-se o método desenvolvido e validado. O método foi aplicado com sucesso na análise de amostras de plasma humano provenientes de voluntários.

Os métodos bioanalíticos desenvolvidos e validados podem ser ferramentas importantes para a monitorização terapêutica, para a avaliação da adesão dos pacientes ao tratamento farmacológico, para a realização de estudos farmacocinéticos, sejam eles para novos medicamentos ou para estudos de bioequivalência, e para a realização de estudos toxicológicos.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-REHIM, M. Microextraction by packed sorbent (MEPS): A tutorial. *Analytica Chimica Acta*, v. 701, p. 119-128, 2011.
- ABDEL-REHIM, M. New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications. I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 801, p. 317-321, 2004.
- ABDEL-REHIM, M. Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 2569-2580, 2010.
- ABU-BAKAR, N.-B.; MAKAHLEH, A.; SAAD, B. Vortex-assisted liquid–liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography for the determination of furfurals and patulin in fruit juices. *Talanta*, v. 120, p. 47-54, 2014.
- AHMED, S.; ATIA, N. N.; ALI, M. F. B. Ultrasound assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography designated for bioavailability studies of felodipine combinations in rat plasma. *Journal of Chromatography B*, v. 1046, p. 200-210, 2017.
- AHOUAGI, A. E.; RIBEIRO, D. D.; AZEVEDO, E. A.; SILVA, E. V.; MARTINS, M. A. P.; NASCIMENTO, M. M. G.; ROSA, M. B.; ANACLETO, T. A. (ed.). Varfarina: erros de medicação, riscos e práticas seguras na utilização: a prevenção da ocorrência de eventos adversos envolvendo a varfarina é uma prioridade para a segurança do paciente. 2. ed. *Boletim ISMP*, v. 2, n. 4, 2013. 5 p. Disponível em: <https://www.ismp-brasil.org/site/wp-content/uploads/2015/07/V2N4.pdf>. Acesso em: 02 dez. 2020.
- ALI, M.; LÄER, S.; BURCKHARDT, B. B. LC-MS/MS method for screening of intoxication and drug adherence of angiotensin-converting enzyme inhibitors in plasma. *Bioanalysis*, v. 10, n. 23, p. 1955–1967, 2018.
- ALMEIDA, M. O. *Desenvolvimento e validação de métodos analíticos e bioanalíticos para os fármacos anlodipino e olmesartana medoxomila, em dose fixa combinada*. [Dissertação] Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2013.
- ALSHISHANI, A.; MAKAHLEH, A.; YAP, H. F.; GUBARTALLAH, E. A.; SALHIMI, S. M.; SAAD, B. Ion-pair vortex assisted liquid-liquid microextraction with back extraction coupled with high performance liquid chromatography-UV for the determination of metformin in plasma. *Talanta*, v. 161, p. 398-404, 2016.
- ANDRADE-EIROA, A.; CANLE, M.; LEROY-CANCELLIERI, V.; CERDÀ, V. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). *Trends in Analytical Chemistry*, v. 80, p. 641-654, 2016.

ANGELICO, F.; BARATTA, F.; DEL BEN, M. Current ways of treating dyslipidemias to prevent atherosclerosis. *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, v. 17, n. 2, p. 125-129, 2013.

BANERJEE, S.; MAZUMDAR, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *International Journal of Analytical Chemistry*, v. 2012, article 282574, 2012.

BAUER, M.; HARRIS, R. K.; RAO, R. C.; APPERLEY, D. C.; RODGER, C. A. NMR study of desmotropy in Irbesartan, a tetrazole-containing pharmaceutical compound. *Journal of the Chemical Society, Perking Trans 2*, p. 475-481, 1998.

BECCARIA, M.; CABOOTER, D. Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis. *Analyst*, v. 145, p. 1129-1157, 2020.

BHATIA, N. M.; GURAV, S. B.; JADHAV, S. D.; BHATIA, M. S. RP-HPLC method for simultaneous estimation of atorvastatin calcium, losartan potassium, atenolol, and aspirin from tablet dosage form and plasma. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, v. 35, n. 3, p. 428-443, 2012.

BLANCHARD, J. Evaluation of the relative efficacy of various techniques for deproteinizing plasma samples prior to high performance liquid chromatography analysis. *Journal of Chromatography B*, v. 226, p. 455-460, 1981.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC no. 27, de 17 de Maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, Poder Executivo, de 22 de Maio de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2017. Brasília: Ministério da Saúde; 2017.

BRITISH Pharmacopoeia 2014. London: Her majesty's Stationary Office, 2013.

BRITISH Pharmacopoeia 2020. London: Her majesty's Stationary Office, 2019.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. Goodman & Gilman. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 11 ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2006. 1821 p.

BYLDA, C.; THIELE, R.; KOBOLD, U.; VOLMER, D. A. Recent advances in sample preparation techniques to overcome difficulties encountered during quantitative analysis of small molecules from biofluids using LC-MS/MS. *Analyst*, v. 139, p. 2265-2276, 2014.

CAGIGAL, E.; GONZÁLEZ, L.; ALONSO, R. M.; JIMÉNEZ, R. M. pKa determination of angiotensin II receptor antagonists (ARA II) by spectrofluorimetry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 26, p. 477-486, 2001.

DONG, X.; LIANG, S.; SUN, H. Determination of seven anticoagulant rodenticides in human serum by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Methods*, v. 7, p.1884-1889, 2015.

EL-SHABOURY, S. R.; HUSSEIN, S. A.; MOHAMED. N. A.; EL-SUTOHY, M. M. Spectrofluorimetric method for determination of some angiotensin II receptor antagonists. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, v. 2, p. 12-18, 2012.

EL-ZAILIK, A.; CHEUNG, L. K.; WANG, Y.; SHERMAN, V.; CHOW, D. S.-L. Simultaneous LC–MS/MS analysis of simvastatin, atorvastatin, rosuvastatin and their active metabolites for plasma samples of obese patients underwent gastric bypass surgery. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 164, p. 258–267, 2019.

EMA (EUROPEAN MEDICINES AGENCY). *Guideline on bioanalytical method validation*. London, jul. 2011. Disponível em: < http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf >. Acesso em: 21 ago. 2016.

FAGUNDES, V. F.; LEITE, C. P.; PIANETTI, G. A.; FERNANDES, C. Rapid and direct analysis of statins in human plasma by column-switching liquid chromatography with restricted-access material. *Journal of Chromatography B*, v. 947-948, p. 8-16, 2014.

FALUDI, A. A. *et al. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose - 2017. Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 109, n. 2, supl. 1, p. 1-90, 2017.

FARAJZADEH, M. A.; ABBASPOUR, M. Development of new extraction method based on liquid–liquid–liquid extraction followed by dispersive liquid–liquid microextraction for extraction of three tricyclic antidepressants in plasma samples. *Biomedical Chromatography*, v. 32, e4251, 2018.

FARMACOPEIA Brasileira, 6a edição. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019.

FARTHING, D.; SICA, D.; FAKHRY, I.; PEDRO, A.; GEHR, T. W. B. Simple high-performance liquid chromatographic method for determination of losartan and E-3174 metabolite in human plasma, urine and dialysate. *Journal of Chromatography B*, v. 704, p. 374-378, 1997.

FDA (Food and Drug Administration). *Bioanalytical method validation guidance for industry*. Rockville, may 2018. Disponível em: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>.

FERNANDES, C.; JIAYU, P.; SANDRA, P.; LANÇAS, F. M. Stir Bar Sorptive Extraction-LC-MS for the Analysis of Fluoxetine in Plasma. *Chromatographia*, v. 64, p. 517-521, 2006.

FERNANDES, C.; SANTOS NETO, A. J.; RODRIGUES, J. C.; ALVES, C.; LANÇAS, F. M. Solid-phase microextraction–liquid chromatography (SPME–LC)

determination of fluoxetine and norfluoxetine in plasma using a heated liquid flow through interface. *Journal of Chromatography B*, v. 847, p. 217-223, 2007.

FERNANDES, C.; VAN HOECK, E.; SANDRA, P.; LANÇAS, F. M. Determination of fluoxetine in plasma by gas chromatography–mass spectrometry using stir bar sorptive extraction. *Analytica Chimica Acta*, v. 614, p. 201-207, 2008.

FEKETE, S.; SCHAPPLER, J.; VEUTHEY, J.-L.; GUILLARME, D. Current and future trends in UHPLC. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 63, p. 2-13, 2014.

FERNÁNDEZ, P.; REGENJO, M.; BERMEJO, A. M.; FERNÁNDEZ, A. M.; LORENZO, R. A.; CARRO, A. M. Analysis of drugs of abuse in human plasma by dispersive liquid–liquid microextraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Applied Toxicology*, v. 35, p. 418-425, 2015.

FESSENDEN, R. J.; FESSENDEN, J. S.; FEIST, P. *Organic Laboratory Techniques*. 3rd ed. Pacific Grove: Brooks/Cole Thomson Learning, 2000. 229 p.

FRANCA, C. A.; ETCHEVERRY, S. B.; DIEZ, R. P.; WILLIAMS, P. A. M. Irbesartan: FTIR and Raman spectra. Density functional study on vibrational and NMR spectra. *Journal of RAMAN Spectroscopy*, v. 40, p. 1296-1300, 2009.

GHAMBARIAN, M.; TAJABADI, F.; YAMINI, Y.; ESRAFILI, A. Dispersive liquid–liquid microextraction with back extraction using an immiscible organic solvent for determination of benzodiazepines in water, urine, and plasma samples. *RSC Advances*, v. 6, p. 114198-114207, 2016.

GONZÁLEZ MENDIA, O.; BLANCO, M. E.; RICO, E.; ALONSO, M. L.; MAGUREGUI, M. I.; ALONSO, R. M. Efficient Method Development and Validation for the Determination of Cardiovascular Drugs in Human Plasma by SPE–UHPLC–PDA–FLD. *Chromatographia*, v. 80, n. 4, p. 605–615, 2017.

GONZALEZ, O.; ALONSO, R. M.; FERREIRÓS, N.; WEINMANN, W.; ZIMMERMANN, R.; DRESEN, S. Development of an LC-MS/MS method for the quantitation of 55 compounds prescribed in combined cardiovascular therapy. *Journal of Chromatography B*, v. 879, n. 3–4, p. 243–252, 2011.

GONZALEZ, O.; IRIARTE, G.; RICO, E.; FERREIRÓS, N.; MAGUREGUI, M. I.; ALONSO, R. M.; JIMÉNEZ, R. M. LC–MS/MS method for the determination of several drugs used in combined cardiovascular therapy in human plasma. *Journal of Chromatography B*, v. 878, p. 2685-2692, 2010.

GUMUSTAS, M.; KURBANOGLU, S.; USLU, B.; OZKAN, S. A. UPLC versus HPLC on Drug Analysis: Advantageous, Applications and Their Validation Parameters. *Chromatographia*, v. 76, p. 1365-1427, 2013.

HANSEN, F.; ØIESTAD, E. L.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Bioanalysis of pharmaceuticals using liquid-phase microextraction combined with liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 189, article 113446, 2020.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. *Mass spectrometry: principles and applications*. 3th ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2007. 489 p.

HOPFGARTNER, G.; BOURGOGNE, E. Quantitative high-throughput analysis of drugs in biological matrices by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 22, p. 195-214, 2003.

HUGHES, N. C.; WONG, E. Y. K.; FAN, J.; BAJAJ, N. Determination of Carryover and Contamination for Mass Spectrometry – Based Chromatographic Assays. *The AAPS Journal*, v. 9, n. 3, article 42, p. E353-E360, 2007.

JALILI, V.; BARKHORDARI, A.; GHIASVAND, A. Bioanalytical Applications of Microextraction Techniques: A Review of Reviews. *Chromatographia*, v. 83, p. 567-577, 2020.

JANDERA, P.; JANÁS, P. Recent advances in stationary phases and understanding of retention in hydrophilic interaction chromatography. A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 967, p. 12-32, 2017.

JAPANESE Pharmacopoeia 17th edition. Tokyo: The Ministry of Health, Labour and Welfare, 2016.

JOHANNSEN, J. O.; REUTER, H.; HOFFMANN, F.; BLAICH, C.; WIESEN, M. H. J.; STREICHERT, T.; MÜLLER, C. Reliable and easy-to-use LC–MS/MS-method for simultaneous determination of the antihypertensives metoprolol, amlodipine, canrenone and hydrochlorothiazide in patients with therapy-refractory arterial hypertension. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 164, p. 373–381, 2019.

JOUYBAN, A.; SOROURADDIN, M. H.; FARAJZADEH, M. A.; SOMI, M. H.; FAZELI-BAKHTIYARI, R. Determination of five antiarrhythmic drugs in human plasma by dispersive liquid–liquid microextraction and high-performance liquid chromatography. *Talanta*, v. 134, p. 681-689, 2015.

KARTSOVA, L. A.; BESSONOVA, E. A.; SOMOVA, V. D. Hydrophilic Interaction Chromatography. *Journal of Analytical Chemistry*, v. 74, n. 5, p. 415-424, 2019.

KELLOGG, M. D. Measurement of biological materials. In: ROBERTSON, D.; WILLIAMS, G. H. (ed.). *Clinical and Translational Science: Principles of Human Research*. 2. ed. Cambridge: Academic Press, 2017. Cap. 8. p. 137-155.

KIM, S; THIESSEN, P. A.; BOLTON, E. E.; CHEN, J.; FU, G.; GINDULYTE, A.; HAN, L.; HE, J.; HE, S.; SHOEMAKER, B. A.; WANG, J.; YU, B.; ZHANG, J.; BRYANT, S. H. PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Research*, vol. 44, p. D1202-D1213, 2016.

KOKOSA, J. M. Dispersive Líquid-Liquid Microextraction. In: POOLE, C. F. (ed.). *Liquid-phase Extraction*. London: Elsevier, 2020. Cap. 16. p. 473-497. (Handbook in Separation Science).

KRISHNAN, T. R.; IBRAHAM, I. Solid-phase extraction technique for the analysis of biological samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 12,

n. 3, p. 287-294, 1994.

KUMAR, A.; DWIVEDI, S. P.; PRASAD, T. Method validation for simultaneous quantification of olmesartan and hydrochlorothiazide in human plasma using LC-MS/MS and its application through bioequivalence study in healthy volunteers. *Frontiers in Pharmacology*, v. 10, p. 1-13, 2019.

KUZE, Y.; KOGAME, A.; JINO, F.; KONDO, T.; ASAH, S. Development, validation and application of the liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification of azilsartan medoxomil (TAK-491), azilsartan (TAK-536), and its 2 metabolites in human plasma. *Journal of Chromatography B*, v. 1001, p. 174–181, 2015.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? *Scientia Chromatographica*, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LI, K. M.; RIVORY, L. P.; CLARKE, S. J. Solid-Phase Extraction (SPE) Techniques for Sample Preparation in Clinical and Pharmaceutical Analysis: A Brief Overview. *Current Pharmaceutical Analysis*, v. 2, p. 95-102, 2006.

LIPKA, E.; VACCHER, C. Quantitative analysis of drugs in biological matrices by HPLC hyphenated to fluorescence detection. *Bioanalysis*, v. 7, n. 6, p. 743-762, 2015.

MACH, F. *et al.* 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk: The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS). *European Heart Journal*, v. 41, p. 111-188, 2020.

MACWAN, J. S.; IONITA, I. A.; DOSTALEK, M.; AKHLAGHI, F. Development and validation of a sensitive, simple, and rapid method for simultaneous quantitation of atorvastatin and its acid and lactone metabolites by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 400, n. 2, p. 423–433, 2011.

MAHROUSE, M. A. Simultaneous ultraperformance liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of four antihypertensive drugs in human plasma using hydrophilic–lipophilic balanced reversed-phase sorbents sample preparation protocol. *Biomedical Chromatography*, v. 32, n. 12, p. 1–10, 2018.

MALACHIAS, M. V. B. *et al.* 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 107, n. 3, supl. 3, p. 1-103, 2016.

MALTA, D. C.; TEIXEIRA, R.; OLIVEIRA, G. M. M.; RIBEIRO, A. L. Mortalidade por Doenças Cardiovasculares Segundo o Sistema de Informação sobre Mortalidade e as Estimativas do Estudo Carga Global de Doenças no Brasil, 2000-2017. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 115, n. 2, p. 152-160, 2020.

MARTINS JÚNIOR, H. A.; BUSTILLOS, O. V.; PIRES, M. A. F.; LEBRE, D. T.; WANG, A. Y. Determinação de resíduos de cloranfenicol em amostras de leite e mel industrializados utilizando a técnica de espectrometria de massas em “tandem” (CLAE-EM/EM). *Química Nova*, v. 29, n. 3, p. 586-592, 2006.

MEIMAROGLOU, S.; VONAPARTI, A.; MIGIAS, G.; GENNIMATA, D.; POULOU, S.; PANDERI, I. Direct injection human plasma analysis for the quantification of antihypertensive drugs for therapeutic drug monitoring using hydrophilic interaction liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 1004, p. 1-9, 2015.

MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B. (Ed). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. 4th edition. London: Pharmaceutical Press, 2011. 2609 p.

MOLINER-MARTINEZ, Y.; HERRÁEZ-HERNÁNDEZ, R.; VERDÚ-ANDRÉS, J.; MOLINS-LEGUA, C.; CAMPÍNS-FALCÓ, P. Recent advances of in-tube solid-phase microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 71, p. 205-213, 2015.

NARDOTTO, G. H. B.; COELHO, E. B.; MARQUES, M. P.; LANCHOTE, V. L. Chiral analysis of carvedilol and its metabolites hydroxyphenyl carvedilol and O-desmethyl carvedilol in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application to a clinical pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*, v. 1015–1016, p. 173–180, 2016.

NIESSEN, W. M. A. Fragmentation of toxicologically relevant drugs in positive-ion liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 30, n. 4, p. 626-663, 2011.

O'NEIL, M. J. (Ed.). *The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*. 14th ed. Whitehouse Station, New Jersey: Merck, 2006. p. 3204.

OJEDA, C. B.; ROJAS, F. S. Vortex-Assisted Liquid–Liquid Microextraction (VALLME): Applications. *Chromatographia*, v. 77, p. 745-754, 2014.

OJEDA, C. B.; ROJAS, F. S. Vortex-Assisted Liquid–Liquid Microextraction (VALLME): The Latest Applications. *Chromatographia*, v. 81, p. 89-103, 2018.

OLIVEIRA, A. R. M.; MAGALHÃES, I. R. S.; SANTANA, F. J. M.; BONATO, P. S. Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. *Química Nova*, v. 31, n. 3, p. 637-644, 2008.

OLIVEIRA, G. M. M.; BRANT, L. C. C.; POLANCZYK, C. A.; BILOLO, A.; NASCIMENTO, B. R.; MALTA, D. C.; SOUZA, M. F. M.; SOARES, G. P.; XAVIER JUNIOR, G. F.; MACHLINE-CARRION, M. J.; BITTENCOURT, M. S.; PONTES-NETO, O. M.; SILVESTRE, O. M.; TEIXEIRA, R. A.; SAMPAIO, R. O.; GAZIANO, T.A.; ROTH, G. A.; RIBEIRO, A. L. P. Estatística Cardiovascular – Brasil 2020. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 115, n. 3, p. 308-439, 2020.

PAPADOPOULOU, A.; ROMÁN, I. P.; CANALS, A.; TYROVOLA, K.; PSILLAKIS, E. Fast screening of perfluorooctane sulfonate in water using vortex-assisted

liquid–liquid microextraction coupled to liquid chromatography–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 691, p. 56-61, 2011.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. *Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry*. 3rd ed. New York: Thomson Learning, 2001. 680 p.

PENG, G. W.; CHIOU, W. L. Analysis of drugs and other toxic substances in biological sample for pharmacokinetic studies. *Journal of Chromatography B*, v. 531, p. 3-50, 1990.

PILLI, N. R.; INAMADUGU, J. K.; MULLANGI, R.; KARRA, V. K.; VAIDYA, J. R.; RAO, J. V. L. N. S. Simultaneous determination of atorvastatin, amlodipine, ramipril and benazepril in human plasma by LC-MS/MS and its application to a human pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*, v. 25, n. 4, p. 439–449, 2011.

POLSON, C.; SARKAR, P.; INCLEDON, B.; RAGUVARAN, V.; GRANT, R. O. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 785, p. 263-275, 2003.

POOLE, C. F.; POOLE, S. K. Principles and Practice of Solid-Phase Extraction. In: PAWLISZYN, J. (ed.). *Comprehensive Sampling and Sample Preparation: Analytical Techniques for Scientists*. Cambridge: Academic Press, 2012. Cap. 2.14. p. 273-297.

PSILLAKIS, E. Vortex-assisted liquid-liquid microextraction revisited. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 113, p. 332-339, 2019.

PUNT, A. M.; STIENSTRA, N. A.; VAN KLEEF, M. E. A.; LAFEBER, M.; SPIERING, W.; BLANKESTIJN, P. J.; BOTS, M. L.; VAN MAARSEVEEN, E. M. Screening of cardiovascular agents in plasma with LC-MS/MS: A valuable tool for objective drug adherence assessment. *Journal of Chromatography B*, v. 1121, n. February, p. 103–110, 2019.

QUEIROZ, M. E. C.; LANÇAS, F. M. Análise de fármacos em material biológico: acoplamento microextração em fase sólida “no tubo” e cromatografia líquida de alta eficiência. *Química Nova*, v. 28, n. 5, p. 880-886, 2005.

QUEIROZ, M. E. C.; SOUZA, I. D. Sample preparation techniques for biological samples. *Scientia Chromatographica*, v. 10, n. 3, p. 174-194, 2018.

RANGEL, H. A.; MERÇON, F. Estudo da emissão por fluorescência de ultravioleta na quantificação de um inibidor de corrosão do tipo sal de amônio quaternário em água. *Química Nova*, v. 35, n. 7, p. 1287-1293, 2012.

RANI, S.; MALIK, A. K.; SINGH, B. Novel micro-extraction by packed sorbent procedure for the liquid chromatographic analysis of antiepileptic drugs in human plasma and urine. *Journal of Separation Science*, v. 35, p. 359-366, 2012.

REZAEI, M.; ASSADI, Y.; HOSSEINI, M.-R. M.; AGHAEE, E.; AHMADI, F.;

BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. *Journal of chromatography A*, v. 1116, p. 1-9, 2006.

RICHTER, L. H. J.; JACOBS, C. M.; MAHFOUD, F.; KINDERMANN, I.; BÖHM, M.; MEYER, M. R. Development and application of a LC-HRMS/MS method for analyzing antihypertensive drugs in oral fluid for monitoring drug adherence. *Analytica Chimica Acta*, v. 1070, p. 69–79, 2019.

SANSON, A. L.; BAETA, B. E. L.; RODRIGUES, K. L. T.; AFONSO, R. J. C. F. Equipamento de baixo custo para extração em fase sólida em amostras aquosas de grande volume utilizando pressão positiva de N₂. *Química Nova*, v. 37, n. 1, p. 150-152, 2014.

SILVA, C. F.; BORGES, K. B.; NASCIMENTO JÚNIOR, C. S. Rational design of a molecularly imprinted polymer for dinotefuran: theoretical and experimental studies aimed at the development of an efficient adsorbent for microextraction by packed sorbent. *Analyst*, v. 143, p. 141-149, 2018.

SILVA, C. G. A.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H. Cromatografia por interações hidrofílicas (HILIC): estado da arte e aplicações. *Química Nova*, v. 39, n. 2, p. 210-220, 2016.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 3th ed. New York: John Wiley & Sons, 2010. 912 p.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. *Practical HPLC method development*. 2th ed. New York: John Wiley & Sons, 1997. 765p.

SOLTANI, S.; JOUYBAN, A. Optimization and validation of an isocratic HPLC-UV method for the simultaneous determination of five drugs used in combined cardiovascular therapy in human plasma. *Asian Journal of Chemistry*, v. 23, n. 4, p. 1728–1734, 2011.

SOUZA, M. A. C.; REIS, N. F. A.; LEITE, I. M. S.; GLORIA, M. B. A.; PIANETTI, G. A.; MARTINS, M. A. P.; PACHECO, I. C. P. O.; FERNANDES, C. A simple and sensitive HPLC-FL method for simultaneous determination of angiotensin II receptor antagonists in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 188, article 113403, 2020.

STONE, J. Sample preparation techniques for mass spectrometry in the clinical laboratory. In: NAIR, H.; CLARKE, W. (ed.). *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory*. Cambridge: Academic Press, 2017. Cap. 3. p. 37-62.

TAYLOR, P. J. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry*, v. 38, p. 328-334, 2005.

TEKKELI, S. E. K. Development of an HPLC-UV method for the analysis of drugs used for combined hypertension therapy in pharmaceutical preparations and human plasma. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, v. 2013, 2013.

THE EUROPEAN Pharmacopoeia. 7 ed. Strasbourg: Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe (EDQM), 2010.

THE UNITED States Pharmacopeia. USP 38. 38 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2014.

TURNER, R. M.; FONTANA, V.; BAYLISS, M.; WHALLEY, S.; CASTELAZO, A. S.; PIRMOHAMED, M. Development, validation and application of a novel HPLC-MS/MS method for the quantification of atorvastatin, bisoprolol and clopidogrel in a large cardiovascular patient cohort. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 159, p. 272–281, 2018.

UNGER, T.; BORGHI, C.; CHARCHAR, F.; KHAN, N. A.; POULTER, N. R.; PRABHAKARAN, D.; RAMIREZ, A.; SCHLAICH, M.; STERGIU, G. S.; TOMASZEWSKI, M.; WAINFORD, R. D.; WILLIAMS, B.; SCHUTTE, A. 2020 International Society of Hypertension Global: Hypertension Practice Guidelines. *Hypertension*, v. 75, p. 1334-1357, 2020.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. *Química Nova*, v. 23, n. 4, p. 523-530, 2000.

VAN DER NAGEL, B. C. H.; VERSMISSEN, J.; BAHMANY, S.; VAN GELSER, T.; KOCH, B. C. P. High-throughput quantification of 8 antihypertensive drugs and active metabolites in human plasma using UPLC–MS/MS. *Journal of Chromatography B*, v. 1060, n. June, p. 367–373, 2017.

VAN HAANDEL, L.; GIBSON, K. T.; LEEDER, J. S.; WAGNER, J. B. Quantification of pravastatin acid, lactone and isomers in human plasma by UHPLC-MS/MS and its application to a pediatric pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*, v. 1012–1013, p. 169–177, 2016.

VESSECCHI, R.; LOPES, P.; GOZZO, F. C.; DÖRR, F. A.; MURGU, M.; LEBRE, D. T.; ABREU, R.; BUSTILLOS, O. V.; RIVEROS, J. M. Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa. *Química Nova*, v. 34, n. 10, p. 1875-1887, 2011.

VIANA, I. M. O.; LIMA, P. P. R.; SOARES, C. D. V.; FERNANDES, C. Simultaneous determination of oral antidiabetic drugs in human plasma using microextraction by packed sorbent and high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 96, p. 241-248, 2014.

VIANA, I. M. O. *Determinação de fármacos antidiabéticos orais em plasma humano empregando microextração em sorvente empacotado e cromatografia líquida de alta eficiência*. [Dissertação] Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2014.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. Plant Drug Analysis – a Thin Layer Chromatography Atlas. Berlin-Heidelberg-NewYork-Tokyo: Springer-Verlag, 1984. 374 p.

WHELTON, P. K.; CAREY, R. M.; ARONOW, W. S.; CASEY, D. E. J.; COLLINS, K. J.; DENNISON HIMMELFARB, C.; DEPALMA, S. M.; GIDDING, S.; JAMERSON, K. A.; JONES, D. W.; MACLAUGHLIN, E. J.; MUNTNER, P.; OVBIAGELE, B.; SMITH, S. C. J.; SPENCER, C. C.; STAFFORD, R. S.; TALER, S. J.; THOMAS, R. J.; WILLIAMS, K. A. S.; WILLIAMSON, J. D.; WRIGHT, J. T. J. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA guideline for the prevention, detection, evaluation, and management of high blood pressure in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 71, e127–248, 2018.

WHO (World Health Organization). A global brief on hypertension: silent killer, global public health crisis. World Health Day 2013. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/79059/1/WHO_DCO_WHD_2013.2_eng.pdf, acessado em 20 de Agosto de 2017.

WHO (World Health Organization). Cardiovascular diseases (CVDs), 2017. Disponível em: [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)), acessado em 09 de Novembro de 2018.

WHO (World Health Organization). Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control, 2011. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44701/1/9789241564373_eng.pdf?ua=1 acessado em 09 de Novembro de 2018.

WISHART, D. S.; KNOX, C.; GUO, A. C.; CHENG, D.; SHRIVASTAVA, S.; TZUR, D.; GAUTAM, B.; HASSANALI, M. DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. *Nucleic Acids Research*, v. 36 (Database issue), D901–D906, 2008.

YOSHIHARA, K.; GAO, Y.; SHIGA, H.; WADA, D. R.; HISAOKA, M. Population pharmacokinetics of olmesartan following oral administration of its prodrug, olmesartan medoxomil. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 44, n. 12, p. 1329-1342, 2005.

ZHOU, Y.; LI, J.; HE, X.; JIA, M.; LIU, M.; LI, H.; XIONG, Z.; FAN, Y.; LI, W. Development and validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of amlodipine, atorvastatin and its metabolites ortho-hydroxy atorvastatin and para-hydroxyatorvastatin in human plasma and its application in a bioequivalence study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 83, p. 101-107, 2013.

APÊNDICE A – Espectros de massas de fragmentação obtidos para todos os analitos do método por CLAE-EM/EM

Figura A.1 – Espectro de massas de fragmentação do anlodipino (íon precursor com razão m/z igual a 409)

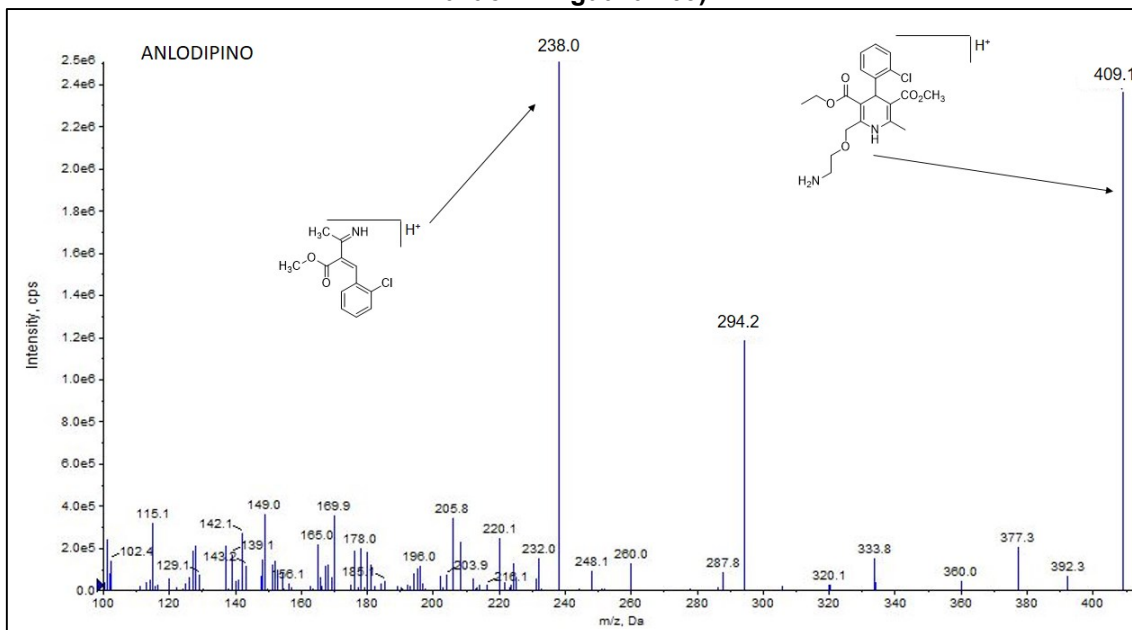


Figura A.2 – Espectro de massas de fragmentação da atorvastatina (íon precursor com razão m/z igual a 559)

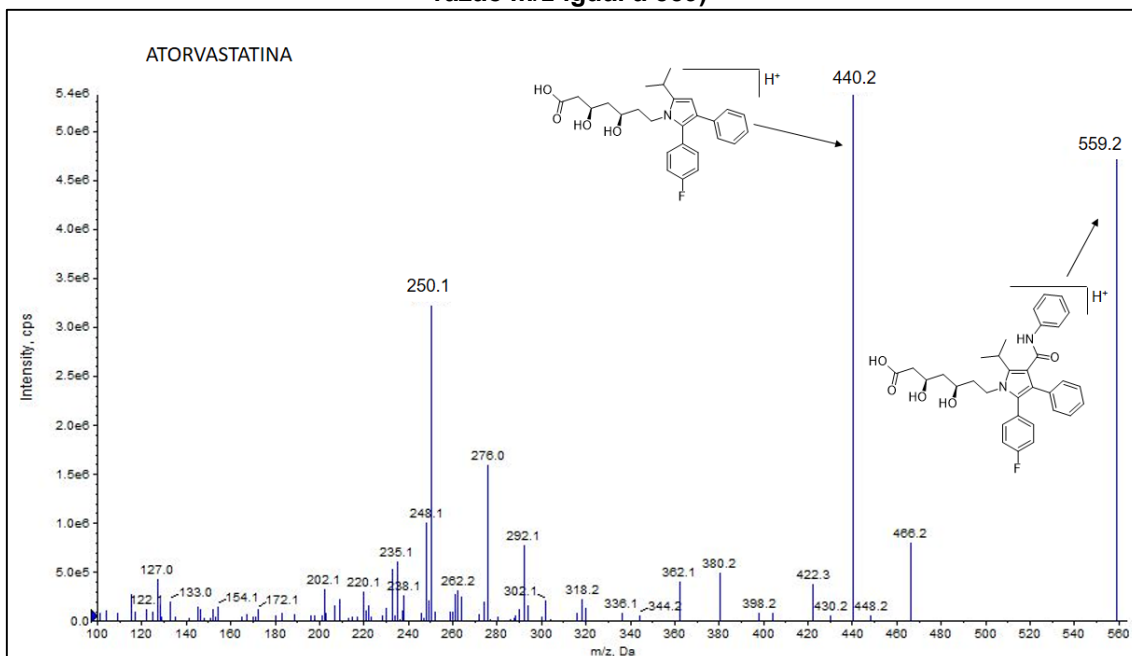


Figura A.3 – Espectro de massas de fragmentação do carvedilol (ion precursor com razão m/z igual a 407)

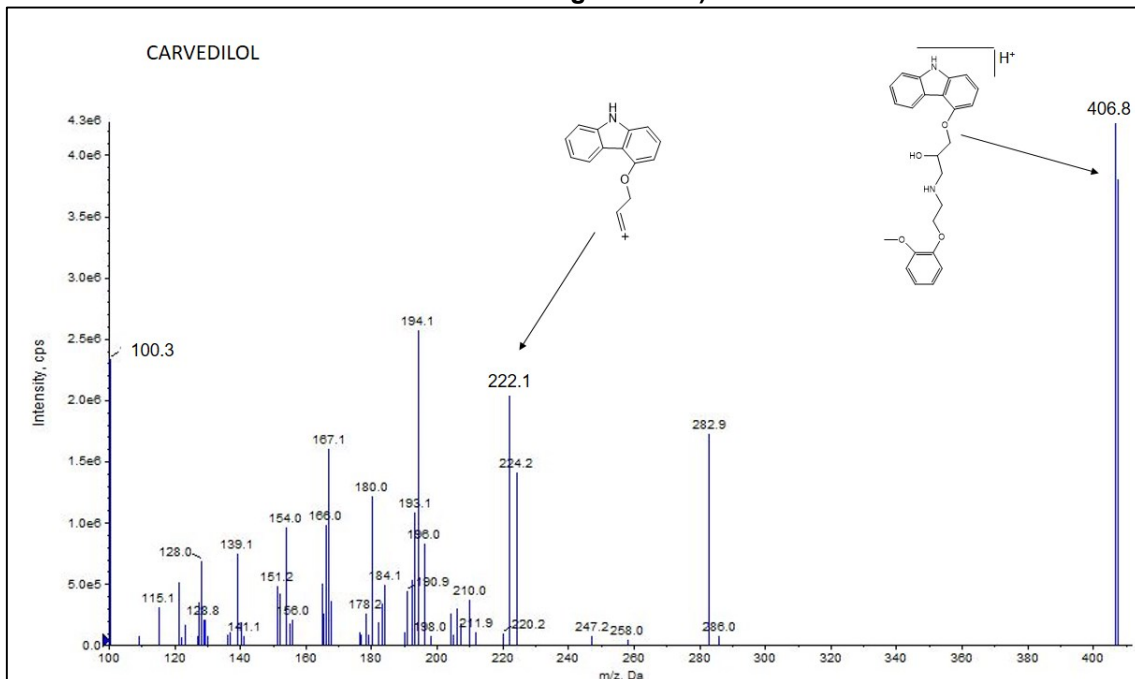


Figura A.4 – Espectro de massas de fragmentação do diltiazem (ion precursor com razão m/z igual a 415)

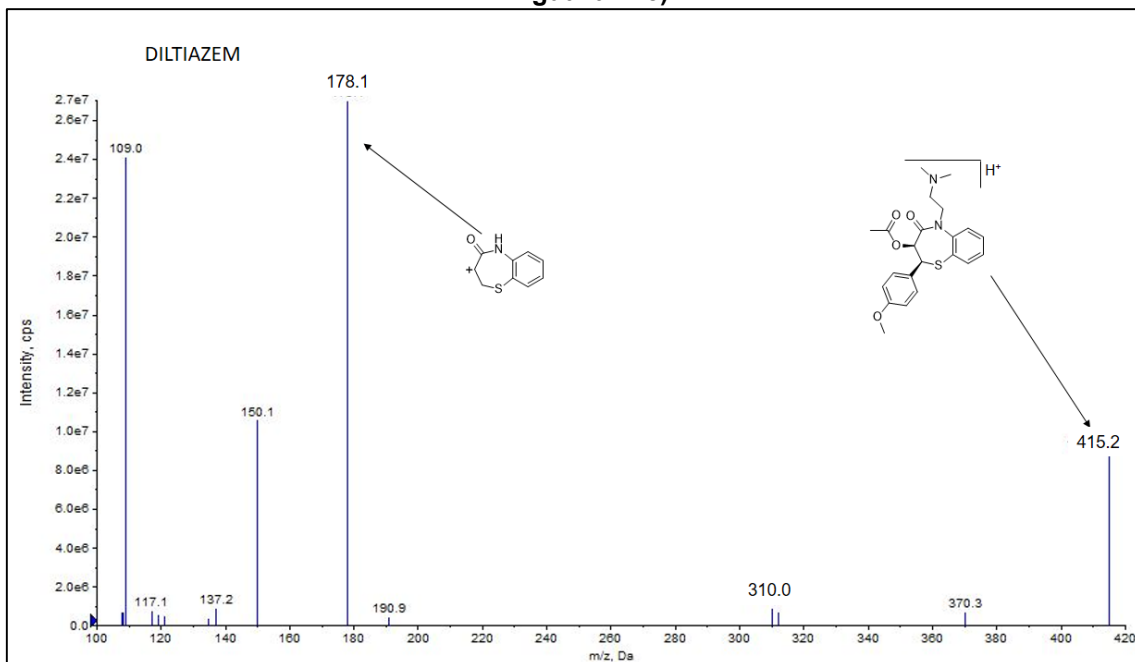


Figura A.5 – Espectro de massas de fragmentação da espironolactona (ion precursor com razão m/z igual a 417)

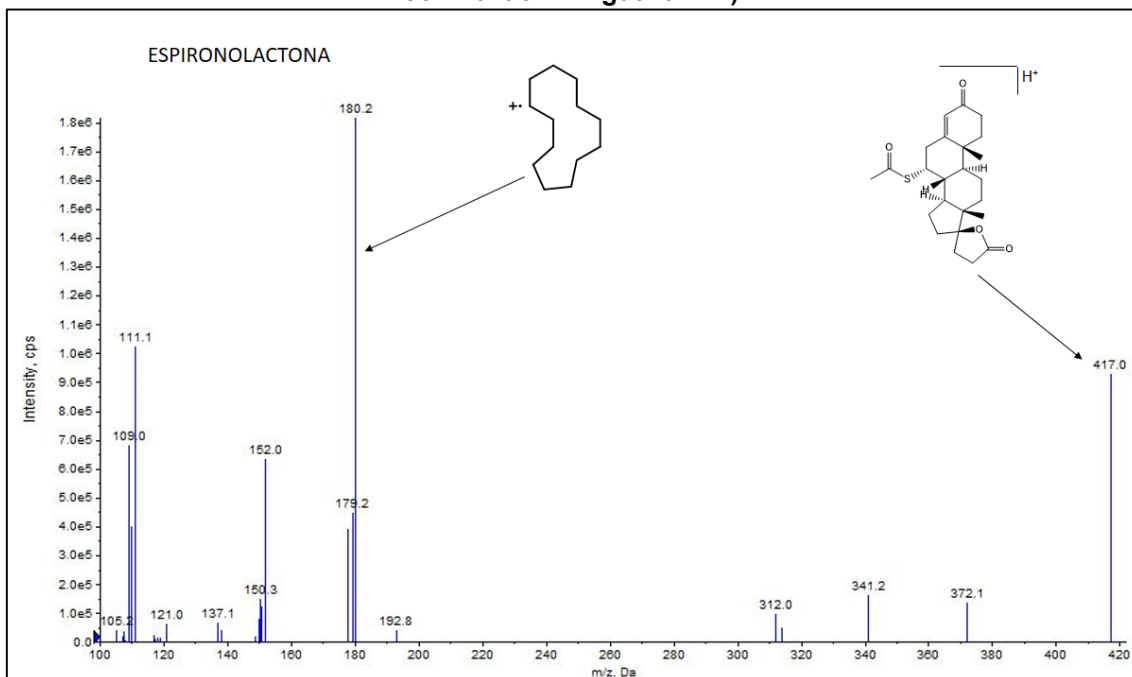


Figura A.6 – Espectro de massas de fragmentação da irbesartana (ion precursor com razão m/z igual a 429)

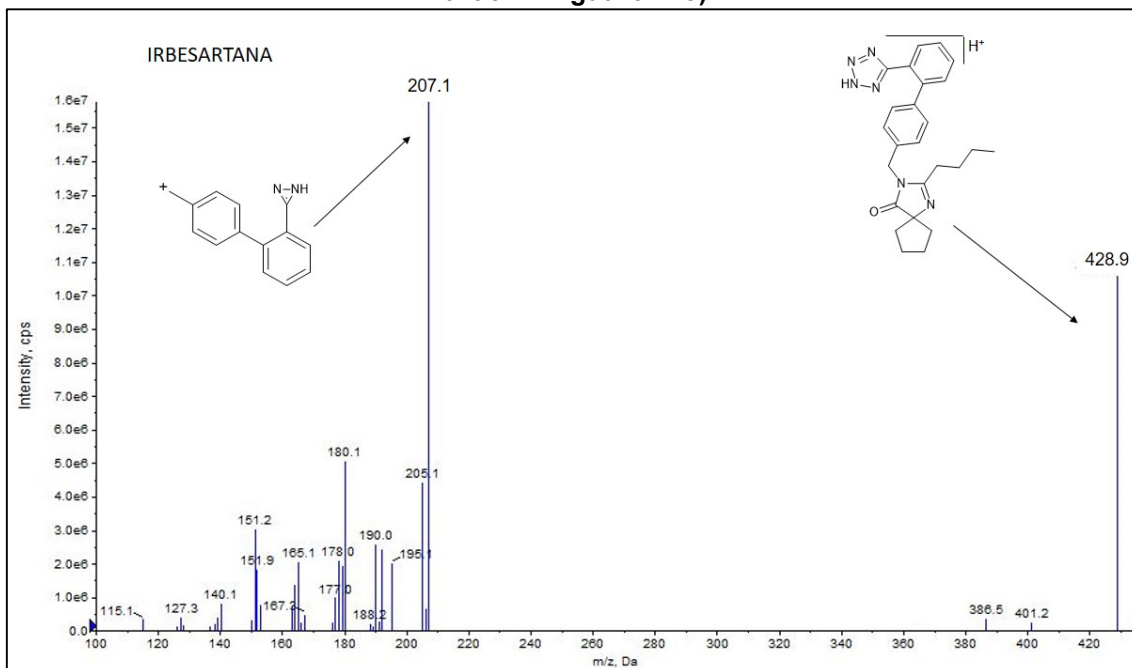


Figura A.7 – Espectro de massas de fragmentação da losartana (íon precursor com razão m/z igual a 423)

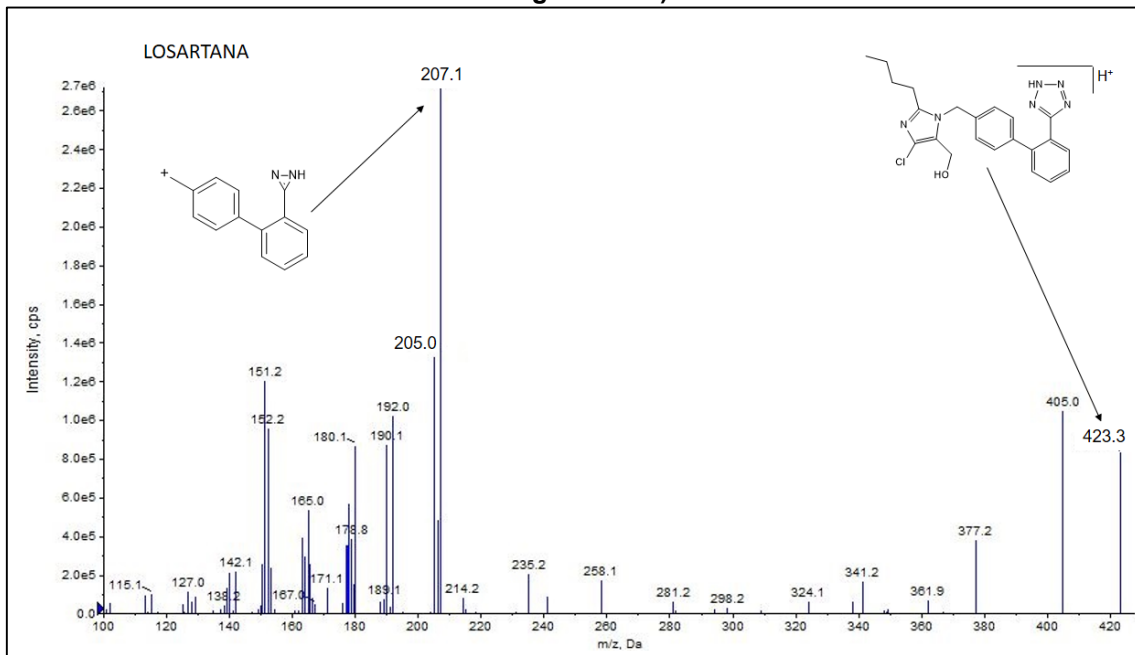


Figura A.8 – Espectro de massas de fragmentação da valsartana (íon precursor com razão m/z igual a 436)

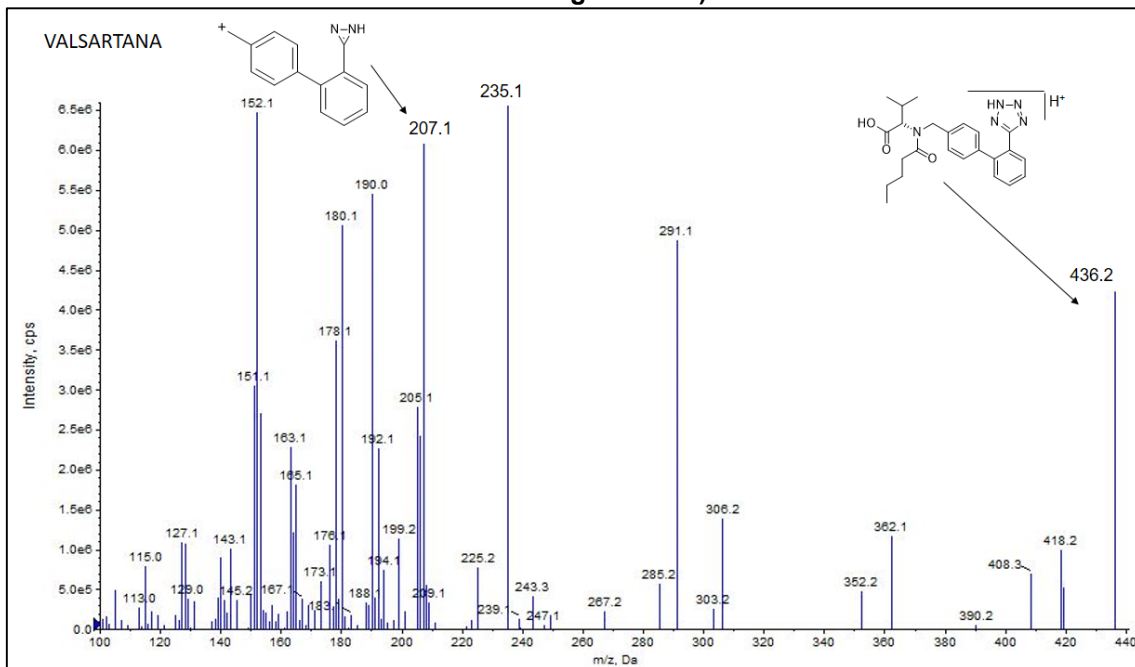


Figura A.9 – Espectro de massas de fragmentação da varfarina (íon precursor com razão m/z igual a 309)

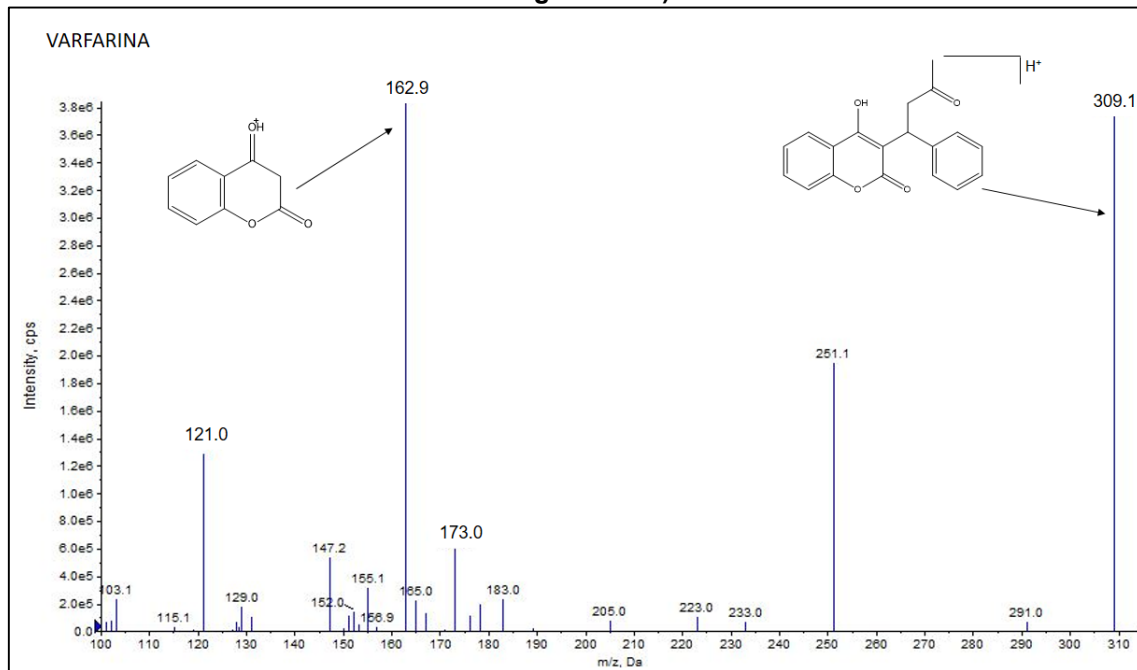
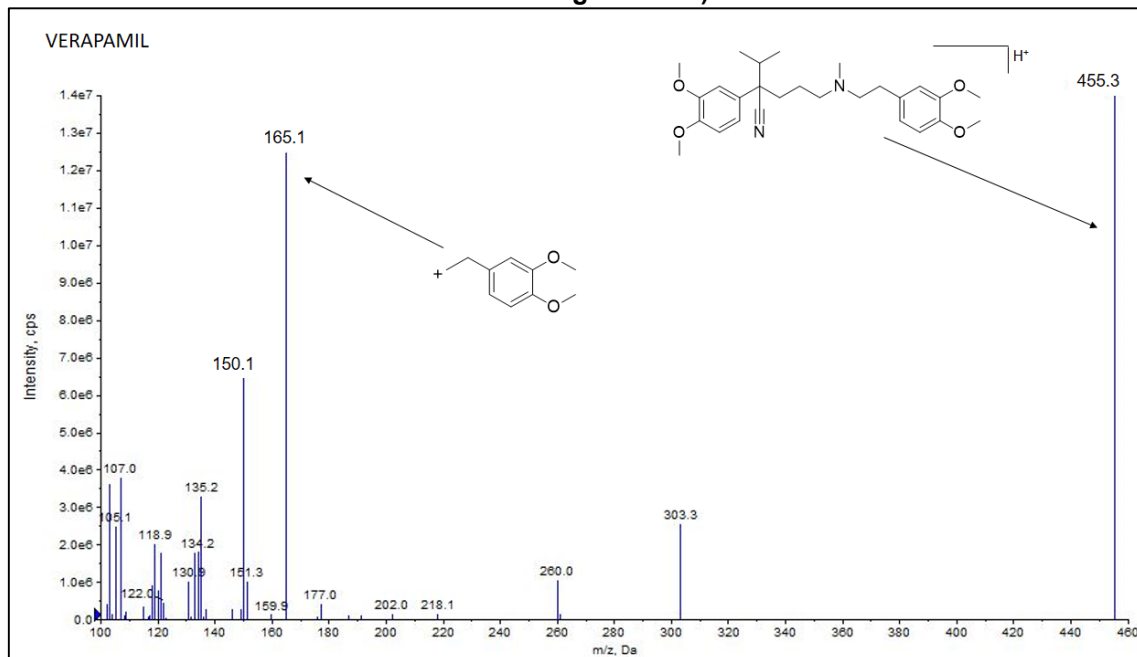


Figura A.10 – Espectro de massas de fragmentação do verapamil (íon precursor com razão m/z igual a 455)



APÊNDICE B – Gráficos de log D para todos os analitos avaliados com o método bioanalítico por CLAE-EM/EM obtidos com o software *log D predictor* (CHEMAXON, 2020)

Figura B.1 – Gráficos de log D obtidos para anlodipino (à esquerda) e atorvastatina (à direita)

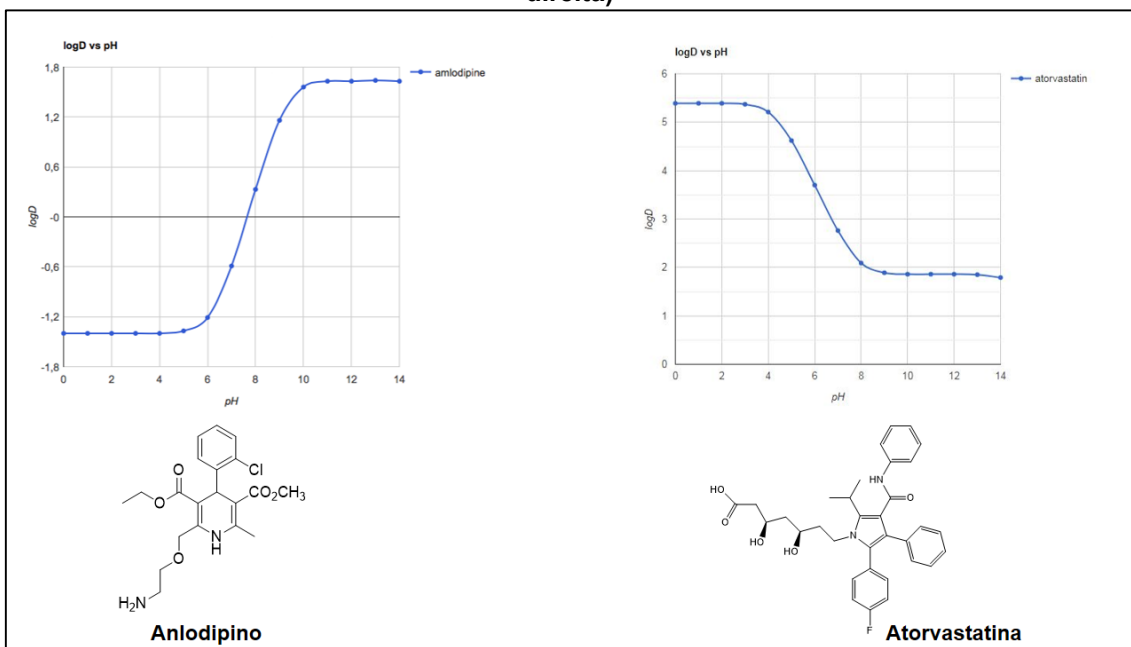


Figura B.2 – Gráficos de log D obtidos para carvedilol (à esquerda) e candesartana cilexetila (à direita)

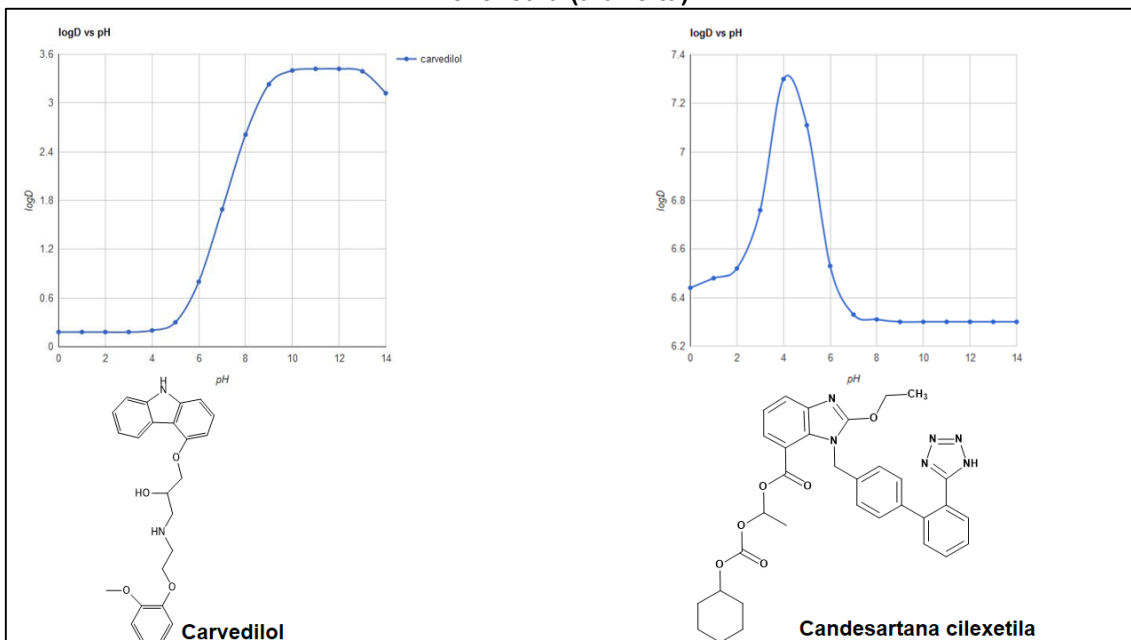


Figura B.3 – Gráficos de log D obtidos para diltiazem (à esquerda) e espironolactona (à direita)

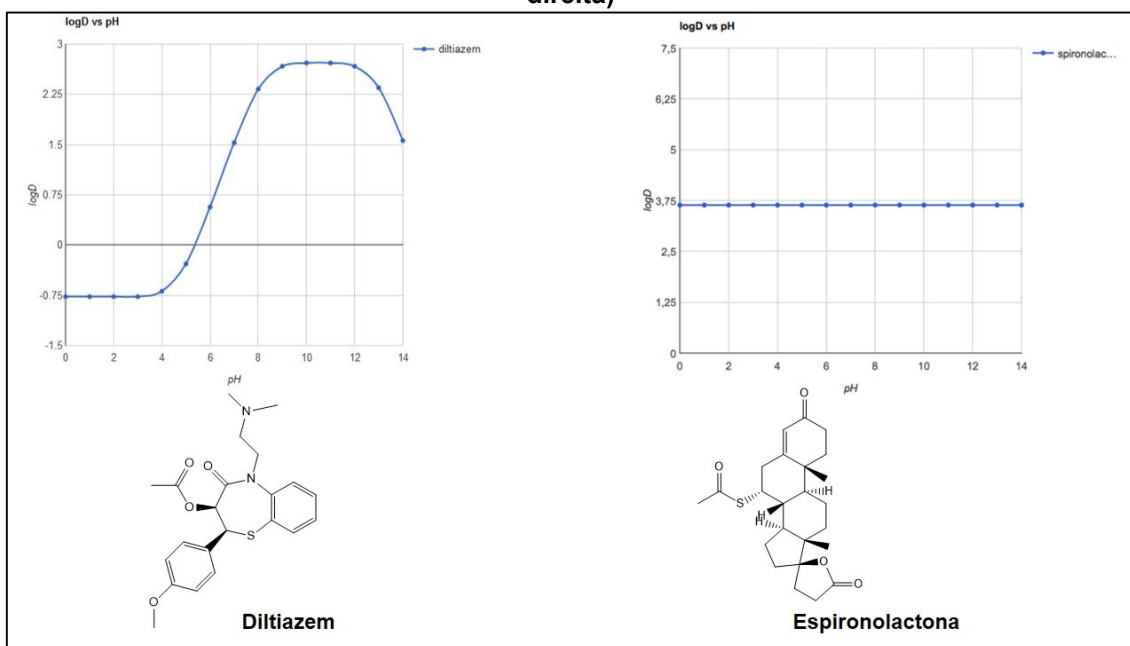


Figura B.4 – Gráficos de log D obtidos para irbesartana (PI) (à esquerda) e losartana (à direita)

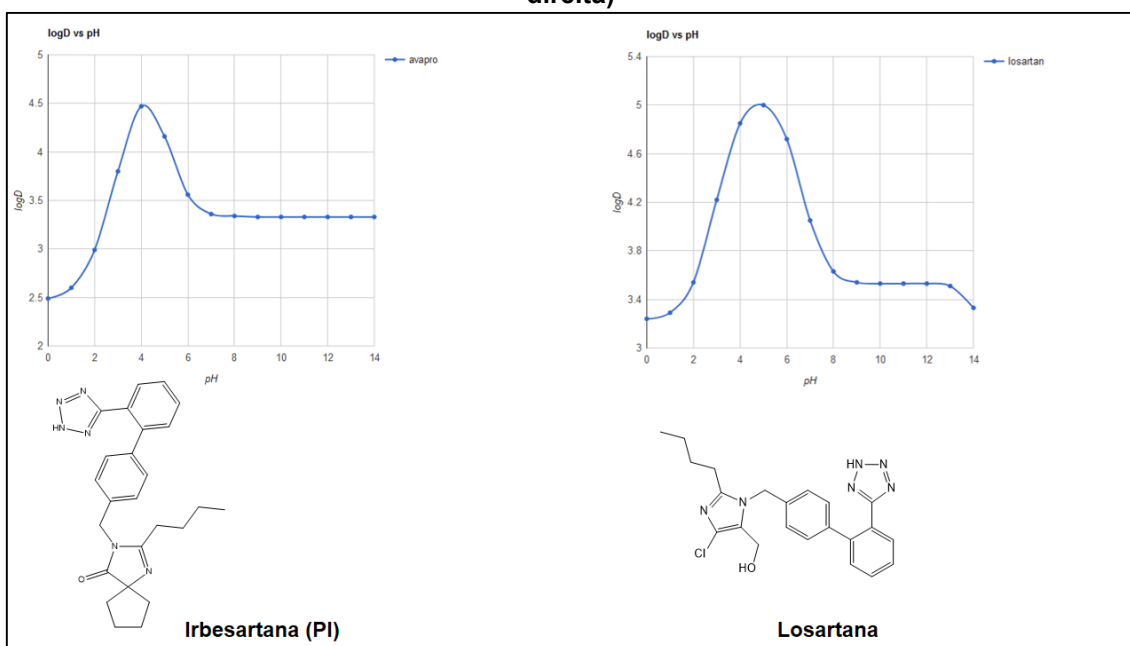


Figura B.5 – Gráficos de log D obtidos para olmesartana (à esquerda) e valsartana (à direita)

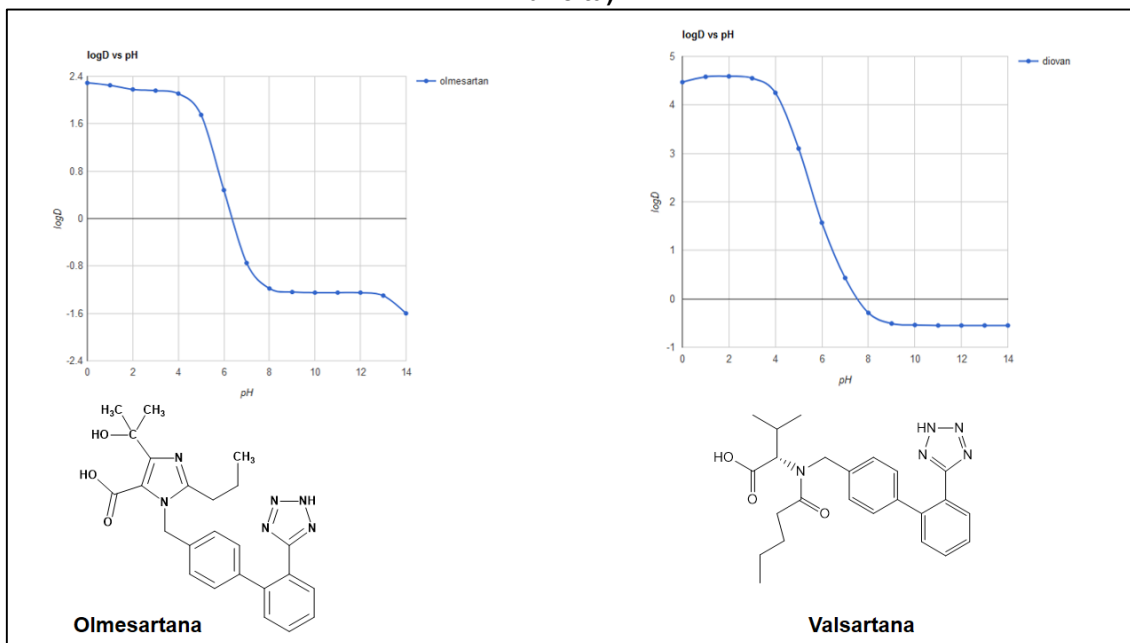
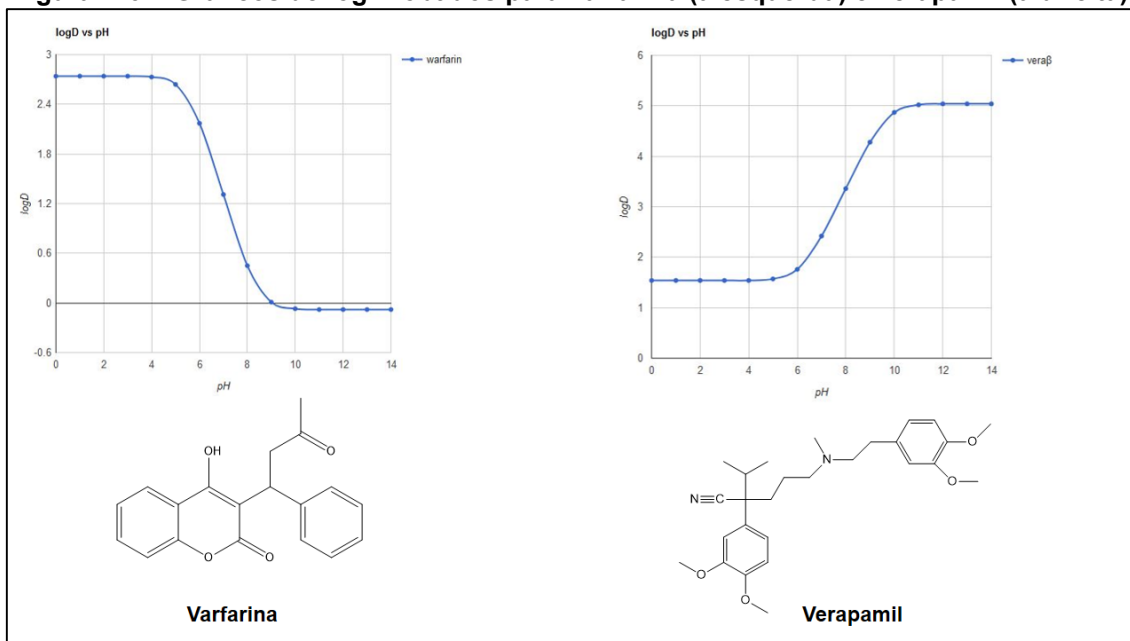
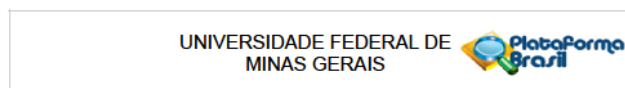


Figura B.6 – Gráficos de log D obtidos para varfarina (à esquerda) e verapamil (à direita)



ANEXO A – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFMG, contendo a primeira e a última página (aprovação do projeto)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE FÁRMACOS ANTI-HIPERTENSIVOS, ANTIDIABÉTICOS E HIPOCOLESTEROLEMIANTES EM PLASMA HUMANO

Pesquisador: CHRISTIAN FERNANDES

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 01455418.4.0000.5149

Instituição Proponente: PRO REITORIA DE PESQUISA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.113.448

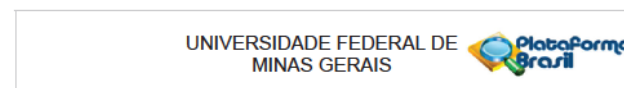
Apresentação do Projeto:

Segundo os autores

O trabalho intitulado "Desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos para a determinação simultânea de fármacos anti-hipertensivos, antidiabéticos e hipocolesterolemiantes em plasma humano" propõe o desenvolvimento e validação de método bioanalítico para a determinação simultânea de fármacos utilizados no tratamento da hipertensão, da diabetes e da hipercolesterolemia em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial com ionização por electrospray, a avaliação e comparação da técnica de coleta de sangue convencional com a técnica dried blood spot, a avaliação e comparação de diferentes técnicas de preparo de amostra, convencionais e modernas, e o desenvolvimento e validação de método bioanalítico para a determinação simultânea de fármacos anti-hipertensivos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrofotometria na região do ultravioleta e por fluorescência. As amostras de sangue serão obtidas de indivíduos separados em dois grupos: 1) Indivíduos não usuários de medicamentos anti-hipertensivos, antidiabéticos e antilipêmicos objetos deste estudo; e 2) Indivíduos que já fazem uso de medicamentos anti-hipertensivos, antidiabéticos e antilipêmicos objetos deste estudo. O grupo 1 será composto por 20 (vinte) indivíduos voluntários sadios. O grupo 2 será

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

Página 01 de 07



Continuação do Parecer: 3.113.448

Outros	Parecer_GEP_HC.pdf	04/10/2018 10:14:14	CHRISTIAN FERNANDES	Aceito
Outros	Parecer_Camara_do_Departamento.pdf	04/10/2018 10:13:49	CHRISTIAN FERNANDES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	04/10/2018 10:01:15	CHRISTIAN FERNANDES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 15 de Janeiro de 2019

Assinado por:
 Eliane Cristina de Freitas Rocha
 (Coordenador(a))

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

Página 07 de 07


ANEXO B – Certificado de apresentação de pôster do IV ABCF Congress, realizado em São Paulo - SP, em setembro/2018

CERTIFICATE

We certify that the work **SIMULTANEOUS DETERMINATION OF ANTIHYPERTENSIVE, ANTI-DIABETICS AND ANTILIPEMIC DRUGS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY**, authorship of **MATEUS ARAÚJO CASTRO E SOUZA**, **VINICIUS EXPEDITO DE JESUS ROCHA**, **GERSON ANTONIO PIANETTI**, **MARIA BEATRIZ DE ABREU GLÓRIA**, **CHRISTIAN FERNANDES**, was presented as **POSTER PRESENTION** at the **IV Congress of the Brazilian Association of Pharmaceutical Sciences - Biological Drugs: From Technology to Pharmaceutical Care**, held in **São Paulo (SP), Brazil**, from **September 6 to 8, 2018**.



Maria José Soares Mendes Giannini
President Congress



Teresa Dalla Costa
President ABCF



ABCF - 2018
BRAZILIAN ASSOCIATION OF PHARMACEUTICAL SCIENCES
Biological Drugs: from Technologies to Pharmaceutical Care

September 06 to 08, 2018
CENTRO FECOMÉRCIO DE EVENTOS, SÃO PAULO, SP

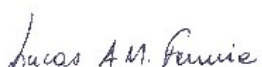
ANEXO C – Certificados de apresentação de pôster e de menção honrosa do Simpósio em Ciências Farmacêuticas – Sincifar, realizado em Belo Horizonte - MG, em novembro/2018



Certificado

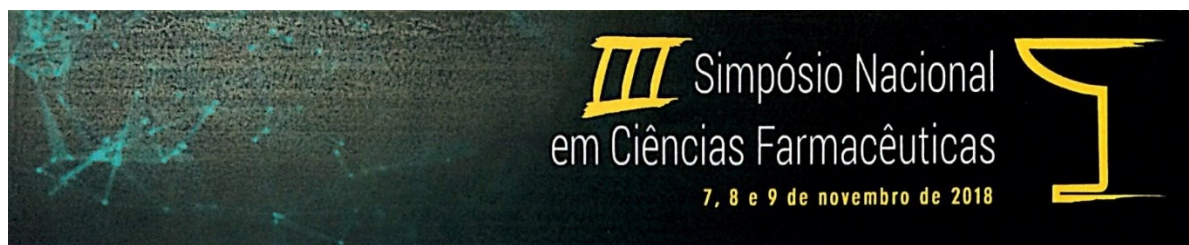
Certificamos que **Mateus Araújo Castro e Souza** apresentou o trabalho intitulado **DETERMINAÇÃO DE ANTAGONISTAS DO RECEPTOR DE ANGIOTENSINA II EMPREGANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO POR FLUORESCÊNCIA** do(s) autor(es) **SOUZA, M. A. C.; BORGATI, T. F.; GLÓRIA, M. B. A.; PIANETTI, G. A.; FERNANDES, C.** na modalidade de **pôster** durante o **III Simpósio em Ciências Farmacêuticas – SINCIFAR**.

Belo Horizonte, 09 de novembro de 2018.


 Lucas Antônio Miranda Ferreira
 Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
 Faculdade de Farmácia – UFMG


 Saulo Fehelberg Pinto Braga
 Membro da Comissão Organizadora
 III SINCIFAR

UFMG



Certificado

Certificamos que o trabalho **DETERMINAÇÃO DE ANTAGONISTAS DO RECEPTOR DE ANGIOTENSINA II EMPREGANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO POR FLUORESCÊNCIA** apresentado por **Mateus Araújo de Castro e Souza** do(s) autor(es) **SOUZA, M.A.C.; BORGATI, T.F.; GLÓRIA, M.B.A.; PIANETTI, G.A.; FERNANDES, C.** recebeu menção honrosa pela apresentação do pôster no **III Simpósio em Ciências Farmacêuticas – SINCIFAR**.

Belo Horizonte, 09 de novembro de 2018.


 Lucas Antônio Miranda Ferreira
 Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
 Faculdade de Farmácia – UFMG


 Saulo Fehelberg Pinto Braga
 Membro da Comissão Organizadora
 III SINCIFAR

UFMG



ANEXO D – Certificado de apresentação de pôster do Simpósio em Ciências Farmacêuticas – Sincifar, realizado em Belo Horizonte - MG, em novembro/2018



Certificado

Certificamos que **Vinícius Expedito de Jesus Rocha** apresentou o trabalho intitulado **OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS PARA A DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE FÁRMACOS ANTIDIABÉTICOS, ANTI-HIPERTENSIVOS E HIPOCOLESTEROLEMIANTES** do(s) autor(es) **ROCHA, V. E. J.; SOUZA, M. A. C.; GLÓRIA, M. B. A.; PIANETTI, G. A.; FERNANDES, C.** na modalidade de **pôster** durante o **III Simpósio em Ciências Farmacêuticas – SINCIFAR.**

Belo Horizonte, 09 de novembro de 2018.

Lucas Antônio Miranda Ferreira

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Faculdade de Farmácia – UFMG

Saulo Fehelberg Pinto Braga

Membro da Comissão Organizadora
III SINCIFAR

ANEXO E – Certificado de apresentação de pôster do Simpósio Latino Americano em Cromatografia e Técnicas Relacionadas (COLACRO), realizado em Aracaju - SE, em julho/2019



Certificate of Participation

We hereby certify that

DETERMINATION OF ANGIOTENSIN II RECEPTOR BLOCKERS IN HUMAN PLASMA BY HPLC-FLU

From the authors Mateus Araújo Castro Souza, Maria Beatriz Abreu Glória, Gerson Antônio Pianetti, Christian Fernandes, was presented at the **XVII Latin American Symposium on Chromatography and Related Techniques/Brazilian Symposium on Chromatography/Workshop on Recent Advances in Sample Preparation**, held at Tiradentes University in Aracaju, from July 14-19, 2019, in the form Banner .

Aracaju, 19th July 2019

Eliana Bastos Caramão
Eliana Bastos Caramão

President of the Organizing Committee of COLACRO XVII



Organization



Executive Secretariat



ANEXO F – Artigo publicado no periódico *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (volume 188), em junho de 2020

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 188 (2020) 113403



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jpba



Short communication

A simple and sensitive HPLC-FL method for simultaneous determination of angiotensin II receptor antagonists in human plasma



Mateus Araújo Castro e Souza, Naialy Fernandes Araújo Reis, Isabella Marques da Silva Leite, Maria Beatriz A. Gloria, Gerson Antônio Pianetti, Maria Auxiliadora Parreiras Martins, Isabella Cristina Plácido de Oliveira Pacheco, Christian Fernandes*

Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos 6627, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 February 2020

Received in revised form 22 May 2020

Accepted 23 May 2020

Available online 4 June 2020

Keywords:

Angiotensin receptor blockers

Liquid chromatography

Fluorescence

Protein precipitation

Microextraction by packed sorbent

Liquid-liquid extraction

ABSTRACT

Angiotensin II receptor antagonists are one of the most widely used classes of antihypertensive drugs. In this study, an HPLC fluorescence method after protein precipitation (PPT) extraction was developed and validated for determination of olmesartan, losartan, irbesartan, and valsartan in human plasma. The separation was carried out on a Luna cyano (250 × 4.6 mm i.d.; 5 μm particle size) column and the mobile phase was composed of acetonitrile and 0.1 % phosphoric acid in gradient elution, at a flow rate of 1.2 mL min⁻¹. A PPT method was optimized by a two-level factorial design with triplicate at the central point. The parameters that could affect the extraction (sample volume and acetonitrile/plasma volume ratio) were evaluated and the method was compared to microextraction by packed sorbent (MEPS) and liquid-liquid extraction (LLE). The developed method allowed the simultaneous quantification of the analytes employing a simple and cheap sample preparation method and a short chromatographic run (13 min). This method was fully validated showing selectivity, precision, accuracy, and linearity over the range of 25.0–1500.0 ng mL⁻¹ for olmesartan and valsartan, 25.0–2500.0 ng mL⁻¹ for irbesartan, and 35.0–2500.0 ng mL⁻¹ for losartan. Finally, the method was successfully applied in the analysis of human plasma from volunteers.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cardiovascular diseases (CVDs) are the major causes of mortality in the world, accounting for approximately 17 million deaths each year, nearly 31 % of the total, with hypertension as one of the main risk factors for development of CVDs. Hypertension is characterized by a systolic blood pressure equal to or above 140 mmHg and/or diastolic blood pressure values equal to or above 90 mmHg [1].

Angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor antagonists (ARA-II) are the most widely used drugs for the treatment of hypertension. Several ARA-II are commercially available, including irbesartan (IRB), losartan (LOS), olmesartan (OLM), and valsartan (VAL) (Fig. 1). For OLM, a prodrug is administered, olmesartan medoxomil, which is rapidly and completely metabolized to OLM by esterases. Due to the wide range of therapeutic

doses for ARA-II (10 mg for olmesartan medoxomil up to 320 mg for VAL) commonly used in pharmacological therapy for hypertension, plasma concentrations can vary from ng mL⁻¹ (LOS and OLM) to μg mL⁻¹ (IRB and VAL) [2].

When evaluating characteristics of patients with hypertension and coronary artery disease, among patients receiving antihypertensive drugs (80 %), less than 25 % had controlled blood pressure [3]. One significant cause is non-adherence to treatment. Therefore, therapeutic drug monitoring may be important to avoid complications related to hypertension.

Analytical methods for the simultaneous determination of some ARA-II in human plasma are available in the literature employing different detection techniques, most of which used UV [4], fluorescence [5–7], and mass spectrometry [8–15]. However, to the best of our knowledge, none investigated the simultaneous quantification of OLM, IRB, LOS, and VAL in human plasma. Moreover, a comprehensive comparison of different approaches (protein precipitation, liquid-liquid extraction, and microextraction by packed sorbent) for the extraction of these drugs from human plasma has

* Corresponding author.

E-mail address: cfernandes@farmacia.ufmg.br (C. Fernandes).

<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113403>

0731-7085/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO G – Artigo publicado no periódico *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (volume 119), em 2018, como resultado de colaboração realizada durante o período do doutorado

European Journal of Pharmaceutical Sciences 119 (2018) 112–120



Encapsulation of *trans*-aconitic acid in mucoadhesive microspheres prolongs the anti-inflammatory effect in LPS-induced acute arthritis



Diego Pinto de Oliveira^a, Gabriela Guimarães Augusto^a, Nathália Vieira Batista^b, Vivian Louise S. de Oliveira^b, Diêgo Santos Ferreira^a, Mateus Araújo Castro e Souza^a, Christian Fernandes^a, Flávio Almeida Amaral^b, Mauro Martins Teixeira^b, Rodrigo Maia de Pádua^a, Mônica Cristina Oliveira^a, Fernão Castro Braga^{a,*}

^a Department of Pharmaceutical Products, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-900 Belo Horizonte, MG, Brazil
^b Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-900 Belo Horizonte, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
trans-Aconitic acid
 Mucoadhesive microspheres
 Carbopol
 Hydroxypropylmethylcellulose
 Sustained release
 Anti-inflammatory activity
 Anti-arthritic activity

ABSTRACT

trans-Aconitic acid (TAA) is the main constituent of the leaves from the medicinal plant *Echinodorus grandiflorus*, used to treat different inflammatory diseases. TAA induces a potent but short-lasting biological response, credited to its high polarity and unfavorable pharmacokinetics. Here we developed, characterized and evaluated the anti-inflammatory activity of mucoadhesive microspheres loaded with TAA. Seven batches of mucoadhesive microspheres were prepared by the emulsification/solvent evaporation method, employing different proportions of TAA and Carbopol 934 or/and hydroxypropylmethylcellulose. All batches were characterized for their particle medium size, polydispersity index and entrapment percentage. The batch coded F3c showed highest entrapment percentage and was characterized by infrared spectroscopy (ATR-FTIR), scanning electron microscopy (SEM), differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetric analyses (TGA) and zeta potential. The anti-inflammatory activity of F3c was assessed in a model of acute arthritis induced by injection of LPS in the knee joint of Swiss mice. The granulometric analyses indicated heterogeneous size distribution for F3c. SEM characterization indicated microspheres with slightly irregular shape and rough surface. Results from ATR-FTIR and thermal analyses (DSC and TGA) pointed out absence of incompatibility between the components of the formulation; thermal events related to the constituents were isolated and randomly located, suggesting amorphous distribution of TAA in the formulation matrix. The zeta potential of the formulations varied from -30 to -34 mV, which may contribute to good stability. When given orally to mice, F3c induced a prolonged anti-inflammatory response by reducing total cell count and neutrophilic accumulation in the joint cavity even when given 48 and 36 h before the stimulus, respectively, in comparison to free TAA (up to 24 and 6 h, respectively). Therefore, the encapsulation of TAA in mucoadhesive microspheres provided its sustained release, indicating that this drug delivery system is a potential agent to treat inflammatory diseases by regulating cell influx.

1. Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic disease that affects approximately 1% of the world population, more prevalent in women than in men (McInnes and Schett, 2011). RA is characterized by synovial hyperplasia due to leucocytes accumulation into the joint cavity, exacerbated cytokines production, cartilage and bone degradation with debilitating clinical manifestations such as chronic pain and joints deformities (Coelho et al., 2008; Prommer et al., 2010; Venkatesha et al., 2011). RA management often demands multidrug treatment and

current effective therapies are based on cytokines antagonists, which are costly biological drugs that require parenteral administration (Pédernan, 2002; Laine et al., 2016). Therefore, the development of orally bioavailable drugs is demanded as an alternative for the management of arthritis.

The oral route is the most convenient for drug administration; however, many drugs show unfavorable pharmacokinetic properties, including inability to restrain and localize in the gastro-intestinal tract (GIT) on short-term, reflecting in unsatisfactory absorption (Carvalho et al., 2010; Prem et al., 2017). These limitations can be overcome by

* Corresponding author.

Email address: fernao@braga@farmacia.ufmg.br (F. Castro Braga).

<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.04.010>

Received 4 October 2017; Received in revised form 14 March 2018; Accepted 4 April 2018

Available online 05 April 2018

0928-0987/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO H – Artigo publicado no periódico *International Journal of Pharmaceutics* (volume 587), em 2020, como resultado de colaboração realizada durante o período do doutorado

International Journal of Pharmaceutics 587 (2020) 119694



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm



Enhancing the solubility and permeability of the diuretic drug furosemide *via* multicomponent crystal forms

Luan F. Diniz^{a,b}, Paulo S. Carvalho Jr.^c, Sarah A.C. Pena^a, José E. Gonçalves^a, Mateus A.C. Souza^a, José D. de Souza Filho^b, Lucius F.O. Bomfim Filho^b, Chris H.J. Franco^d, Renata Diniz^b, Christian Fernandes^{a,*}

^a Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos, Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas (ICE), Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901-Belo Horizonte, MG, Brazil

^c Instituto de Física, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 79074-460 Campo Grande, MS, Brazil

^d Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas (ICE), Universidade Federal de Juiz de Fora, 36036-900-Juiz de Fora, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Furosemide
Cocrystal
X-ray diffraction
Crystal structures
Permeability

ABSTRACT

Furosemide (FSM) is a biopharmaceutical classification system (BCS) class IV drug, being a potent loop diuretic used in the treatment of congestive heart failure and edema. Due to its low solubility and permeability, FSM is known for exhibiting poor oral bioavailability. In order to overcome or even minimize these undesirable biopharmaceutical attributes, in this work we have focused on the development of more soluble and permeable multicomponent solid forms of FSM. Using solvent evaporation as crystallization method, a salt and a cocrystal of FSM with imidazole (IMI) and 5-fluorocytosine (5FC) cocrystals, named FSM-IMI and FSM-5FC, respectively, were successfully prepared. A detailed structural study of these new solid forms was conducted using single and powder X-ray diffraction (SCXRD, PXRD), Fourier Transform Infrared (FT-IR) and proton Nuclear Magnetic Resonance (¹H NMR) spectroscopy and thermal analysis (thermogravimetry, differential scanning calorimetry and hot-stage microscopy). Both FSM-IMI and FSM-5FC showed substantial enhancements in the solubility (up 118-fold), intrinsic dissolution (from 1.3 to 2.6-fold) and permeability (from 2.1 to 2.8-fold), when compared to the pure FSM. These results demonstrate the potential of these new solid forms to increase the limited bioavailability of FSM.

1. Introduction

The engineering of multicomponent crystal forms, e.g. salts and cocrystals, based on consolidated active pharmaceutical ingredients (APIs) has propitiated noteworthy advances in the pharmaceutical field (Berry and Steed, 2017; Duggirala et al., 2016; Schultheiss and Newman, 2009; Shan and Zaworotko, 2008). Rational and planned changes in crystalline arrangements, i.e. inclusion of molecules (coformers) without breaking covalent bonds, not only preserves the inherent drug activities but also confer variability of physicochemical properties of APIs (Dai et al., 2018; Desiraju, 2013; Steed, 2013). From this perspective, salt and cocrystal formation has consolidated itself as the most effective and low-cost method to improve drug's properties (aqueous solubility, dissolution rate, permeability and hygroscopicity) (Diniz et al., 2017; Elder et al., 2013; Serajuddin, 2007). Overall, pharmaceutically acceptable bases are used to interact via hydrogen

bonding with acidic drugs, such as furosemide (FSM, Fig. 1), and thereby convert it into salts or cocrystals.

FSM is a Biopharmaceutical Classification System (BCS) class IV (Lindenberg et al., 2004) loop diuretic drug widely used to treat hypertension and edema (Brater, 2000). This API, though ionizable, is marketed as a neutral compound, suffering from both low aqueous solubility (< 0.1 mg mL⁻¹ at 37 °C) (Granero et al., 2012) and low permeability ($P_{app} = 0.11 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$) (Pade and Stavchansky, 1997). Consequently, its oral bioavailability is variable, reaching a maximum of 50% (Michael et al., 1974; Pade and Stavchansky, 1998). Motivated by this unfavorable pharmaceutical profile, several approaches have been employed to minimize the FSM issues, which includes solid dispersions (Shin and Kim, 2003), cogrinding with polymeric materials (Shin et al., 1998), complexation with cyclodextrins (Özdemir and Ordu, 1998), self-emulsifying drug delivery systems (Zvonar et al., 2010), nanoparticles (Radwan et al., 2017) and

* Corresponding author.

E-mail address: cfernandes@farmacia.ufmg.br (C. Fernandes).

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119694>

Received 6 May 2020; Received in revised form 8 July 2020; Accepted 23 July 2020

Available online 26 July 2020

0378-5173/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO I – Artigo publicado no periódico *Journal of Chromatographic Science*, em outubro de 2020, como resultado de colaboração realizada durante o período do doutorado



Journal of Chromatographic Science, 2020, 1–10
doi: 10.1093/chromsci/bmaa073
Article



Downloaded from https://academic.oup.com/chromsci/advance-article-abstract/doi/10.1093/chromsci/bmaa073/5940794 by Universidade Federal de Minas Gerais user on 03 December 2020

Article

UHPLC for Quality Evaluation of Genuine and Illegal Medicines Containing Sildenafil Citrate and Tadalafil

Naialy Fernandes Araújo Reis¹, Luiz Felipe Gomes da Silva¹, Mateus Araújo Castro e Souza¹, Sílvia Ligório Fialho², Carolina Paula de Souza Moreira², Marcus Vinícius de Oliveira Andrade³, Washington Xavier de Paula⁴, Maria Beatriz Abreu Gloria¹, Gerson Antônio Pianetti¹, and Christian Fernandes¹

¹Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos, Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil, ²Serviço de Desenvolvimento Tecnológico Farmacêutico, Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG, Brazil, ³Setor Técnico Científico, Superintendência de Polícia Federal, Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil, and ⁴Instituto de Criminalística, Polícia Civil, Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

*Author to whom correspondence should be addressed. Email: cfemandes@farmacia.ufmg.br

Received 23 March 2020; Editorial Decision 6 September 2020

Abstract

One of the highest incidences of illegal drug products is related to phosphodiesterase-5 inhibitors, used in treatment of erectile dysfunction, including those containing sildenafil citrate and tadalafil. In this context, comprehensive evaluation of the quality of genuine and illegal medicines was performed. A simple and rapid ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC-UV) method to quantify sildenafil and tadalafil in the presence of six degradation products was developed and validated. Sildenafil and tadalafil were submitted to forced degradation. The separation was carried out on a Kinetex C₁₈ (50 × 2.1 mm; 1.7 μm) column with mobile phase composed of acetonitrile and aqueous triethylamine solution. The calibration curves were linear in the range of 14–126 μg mL⁻¹ for sildenafil citrate and 4–36 μg mL⁻¹ for tadalafil and the method proved to be selective, precise, accurate and robust. Sildenafil degraded in oxidative media, whereas tadalafil degraded in acidic, alkaline and oxidative environment. The chemical structures and the mechanisms for the formation of the main degradation products were proposed by UHPLC coupled to tandem mass spectrometry. The UHPLC-UV method was applied in the pharmaceutical analysis of genuine and seized medicines. Some of them did not meet quality standards, mainly due to contents below specifications and the large variation on contents between units within a batch.

ANEXO J – Artigo publicado no periódico *Current Pharmaceutical Analysis* (volume 16), em 2020, durante o período do doutorado

Send Orders for Reprints to rprints@benhamsience.net

Current Pharmaceutical Analysis, 2020, 16, 5-11

5



RESEARCH ARTICLE

An Easy and Rapid Spectrophotometric Method for Determination of Chloroquine Diphosphate in Tablets

Mateus Araújo Castro e Souza^{1,*}, Naialy Fernandes Araújo Reis¹, Larissa de Souza Batista¹, Isabela da Costa César¹, Christian Fernandes¹ and Gerson Antônio Pianetti¹

¹Quality Control Laboratory for Medicines and Cosmetics, Department of Pharmaceutical Products, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Abstract: *Introduction:* Malaria, an infectious disease caused by protozoa of the genus *Plasmodium*, is highly prevalent in the Brazilian Amazon. Chloroquine is the first-choice drug for the treatment of malaria caused by *P. vivax* and *P. malariae*. The humid and hot climate characteristic of the Brazilian endemic region favors drug degradation and modification of its biopharmaceutical properties, which may result in subtherapeutic dosage, formation of degradation products that can be toxic to humans and appearance of parasitic resistance. Thus, it is necessary to monitor the quality of chloroquine tablets.

Materials and Methods: An analytical method was developed and validated to determine chloroquine content in tablets by ultraviolet spectrophotometry. The diluent consisted of 0.06 M monosodium phosphate buffer pH 6.8 and detection was performed at 343 nm.

Results and Conclusion: The method proved to be linear in the range of 7.2 to 19.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, precise, accurate, selective, robust, and statistically equivalent to a liquid chromatographic method by the United States Pharmacopeia. The developed method was applied to determine chloroquine content in six batches of the drug. The evaluated batches were considered adequate for identification, assay, dissolution, disintegration and uniformity of dosage units, and were found to be inadequate in terms of friability.

ARTICLE HISTORY

Received: January 30, 2018
Revised: July 05, 2018
Accepted: July 23, 2018

DOI:
10.2174/1575412914066180730123426



Keywords: Malaria, chloroquine diphosphate, tablets, ultraviolet spectrophotometry, analytical method development, quality control.

1. INTRODUCTION

Malaria is the most common and important infectious disease in humans. It is estimated that around 3 billion people worldwide are at risk of contracting malaria, mainly in Asia, Africa and Central and South America. In Brazil, up to 20% of the population is at risk of infection [1].

The National Program for Malaria Control (PNCM), established by Brazilian government, aims to reduce fatality, severity and disease incidence, eliminate transmission in urban areas and maintain absence of disease in the regions where the transmission has already been interrupted. Through the PNCM, the Ministry of Health distributes drugs to control malaria in the Unified Health System, and chloroquine is the drug of first choice for the treatment of uncomplicated malaria [2].

Chloroquine diphosphate, chemically known as N4-(7-chloro-4-quinolinyl)-N1,N1-diethyl-1,4-pentanediamine

diphosphate (Fig. 1), molecular mass of 515.86 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, is a 4-aminoquinoline commonly prescribed for the treatment of malaria [3, 4].

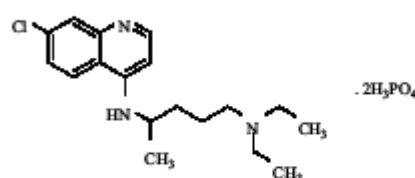


Fig. (1). Chemical structure of chloroquine diphosphate.

The high temperature (average of 28 °C) and humidity (88% in the rainy season and 77% in the dry season), characteristic of the Brazilian malaria endemic region [5], favors the degradation and alteration of the biopharmaceutical properties of the drugs. This may result in sub-therapeutic dosage and formation of degradation products toxic to humans. Thus, the parasites are more likely to develop resistance to antimalarial and, therefore, the treatment goals may not be achieved [6, 7]. To ensure the efficacy and safety of

*Address correspondence to this author at the Quality Control Laboratory for Medicines and Cosmetics, Department of Pharmaceutical Products, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; E-mail: mateusaraujo@yahoo.com.br