

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

JÉSSICA MAURÍCIO BATISTA

**DETERMINAÇÃO DE LOSARTANA E VALSARTANA EM PLASMA HUMANO
EMPREGANDO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA À BASE DE NANOTUBOS DE
NITRETO DE BORO E CROMATOGRÁFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA**

Belo Horizonte

2021

JÉSSICA MAURÍCIO BATISTA

**DETERMINAÇÃO DE LOSARTANA E VALSARTANA EM PLASMA HUMANO
EMPREGANDO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA À BASE DE NANOTUBOS DE
NITRETO DE BORO E CROMATOLOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA**

Versão final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obter o grau de mestra em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Christian Fernandes.

Belo Horizonte

2021

Batista, Jéssica Maurício.
B333d Determinação de losartana e valsartana em plasma humano empregando extração em fase sólida à base de nanotubos de nitrato de boro e cromatografia a líquido de alta eficiência / Jéssica Maurício Batista. – 2021.
125 f. : il.

Orientador: Christian Fernandes.

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

1. Agentes hipotensores – Teses. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência – Teses. 3. Medicamentos – Pesquisa – Teses. 4. Plasma – Teses. 5. Validação de método – Teses. I. Fernandes, Christian. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD: 615.4



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

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DA ALUNA JÉSSICA MAURÍCIO BATISTA

Realizou-se, no dia 21 de outubro de 2021, às 09:00 horas, por videoconferência, a 360ª defesa de dissertação, intitulada *DETERMINAÇÃO DE LOSARTANA E VALSARTANA EM PLASMA HUMANO EMPREGANDO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA À BASE DE NANOTUBOS DE NITRETO DE BORO E CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA*, apresentada por JÉSSICA MAURÍCIO BATISTA, número de registro 2019659837, graduada no curso de FARMÁCIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Prof. Dr. Christian Fernandes - Orientador (UFMG), Prof(a). Eduardo Costa de Figueiredo (UNIFAL), Prof(a). José Eduardo Gonçalves (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

(X) Aprovada

() Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 21 de outubro de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Christian Fernandes, Professor do Magistério Superior**, em 21/10/2021, às 12:08, 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 **Eduardo Costa de Figueiredo, Usuário Externo**, em 21/10/2021, às 12:08, 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 **Jose Eduardo Goncalves, Professor do Magistério Superior**, em 21/10/2021, às 12:08, 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 **1031340** e o código CRC **FCD68A85**.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos:

Ao Prof. Dr. Christian Fernandes, por ter me recebido de braços abertos no Laboratório de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e Cosméticos (LCQ) da Faculdade de Farmácia (FAFAR) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG); pela orientação inegavelmente eficiente desde a minha graduação e pela valiosa contribuição em meu crescimento profissional.

À todos os membros do LCQ, em especial, aos farmacêuticos Luan Farinelli, Melina Luiza e Mateus Araújo, pelo auxílio concedido durante a execução deste estudo.

Ao Dr. Wellington Marcos da Silva e à Prof^ª. Dra. Edésia Martins Barros de Sousa, pela importante colaboração e partilha de saberes.

Ao Laboratório de Hematologia Clínica da FAFAR, ao Ambulatório de Anticoagulação do Serviço de Hematologia e Oncologia do Hospital das Clínicas da UFMG e ao Centro de Microscopia da UFMG, por disponibilizarem o espaço e a infraestrutura adequada para a realização de etapas importantes.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, pela bolsa de estudo.

À todos os meus amigos, em especial, à Cristiane Monteiro, pelo companheirismo durante esta caminhada.

E por fim, mas não menos importante, à minha família de sangue, coração e alma, porque sem vocês, quem eu seria?

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.”

(Isaac Newton)

“O essencial é invisível aos olhos”.
(O pequeno príncipe - Antoine de Saint-Exupéry).

RESUMO

A determinação de fármacos em fluídos biológicos pode ser feita com diferentes propósitos. Todavia, a complexidade dessas matrizes pode tornar a etapa de preparo de amostras desafiadora. A extração em fase sólida tem sido uma das principais técnicas de extração de moléculas nos mais diversos tipos de amostras líquidas. Apesar dos avanços alcançados com o desenvolvimento de diversos dispositivos miniaturizados de SPE, os principais sorventes empregados são baseados em reagentes organosilanos, quimicamente ligados à superfície da sílica. Devido às limitações inerentes a esses sorventes, o desenvolvimento de novas fases extratoras tornou-se uma alternativa viável para o aprimoramento da técnica. No presente estudo, determinaram-se losartana e valsartana em plasma humano, os dois fármacos da classe dos antagonistas dos receptores da angiotensina II mais empregados na prática clínica. Esses fármacos foram extraídos em cartuchos para extração em fase sólida, contendo nanotubos de nitreto de boro funcionalizados com grupos octadecila como sorvente, e analisados por cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada a detector de fluorescência. As condições de extração otimizadas, obtidas por meio de planejamento fatorial, foram 60 mg de nanosorvente; 2 mL de metanol para a ativação da fase sólida; 500 µL de tampão fosfato de potássio monobásico anidro 10 mM pH 2 para o condicionamento dos cartuchos; vazão de, aproximadamente, 0,3 mL/min para a passagem das amostras; 250 µL de mistura de tampão fosfato de potássio monobásico anidro 10 mM pH 2 e metanol (90:10) para a etapa de lavagem; e 2 mL de metanol para a eluição dos fármacos. Entre uma extração e outra, 1 mL de acetonitrila foram passados pelos cartuchos para a remoção de compostos interferentes fortemente retidos pelo nanosorvente. A irbesartana foi empregada como padrão interno. As condições cromatográficas do método bioanalítico permitiram a separação dos compostos de interesse e compostos interferentes com resolução e tempo de corrida satisfatórios. As condições cromatográficas empregadas foram: coluna analítica contendo fase estacionária com grupos bifenila, do tipo *core-shell* (100 x 4,6 mm; 2,6 µm); fase móvel composta por solução de trietilamina 0,1% (v/v) e metanol (pH 3,2), com eluição em gradiente, na vazão de 0,7 mL/min; volume de injeção de 10 µL; temperatura de 25 ± 3 °C; e comprimento de onda de excitação de 250 nm e de emissão de 375 nm. A avaliação das figuras de mérito, segundo as recomendações dos guias nacionais e internacionais de validação, possibilitou observar linearidade, precisão e exatidão, nas faixas de concentração de 50 – 1200 ng/mL para losartana e 20 – 1700 ng/mL para valsartana. A aplicabilidade do método foi confirmada por meio da análise de amostras de plasma de pacientes sob terapia anti-hipertensiva.

Palavras-chave: extração em fase sólida; nanotubos de nitreto de boro; grupos octadecila; plasma humano; planejamento fatorial.

ABSTRACT

The determination of drugs in biological fluids can be done for different purposes. However, the complexity of these matrices can make the sample preparation step challenging. Solid phase extraction has been one of the main techniques for extracting molecules from the most diverse types of liquid samples. Despite the advances achieved with the development of several miniaturized solid phase extraction devices, the main sorbents used are based on organosilane reagents, chemically bonded to the silica surface. Due to the inherent limitations of these sorbents, the development of new extracting phases has become a viable alternative to improve the technique. In the present study, losartan and valsartan were determined in human plasma, the two drugs of the class of angiotensin II receptor antagonists most used in clinical practice. These drugs were extracted in cartridges for solid phase extraction, containing boron nitride nanotubes functionalized with octadecyl groups as sorbent, and analyzed by high-performance liquid chromatography coupled with a fluorescence detector. The optimized extraction conditions, obtained through factorial design, were 60 mg of nanosorbent; 2 mL methanol for solid phase activation; 500 μ L of potassium phosphate monobasic anhydrous buffer 10 mM pH 2 for cartridge conditioning; flow rate of approximately 0.3 mL/min for the passage of samples; 250 μ L of a mixture of potassium phosphate monobasic anhydrous buffer 10 mM pH 2 and methanol (90:10) for the wash step; and 2 mL of methanol for drug elution. Between one extraction and another, 1 mL of acetonitrile was passed through the cartridges to remove interfering compounds strongly retained by the nanosorbent. Irbesartan was used as an internal standard. The chromatographic conditions of the bioanalytical method allowed the separation of compounds of interest and interfering compounds with satisfactory resolution and running time. The chromatographic conditions used were: core-shell biphenyl analytical column (100 x 4.6 mm; 2.6 μ m); mobile phase composed of 0.1% (v/v) triethylamine and methanol (pH 3.2), in gradient elution, at 0.7 mL/min; injection volume of 10 μ L; temperature 25 ± 3 °C; and 250 nm excitation and 375 nm emission wavelengths. The evaluation of the figures of merit, according to the recommendations of the national and international validation guidelines, made it possible to observe linearity, precision and accuracy, in the concentration ranges of 50 – 1200 ng/mL for losartan and 20 – 1700 ng/mL for valsartan. The applicability of the method was confirmed through the analysis of plasma samples from patients undergoing antihypertensive therapy.

Keywords: solid phase extraction; boron nitride nanotubes; octadecyl groups; human plasma; factorial planning.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Proporções de consumo de tempo e de erros analíticos na análise de compostos em amostras complexas por CLAE.....	26
Figura 2 –	Representação esquemática das principais etapas da SPE.....	28
Figura 3 –	Ilustração das principais configurações miniaturizadas.....	29
Figura 4 –	Exemplos de dispositivos comerciais miniaturizados.....	30
Figura 5 –	Nanomateriais utilizados como nanosorventes não seletivos em dispositivos de SPE para o preparo de amostras biológicas.....	31
Figura 6 –	Tendências para o aprimoramento da SPE e das suas miniaturizações.	32
Figura 7 –	Ilustração do h-BN (A), ângulos de rolamento dos SW-BNNTs (B) e organização estrutural dos MW-BNNTs (C).....	33
Figura 8 –	Ilustração de um dispositivo de SPME <i>in vivo</i> para animais de pequeno porte.....	35
Figura 9 –	Representação esquemática do mecanismo de formação dos BNNTs..	45
Figura 10 –	Imagem de microscopia eletrônica de varredura de BNNTs não purificados (A) e purificados com tratamento ácido (B).....	46
Figura 11 –	Oxidação dos BNNTs com mistura de ácido sulfúrico e ácido nítrico (A) e funcionalização dos BNNTs com ODA (B).....	47
Figura 12 –	Imagens de MET da amostra BNNT-P.....	48
Figura 13 –	Espectro de DRX da amostra BNNT-P.....	48
Figura 14 –	Espectros de FTIR das amostras BNNT-NP e BNNT-C18.....	49
Figura 15 –	Curvas termogravimétricas das amostras BNNT-NP, BNNT-P e BNNT-C18.....	50

Figura 16 – Ilustração dos cartuchos para SPE (A) e do sistema de filtração a vácuo do tipo Manifold (B).....	58
Figura 17 – Gráficos de intensidade relativa de fluorescência <i>versus</i> pH dos ARAs II.....	61
Figura 18 – Diagramas de distribuição de espécies dos ARAs II.....	61
Figura 19 – Espectros de absorção na região do ultravioleta dos ARAs II.....	63
Figura 20 – Espectros de emissão de fluorescência dos ARAs II.....	64
Figura 21 – Cromatograma da solução metanólica com 400 ng/mL de LOS e 250 ng/mL de VAL, IRB e CAN CIL.....	65
Figura 22 – Cromatograma do MeOH e da solução metanólica com 160 ng/mL de LOS e 110 ng/mL de VAL, IRB e CAN CIL.....	66
Figura 23 – Curvas analíticas dos ARAs II.....	70
Figura 24 – Gráficos dos resíduos em função dos valores previstos de y.....	72
Figura 25 – Gráficos de probabilidade normal dos efeitos.....	80
Figura 26 – Gráficos de contorno dos ARAs II.....	98
Figura 27 – Cromatogramas obtidos na avaliação da seletividade.....	100
Figura 28 – Curvas de calibração dos analitos.....	102
Figura 29 – Gráficos dos resíduos em função dos valores previstos de y.....	105
Figura 30 – Cromatogramas obtidos na avaliação do efeito residual.....	107
Figura 31 – Cromatograma da amostra de plasma do segundo voluntário.....	113

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Principais propriedades físico-químicas dos ARAs II utilizados neste estudo.....	36
Quadro 2 –	Métodos bioanalíticos, publicados nos últimos cinco anos, para a determinação de ARAs II em plasma humano.....	38
Quadro 3 –	Condições cromatográficas do método analítico.....	64
Quadro 4 –	Condições fixas do estudo preliminar de extração.....	77
Quadro 5 –	Condições otimizadas no estudo preliminar de extração.....	81
Quadro 6 –	Condições fixas do estudo de extração.....	95
Quadro 7 –	Condições do método de extração.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Média dos valores de potencial zeta das amostras BNNT-NP e BNNT-P.....	49
Tabela 2	– Variáveis do PFF 2^{6-2}_{IV}	59
Tabela 3	– Resultados da avaliação da adequação do sistema cromatográfico.....	66
Tabela 4	– Avaliação dos dados experimentais obtidos na linearidade.....	68
Tabela 5	– Valores dos r e resultados dos testes F e T.....	70
Tabela 6	– Resultados da análise dos resíduos.....	71
Tabela 7	– Resultados da avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária...	72
Tabela 8	– Resultados da avaliação da exatidão.....	73
Tabela 9	– Resultados da avaliação da robustez (n = 2).....	74
Tabela 10	– Matriz e resultados de recuperação do PFF 2^{6-2}_{IV}	78
Tabela 11	– Estimativa dos efeitos e confundimento dos fatores do PFF 2^{6-2}_{IV}	79
Tabela 12	– Variáveis e níveis do PF 2^3 com PC.....	87
Tabela 13	– Matriz e resultados de recuperação do PF 2^3 com PC.....	96
Tabela 14	– Efeitos dos fatores do PF 2^3 com PC.....	97
Tabela 15	– Resultados da ANOVA.....	97
Tabela 16	– Resultados da avaliação da homocedasticidade das respostas analíticas.....	102
Tabela 17	– Desvio das concentrações experimentais em relação às concentrações nominais.....	103
Tabela 18	– Valores dos r e resultados dos testes F e T.....	104
Tabela 19	– Resultados da análise dos resíduos.....	104

Tabela 20 – Resultados da precisão intracorrída e intercorrídas.....	106
Tabela 21 – Resultados da exatidão intracorrída e intercorrídas.....	106
Tabela 22 – Recuperações dos ARAs II no CQB, CQM e CQA.....	108
Tabela 23 – DPR dos FMNs de cada nível de concentração.....	109
Tabela 24 – Resultados dos estudos de estabilidade da LOS.....	110
Tabela 25 – Resultados dos estudos de estabilidade da VAL.....	111
Tabela 26 – Concentração de LOS nas amostras de plasma dos voluntários hipertensos.....	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ANL	Anlodipino
ANOVA	Análise de variância (do inglês, <i>Analysis of variance</i>)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ARAs II	Antagonistas dos receptores da angiotensina II
BN	Nitreto de boro (do inglês, <i>Boron nitride</i>)
BNNS	Nanofolhas de nitreto de boro (do inglês, <i>Boron nitride nanosheets</i>)
BNNTs	Nanotubos de nitreto de boro (do inglês, <i>Boron nitride nanotubes</i>)
BNNT-C18	BNNTs funcionalizados com grupos octadecila
BNNT-NP	BNNTs não purificados
BNNT-P	BNNTs purificados e oxidados
BOCVD	Deposição química a partir de fase vapor com oxidação do boro (do inglês, <i>Boron oxide chemical vapor deposition</i>)
C18	Octadecila
CAF	Cafeína
CAN CIL	Candesartana cilexetila
CAR	Carboxeno
C_{CAL}	Valor calculado de C do teste de Cochran
CDTN	Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear
CLAE-FLU	Cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada a detector fluorimétrico
CLUE	Cromatografia a líquido de ultra eficiência
CQA	Controle de qualidade de alta concentração
CQB	Controle de qualidade de baixa concentração
CQD	Controle de qualidade de diluição
CQM	Controle de qualidade de média concentração
C_{TAB}	Valor tabelado de C do teste de Cochran
CVD	Deposição química a partir de fase vapor (do inglês, <i>Chemical vapor deposition</i>)
DPR	Desvio padrão relativo
DRX	Difração de raios X
DVB	Divinilbenzeno

EMA	Agência Europeia de Medicamentos (do inglês, <i>European Medicines Agency</i>)
EPR	Erro padrão relativo
FAFAR	Faculdade de Farmácia
F_{CAL}	Valor calculado de F do teste de Fisher-Snedecor
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FE	Fase estacionária
FEL	Felodipino
FM	Fase móvel
FMN	Fator de matriz normalizado por PI
F_{TAB}	Valor tabelado de F do teste de Fisher-Snedecor
FTIR	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (do inglês, <i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i>)
h-BN	Nitreto de boro hexagonal (do inglês, <i>Hexagonal boron nitride</i>)
HCT	Hidroclorotiazida
IRB	Irbesartana
k	Fator de capacidade
LCQ	Laboratório de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e Cosméticos
LIQ	Limite inferior de quantificação
LLE	Extração líquido-líquido (do inglês, <i>Liquid-liquid extraction</i>)
LMNB	Laboratório de Materiais Nanoestruturados para Bioaplicações
Log P	Coefficiente de partição
LOS / LOS K	Losartana / Losartana potássica
LQTA	Laboratório de Quimiometria
LSQ	Limite superior de quantificação
MeOH	Metanol
MEPS	Microextração em fase sólida na seringa (do inglês, <i>Microextraction in a packed syringe</i>)
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MIPs	Polímeros molecularmente impressos (do inglês, <i>Molecularly imprinted polymers</i>)
MMQ	Método dos mínimos quadrados
MMQO	Método dos mínimos quadrados ordinários

MW-BNNTS	Nanotubos de nitreto de boro de múltiplas paredes (do inglês, <i>Multi-walled boron nitride nanotubes</i>)
N	Número de pratos teóricos
NIC	Nicotina
NIF	Nifedipino
NIM	Nimodipino
ODA	Octadecilamina
P.A	Para análises
PC	Ponto central
PDMS	Polidimetilsiloxano
PF	Planejamento fatorial
PPF	Planejamento fatorial fracionário
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Padrão interno
PIL	Ponto ideal
pKa	Coeficiente de ionização
PO	Ponto ótimo
r	Coeficiente de correlação
R²	Coeficiente de determinação
R_{CAL}	Valor calculado de R do teste de Ryan-Joiner
R_{TAB}	Valor tabelado de R do teste de Ryan-Joiner
SBSE	Extração sortiva em barra de agitação (do inglês, <i>Stir bar sorptive extraction</i>)
SPDE	Microextração em fase sólida na agulha (do inglês, <i>Solid-phase dynamic extraction</i>)
SPE	Extração em fase sólida (do inglês, <i>Solid phase extraction</i>)
SPME	Microextração em fase sólida (do inglês, <i>Solid phase microextraction</i>)
SW-BNNTs	Nanotubos de nitreto de boro de parede simples (o inglês, <i>Single-walled boron nitride nanotubes</i>)
T	Fator de cauda
TFME	Microextração em filme fino (do inglês, <i>Thin film microextraction</i>)
TGA	Análise termogravimétrica (do inglês, <i>Thermogravimetric analysis</i>)
t_R	Tempo de retenção
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VAL	Valsartana

Z_{TAB}

Valor tabelado de Z do teste de Grubbs

Z_{CAL}

Valor calculado de Z do teste de Grubbs

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	23
2	OBJETIVO GERAL.....	24
3	ORGANIZAÇÃO GERAL.....	24
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
4.1	PREPARO DE AMOSTRAS.....	25
4.1.1	Técnicas convencionais.....	26
4.1.2	Configurações modernas.....	28
4.2	SORVENTES EMPREGADOS EM EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA..	30
4.3	NANOESTRUTURAS DE NITRETO DE BORO.....	32
4.4	ANTAGONISTAS DOS RECEPTORES DA ANGIOTENSINA II.....	35
4.5	MÉTODOS BIOANALÍTICOS RECENTES PARA A DETERMINAÇÃO DOS FÁRMACOS EM PLASMA HUMANO.....	37

CAPÍTULO 1 - OBTENÇÃO DOS NANOTUBOS DE NITRETO DE BORO FUNCIONALIZADOS COM GRUPOS OCTADECILA

1	INTRODUÇÃO.....	41
2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1	MATERIAL.....	41
3.1.1	Reagentes, solventes e consumíveis.....	41
3.1.2	Equipamentos.....	42
3.2	MÉTODOS.....	42
3.2.1	Síntese, purificação e oxidação dos nanotubos de nitreto de boro.....	42
3.2.1.1	Síntese.....	42
3.2.1.2	Purificação e oxidação.....	42
3.2.2	Funcionalização dos nanotubos de nitreto de boro.....	43
3.2.3	Caracterização dos nanotubos de nitreto de boro.....	43
3.2.3.1	Microscopia eletrônica de transmissão.....	43
3.2.3.2	Difração de raios X.....	43

3.2.3.3	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier.....	44
3.2.3.4	Potencial zeta.....	44
3.2.3.5	Análise termogravimétrica.....	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1	SÍNTESE DOS NANOTUBOS DE NITRETO DE BORO.....	44
4.2	PURIFICAÇÃO, OXIDAÇÃO E FUNCIONALIZAÇÃO DOS NANOTUBOS DE NITRETO DE BORO.....	46
4.3	CARACTERIZAÇÃO DOS NANOTUBOS DE NITRETO DE BORO.	47
4.3.1	Microscopia eletrônica de transmissão.....	47
4.3.2	Difração de raios X.....	48
4.3.3	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier e potencial zeta.....	48
4.3.4	Análise termogravimétrica.....	50
5	CONCLUSÃO.....	50

CAPÍTULO 2 - ESTUDO PRELIMINAR DE EXTRAÇÃO DOS ANTAGONISTAS DOS RECEPTORES DA ANGIOTENSINA II

1	INTRODUÇÃO.....	53
2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	53
3.1	MATERIAL.....	53
3.1.1	Insumos farmacêuticos ativos.....	53
3.1.2	Reagentes, solventes e consumíveis.....	54
3.1.3	Equipamentos.....	54
3.2	MÉTODOS.....	55
3.2.1	Desenvolvimento do método analítico.....	55
3.2.2	Validação do método analítico.....	55
3.2.2.1	Parâmetros da validação.....	55
3.2.3	Estabilidade dos analitos em metanol.....	57
3.2.4	Montagem dos cartuchos para extração em fase sólida.....	58
3.2.5	Estudo preliminar de extração.....	58

3.2.5.1	Variáveis.....	59
3.2.5.2	Níveis.....	59
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
4.1	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	60
4.1.1	Fase móvel.....	60
4.1.2	Coluna analítica.....	62
4.1.3	Comprimentos de onda para detecção.....	63
4.1.4	Demais condições cromatográficas.....	64
4.2	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	65
4.2.1	Parâmetros da validação.....	65
4.2.1.1	Adequação do sistema.....	65
4.2.1.2	Seletividade.....	66
4.2.1.3	Limites inferiores de quantificação.....	67
4.2.1.4	Linearidade.....	67
4.2.1.5	Precisão e exatidão.....	72
4.2.1.6	Robustez.....	73
4.3	ESTABILIDADE DOS ANALITOS EM METANOL.....	75
4.4	ESTUDO PRELIMINAR DE EXTRAÇÃO.....	75
4.4.1	Condições fixas.....	75
4.4.1.1	Solvente para ativação da fase sólida e para condicionamento dos cartuchos.....	75
4.4.1.2	Concentrações das amostras e volume de amostra.....	75
4.4.1.3	Acidificação das amostras.....	76
4.4.1.4	Volume de solvente para lavagem da fase sólida e para eluição dos analitos.....	76
4.4.1.5	Vazão da etapa de ativação e de lavagem da fase sólida, de condicionamento dos cartuchos e de eluição dos analitos.....	76
4.4.2	Planejamento fatorial.....	77
4.4.2.1	Tipo do planejamento.....	77
4.4.3	Análise dos dados experimentais.....	78
4.4.3.1	Seleção do PI para o método bioanalítico.....	78
4.4.3.2	Determinação das variáveis significativas.....	79

5	CONCLUSÃO.....	81
CAPÍTULO 3 - DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE LOSARTANA E VALSARTANA EM PLASMA HUMANO		
1	INTRODUÇÃO.....	83
2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	83
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	83
3.1	MATERIAL.....	83
3.1.1	Reagentes, solventes, consumíveis e equipamentos.....	83
3.1.2	Insumos farmacêuticos ativos e substâncias químicas de referência...	84
3.2	MÉTODOS.....	84
3.2.1	Obtenção das amostras de plasma.....	84
3.2.1.1	Coleta das amostras de sangue.....	84
3.2.1.2	Centrifugação das amostras de sangue.....	84
3.2.2	Otimização do método cromatográfico.....	85
3.2.2.1	Procedimento.....	85
3.2.2.2	Obtenção dos extratos.....	85
3.2.3	Estudo de extração.....	86
3.2.3.1	Variáveis e níveis.....	87
3.2.4	Validação do método bioanalítico.....	87
3.2.4.1	Padronização interna.....	88
3.2.4.2	Fortificação do plasma.....	88
3.2.4.3	Preparo de amostras.....	88
3.2.4.4	Parâmetros da validação bioanalítica.....	89
3.2.4.5	Estabilidade dos analitos na matriz biológica.....	92
3.2.5	Aplicação do método bioanalítico.....	93
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	94
4.1	FORTIFICAÇÃO DO PLASMA.....	94
4.2	ACIDIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	94
4.3	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	95
4.4	ESTUDO DE EXTRAÇÃO.....	95
4.4.1	Ajuste das condições fixas.....	95

4.4.2	Análise dos dados experimentais.....	96
4.5	VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO.....	99
4.5.1	Padronização interna.....	99
4.5.2	Parâmetros da validação bioanalítica.....	100
4.5.2.1	Seletividade.....	100
4.5.2.2	Limites inferiores de quantificação.....	102
4.5.2.3	Curvas de calibração.....	102
4.5.2.4	Precisão e exatidão.....	105
4.5.2.5	Efeito residual.....	107
4.5.2.6	Recuperação.....	108
4.5.2.7	Efeito matriz.....	109
4.5.3	Estabilidade dos analitos na matriz biológica.....	110
4.6	APLICAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO.....	112
5	CONCLUSÃO.....	114
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....		115
REFERÊNCIAS.....		116

1. INTRODUÇÃO GERAL

As áreas que apresentam interesse na análise de fármacos em matrizes biológicas são muitas, por exemplo, farmacêutica, ambiental, medicina legal e veterinária, entre outras (QUEIROZ *et al.*, 2001). Nesse cenário, os fluídos biológicos, tais como soro, plasma, sangue, líquor e urina, são as principais amostras analisadas. Independentemente da matriz, para a análise quantitativa de analitos, é necessária a validação de métodos bioanalíticos que possuam, principalmente, seletividade e níveis de quantificação adequados. Todavia, para alcançar esse objetivo, algumas barreiras devem ser vencidas, como a complexidade química dessas amostras (JARDIM, 2010).

Geralmente, os fluídos biológicos contêm concentrações de proteínas e macromoléculas incompatíveis com os instrumentos de separação. Além disso, a presença de ácidos, bases e várias substâncias orgânicas e inorgânicas, pode interferir na análise de fármacos; encontrados, em sua maioria, em baixas concentrações. Devido aos efeitos danosos ao sistema cromatográfico e aos critérios analíticos, essas amostras devem ser pré-tratadas antes da etapa de separação. De maneira geral, as técnicas de preparo de amostras possibilitam a redução dos interferentes matriciais, a pré-concentração dos compostos de interesse e/ou a solubilização dos compostos extraídos em solvente compatível (NIU *et al.*, 2018).

A precipitação de proteínas, extração líquido-líquido (LLE- *Liquid-liquid Extraction*) e extração em fase sólida (SPE - *Solid Phase Extraction*) têm sido as técnicas de preparo de amostras convencionais. A técnica de SPE é mais seletiva, quando comparada às demais; resultando em amostras mais “limpas”, isso é, com menos compostos interferentes provenientes da matriz. Quando comparada apenas com a LLE, a SPE é mais rápida e gera menores volumes de resíduos orgânicos. A miniaturização da SPE foi o primeiro estágio de aprimoramento da técnica. No entanto, devido à diversidade de dispositivos miniaturizados, em conjunto com a escassez de fases extratoras não baseadas em sílica, os esforços começaram a ser direcionados para a síntese e caracterização de novos sorventes, com o objetivo de obter materiais mais seletivos e/ou com maior estabilidade química (KATAOKA *et al.*, 2016).

Diversos nanomateriais vêm sendo estudados como sorventes não seletivos para a aplicação em bioanálises. Todavia, segundo KATAOKA *et al.* (2016), o desenvolvimento de materiais multifuncionais, biocompatíveis e/ou com elevada área superficial, caracteriza uma

direção promissora para o aprimoramento da SPE e das suas miniaturizações. Os nanotubos de nitreto de boro, também conhecidos como BNNTs (*Boron Nitride Nanotubes*), possuem essas e outras características atraentes para uma variedade de aplicações biomédicas e médicas. No momento, diversos grupos vêm estudando os BNNTs em dispositivos terapêuticos e de diagnóstico (CIOFANI, 2010). Todavia, nenhum trabalho explorou a aplicação desse nanomaterial como sorvente para a extração de fármacos de amostras biológicas. A hipótese deste trabalho é que os BNNTs funcionalizados com grupos octadecila (C18) são eficazes como sorvente em SPE.

2. OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo geral determinar losartana e valsartana em plasma humano, empregando SPE à base de BNNTs funcionalizados com grupos C18 e cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada a detector fluorimétrico (CLAE-FLU). Para facilitar a compreensão do leitor, as etapas experimentais, conduzidas para atingir esse objetivo principal, foram divididas em capítulos. Cada capítulo contém seus respectivos objetivos específicos.

3. ORGANIZAÇÃO GERAL

Esta dissertação foi organizada em três capítulos. No primeiro capítulo, são descritos os métodos utilizados para a obtenção dos BNNTs funcionalizados com grupos C18. Também são apresentadas as características químicas e morfológicas desse nanomaterial, que foi produzido pelo Laboratório de Materiais Nanoestruturados para Bioaplicações (LMNB) do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN). No segundo capítulo, são apresentados a confecção do dispositivo de SPE e um estudo preliminar de extração, conduzido em soluções aquosas para determinar as variáveis experimentais capazes de afetar, de maneira significativa, a recuperação dos antagonistas dos receptores da angiotensina II (ARAs II) pelo nanosorvente, bem como selecionar o padrão interno (PI) para o método bioanalítico. Por fim, no terceiro capítulo, é apresentada a otimização do método de extração e a validação do método bioanalítico para determinar a losartana e valsartana em plasma humano.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

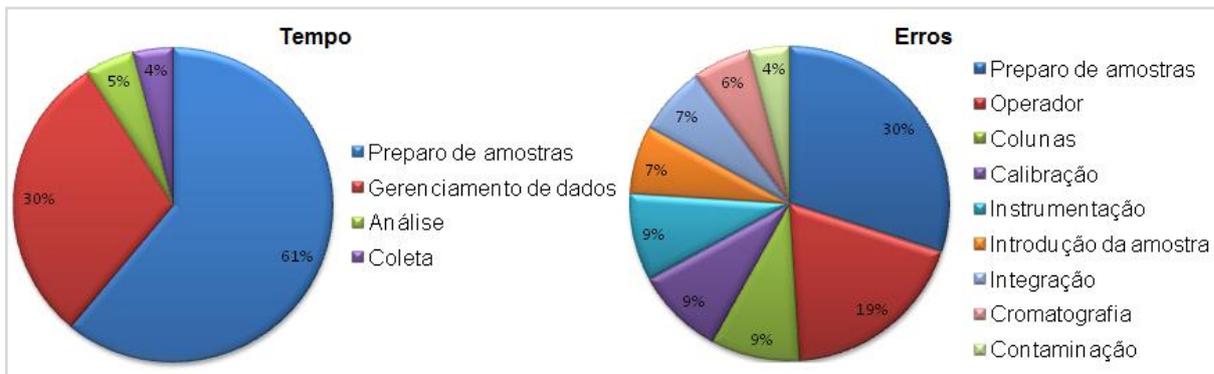
Esta revisão bibliográfica aborda a importância do pré-tratamento de fluídos biológicos; a técnica de SPE, bem como seu primeiro estágio de aprimoramento, no que diz respeito aos dispositivos miniaturizados aplicados na literatura e disponíveis no mercado; e a razão da necessidade de desenvolvimento de novos sorventes.

4.1. PREPARO DE AMOSTRAS

Como mencionado na introdução, a análise de fármacos em fluídos biológicos é, geralmente, uma tarefa desafiadora, devido aos diversos interferentes presentes nessas matrizes. A coexistência de compostos endógenos e exógenos, além da alta concentração de proteínas, impede a injeção direta dessas amostras em instrumentos de separação; visto que a presença dos compostos matriciais pode incapacitar a quantificação dos analitos e acarretar danos ao sistema cromatográfico. Nesses casos, a utilização isolada de técnicas para *clean-up* no preparo de amostras, como a precipitação de proteínas, pode permitir a permanência demasiada de moléculas interferentes; o que, frequentemente, compromete a seletividade do método e, conseqüentemente, afeta a precisão e a exatidão em baixas concentrações dos analitos. Logo, para promover uma análise segura e adequada à finalidade proposta, faz-se necessária a realização de uma etapa eficiente de pré-tratamento de amostras, para posterior etapa analítica (JARDIM, 2010).

Os principais objetivos do preparo de amostras são (i) remover interferentes da matriz, para que a mesma possa ser analisada ou submetida a uma etapa subsequente (*clean-up*); (ii) promover a extração dos compostos de interesse da matriz e, muitas vezes, garantir suas pré-concentrações, com o mínimo de interferentes possível (isolamento) e/ou (iii) derivatizar o analito para possibilitar sua detecção (derivatização *in situ*). A escolha de técnicas para o preparo de amostras deve ser feita com cautela, uma vez que essa etapa consome cerca de 60 a 80% do tempo total de análise, e é responsável por, aproximadamente, 30% dos erros analíticos (**Figura 1**) (YANG *et al.*, 2013). O requisito geral, é que a técnica ou técnicas selecionadas, sejam simples, seletivas e rápidas, pois além de viabilizar o emprego do método de extração na rotina, o menor manuseio da amostra reduz o risco de erros analíticos (JARDIM, 2010).

Figura 1 – Proporções de consumo de tempo e de erros analíticos na análise de compostos em amostras complexas por CLAE.



Fonte: YANG *et al.* (2013).

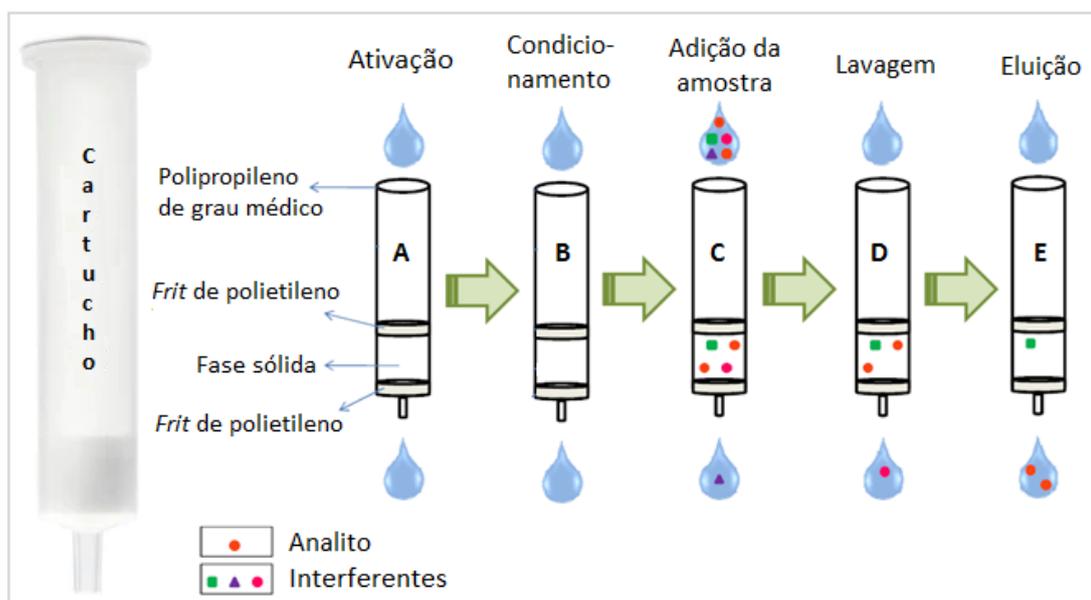
4.1.1. Técnicas convencionais

As técnicas convencionais de preparo de amostras são baseadas em extrações do tipo líquido-sólido, sólido-líquido ou líquido-líquido; por exemplo, a SPE, extração Soxhlet e LLE, respectivamente. A SPE, na sua forma mais comum, emprega cartuchos nas formas de barril ou seringa, parcialmente preenchidos com fases sólidas particuladas ou monolíticas (**Figura 2**). Em comparação com a LLE, a SPE é capaz de fornecer uma extração mais completa dos compostos de interesse; remover, majoritariamente, os interferentes provenientes da matriz; reduzir o consumo de solventes orgânicos; e reduzir o volume e a manipulação das amostras (JARDIM, 2010; MACEDO, 2012).

Usualmente, o procedimento de SPE em sistemas de fase reversa contém cinco etapas primordiais – ativação, condicionamento, introdução da amostra, lavagem e eluição (**Figura 2**). As particularidades de cada uma dessas etapas, segundo RAYNIE e WATSON (2014) e FERREIRA (2016), são brevemente descritas a seguir.

- a) A ativação do sorvente por meio da passagem de solventes orgânicos miscíveis em água pelos cartuchos é imprescindível para permitir a penetração de solventes aquosos na fase sólida. Em cartuchos com fases sólidas quimicamente ligadas a grupos orgânicos, essa conduta também é importante para ordenar as cadeias da fase ligada, aumentando a superfície disponível para a interação com os compostos de interesse.

- b) A função da etapa de condicionamento é, basicamente, cobrir a fase sólida com uma camada de solvente similar ao das amostras. O potencial hidrogeniônico (pH) é o principal parâmetro considerado nessa etapa. Diferenças de pH entre o ambiente do sorvente e as amostras, faz com que os compostos de interesse presentes nas porções inicial e final das amostras, sejam submetidos à ambientes de extração distintos, o que pode afetar as características da retenção.
- c) Uma das particularidades da SPE é que o sorvente pode ser escolhido para reter seletivamente os compostos de interesse e, conseqüentemente, eliminar a maior parte dos interferentes juntamente com o fluxo das amostras ou vice-versa. Em ambos os casos, a velocidade de passagem das amostras pelos cartuchos é o principal fator influenciador na retenção. Por conseqüência, recomenda-se o emprego de baixas vazões nessa etapa ($< 2 \text{ mL/min}$).
- d) A lavagem da fase sólida tem como objetivo a remoção de compostos interferentes menos hidrofóbicos, em comparação com os compostos de interesse. À vista disso, o solvente utilizado nessa etapa deve conter uma força de eluição maior que o solvente das amostras, porém menor que o solvente utilizado na etapa de eluição. Geralmente, opta-se por misturas com alta proporção de solvente aquoso e baixa proporção de solvente orgânico.
- e) Independentemente do método de extração, a eluição dos compostos de interesse é a última etapa da SPE. Logo, o solvente dessa etapa deve ser capaz de promover a interrupção das interações retentivas dos compostos de interesse com o material sorvente. Todavia, a força de eluição desse solvente deve ser adequada, de modo a impedir a eluição excessiva de interferentes fortemente retidos pela fase sólida. No final do processo extrativo, a condução de uma etapa de limpeza do sorvente possibilita a reutilização do dispositivo.

Figura 2 – Representação esquemática das principais etapas da SPE.

Fonte: adaptado de MACEDO (2012).

4.1.2. Configurações modernas

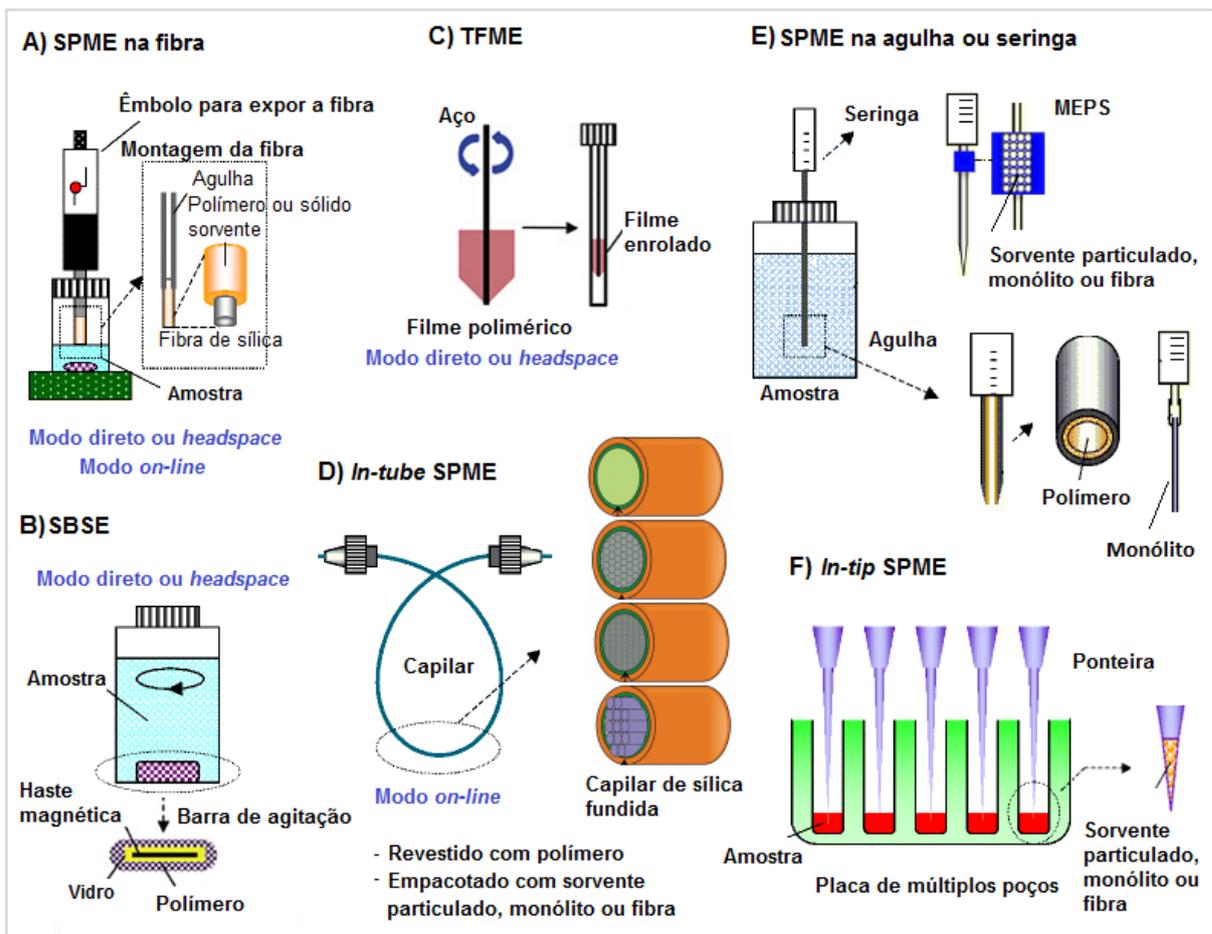
Apesar de serem amplamente utilizadas em análises de rotina, algumas técnicas convencionais de preparo de amostras requerem grandes volumes de solventes orgânicos. Considerando os princípios da química verde, o desenvolvimento de dispositivos modernos, capazes de reduzir a geração desses resíduos e/ou a manipulação das amostras, por meio da miniaturização do sistema, simplificação de etapas do processo extrativo e/ou da automação das análises, foi o primeiro estágio de aprimoramento da SPE (JARDIM, 2010).

A microextração em fase sólida (SPME) ou SPME na fibra foi a primeira configuração miniaturizada desenvolvida. Nela, uma fibra de sílica fundida, recoberta por uma fina camada de polímero ou sólido sorvente, é usada no modo direto ou *headspace*, para a extração por equilíbrio de partição de compostos solúveis ou voláteis e semivoláteis, respectivamente (**Figura 3A**). A principal vantagem dessa configuração é a introdução direta dos compostos de interesse recém-extraídos em interface do sistema cromatográfico, sem a necessidade do uso de solventes orgânicos para dessorção (*modo on-line*) (TOFFOLI e LANÇAS, 2015).

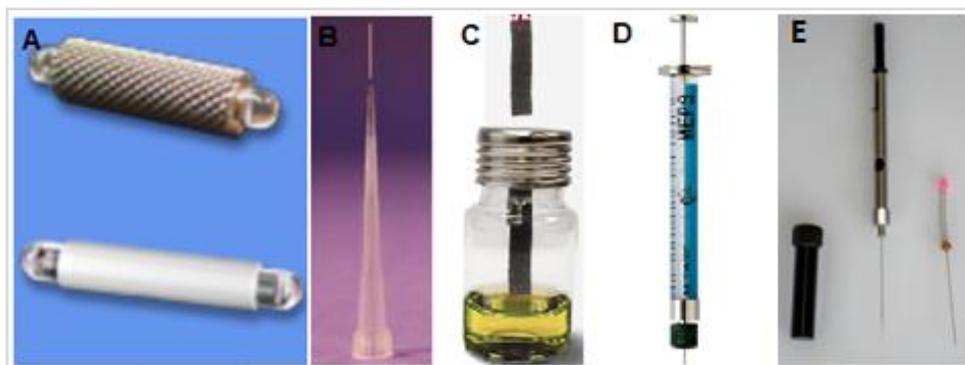
Além da SPME na fibra, existem outras configurações miniaturizadas disponíveis, entretanto, nem todas comercialmente. Dentre essas configurações, destacam-se a extração sortiva em barra de agitação (SBSE - *Stir Bar Sorptive Extraction*); microextração em filme

fino (TFME - *Thin-film Microextraction*); microextração em fase sólida no tubo, também conhecida como *In-tube* SPME; SPME na agulha (não disponível comercialmente); microextração em fase sólida na seringa (MEPS - *Microextraction in Packed Syringe*) e microextração em fase sólida na ponteira, também conhecida como *In-tip* SPME (**Figuras 3B a 3F**). Mesmo sendo fruto do aprimoramento da SPE, as configurações miniaturizadas podem apresentar desvantagens, quando comparadas com a SPE em cartuchos. Por exemplo, em razão da impossibilidade de realizar extrações paralelas, a MEPS pode demandar maior quantidade de tempo e manuseio do analista. Alguns dispositivos comerciais miniaturizados são apresentados na **Figura 4**.

Figura 3 – Ilustração das principais configurações miniaturizadas.



Fonte: adaptado de KATAOKA (2010) e SONG *et al.* (2017).

Figura 4 – Exemplos de dispositivos comerciais miniaturizados.

(A) SBSE da marca Gerstel de polidimetilsiloxano (PDMS) ou PDMS / etilenoglicol; (B) *in-tip* SPME da marca Sigma-Aldrich de PDMS / divinilbenzeno (DVB) ou sílica ligada a grupos C18; (C) TFME da marca Gerstel de PDMS / DVB ou PDMS / carboxeno (CAR); (D) MEPS da marca SGE Analytical Science de sílica ou sílica ligada a grupos etila, octila ou C18; (E) SPME na fibra da marca Sigma-Aldrich de PDMS, PDMS / DVB, PDMS / CAR, PDMS / DVB / CAR, poliacrilato, polietilenoglicol ou sílica ligada a grupos C18.

4.2. SORVENTES EMPREGADOS EM EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

A maioria dos sorventes disponíveis comercialmente baseia-se em sílica não funcionalizada ou quimicamente ligada a grupos orgânicos, como C18, octila, aminopropila, cianopropila, bifenila, fenila, cicloexila, entre outros. Devido à boa estabilidade mecânica, variedade de tamanho de partículas e facilidade de modificações químicas da superfície, a sílica tem sido o material preferido para o preparo de fases sólidas. Entretanto, suas limitações, como a instabilidade química sob valores de pH inferiores a 2 ou superiores a 8, e a presença de grupos silanóis residuais entre as moléculas da fase ligada, impulsionou a utilização de outros sorventes. Dentre esses sorventes incluem as fases poliméricas, como o poliestireno divinilbenzeno, que se destaca pela elevada área superficial e boa estabilidade química em ampla faixa de pH (1 - 14); e as fases sólidas de carbono grafitizado, como as folhas gráficas, que são altamente homogêneas e possuem capacidade de atuar em sistemas de fase reversa, alcançando retenções superiores às obtidas com a fase C18 (JARDIM, 2010).

Devido à disponibilidade de diversos dispositivos microextratores, em contraste com a escassez de fases sólidas não baseadas em sílica, os esforços começaram a ser direcionados para outras áreas, por exemplo, para a síntese e caracterização de novos sorventes (MACIEL, 2017). Diversos nanomateriais com diferentes composições e morfologias vêm sendo estudados como nanosorventes em dispositivos de SPE para o preparo de amostras biológicas.

Como nanosorventes não seletivos têm-se, por exemplo, os nanomateriais à base de polímeros orgânicos e/ou inorgânicos, as nanopartículas, e os nanomateriais carbonáceos e de silício (**Figura 5**). Como nanosorventes seletivos têm-se os imunossorventes e os nanomateriais à base de polímeros molecularmente impressos (MIPs - *Molecularly Imprinted polymers*). A seletividade dos imunossorventes é atribuída à capacidade de promover interações específicas do tipo analito-anticorpo. Os MIPs, por sua vez, contêm sítios de reconhecimento sintéticos, com seletividade pré-estabelecida, para um ou mais compostos de interesse (AHMADI *et al.*, 2017; JARDIM, 2010). Segundo KATAOKA *et al.* (2016), almejam-se materiais multifuncionais, biomiméticos, biocompatíveis e/ou com elevada área superficial para o aprimoramento da SPE e das suas miniaturizações (**Figura 6**).

Figura 5 – Nanomateriais utilizados como nanosorventes não seletivos em dispositivos de SPE para o preparo de amostras biológicas.

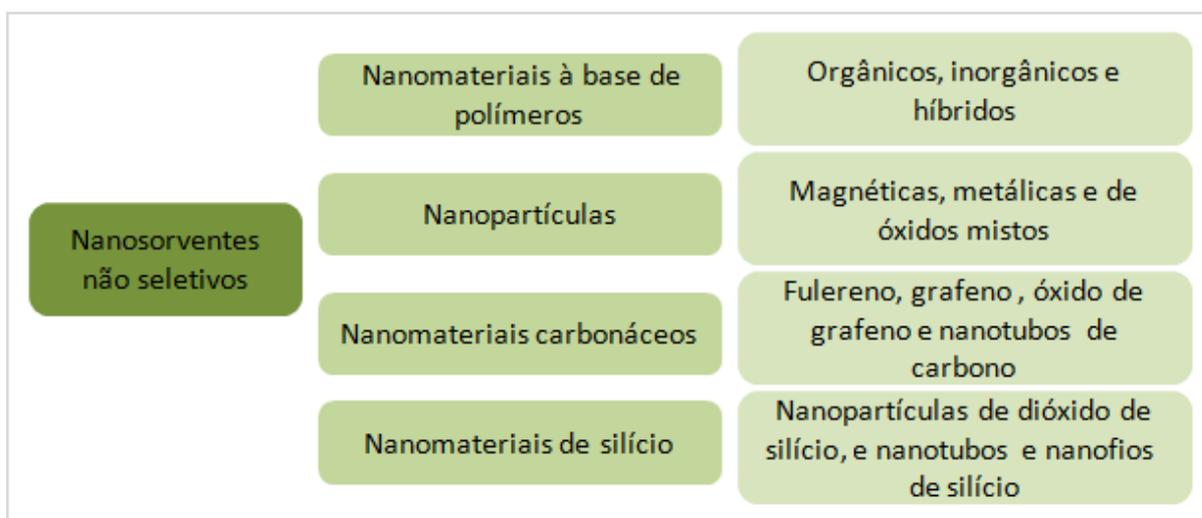
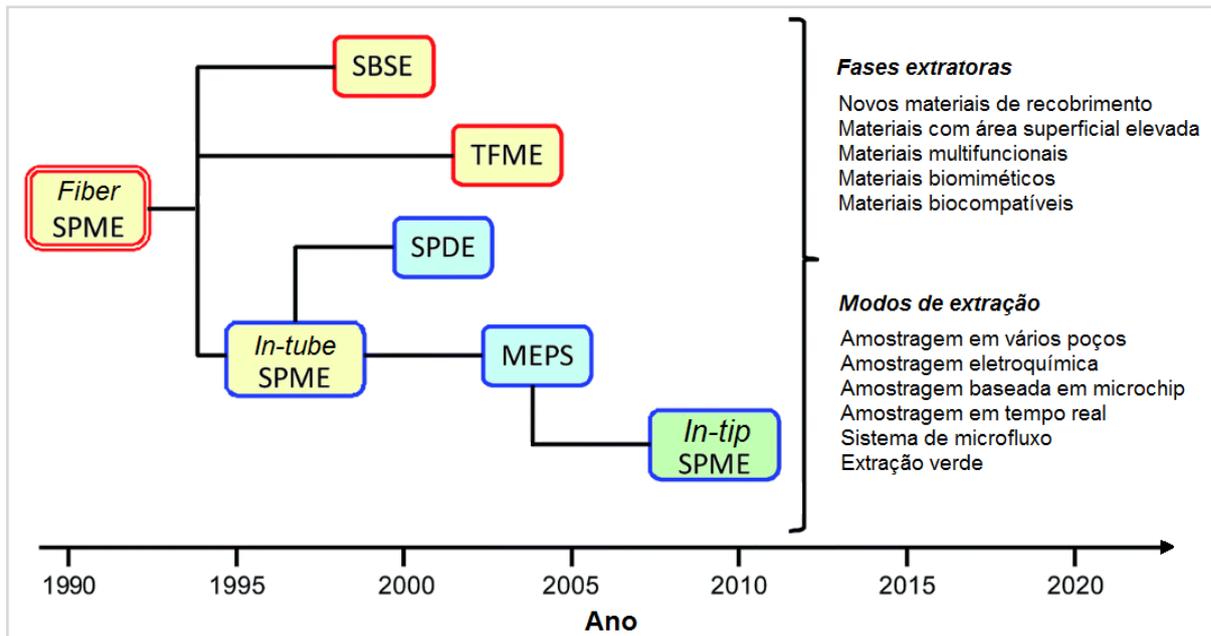


Figura 6 – Tendências para o aprimoramento da SPE e das suas miniaturizações.

Em que: SPDE é *Solid Phase Dynamic Microextraction* ou SPME na agulha.

Fonte: adaptado de KATAOKA *et al.* (2016).

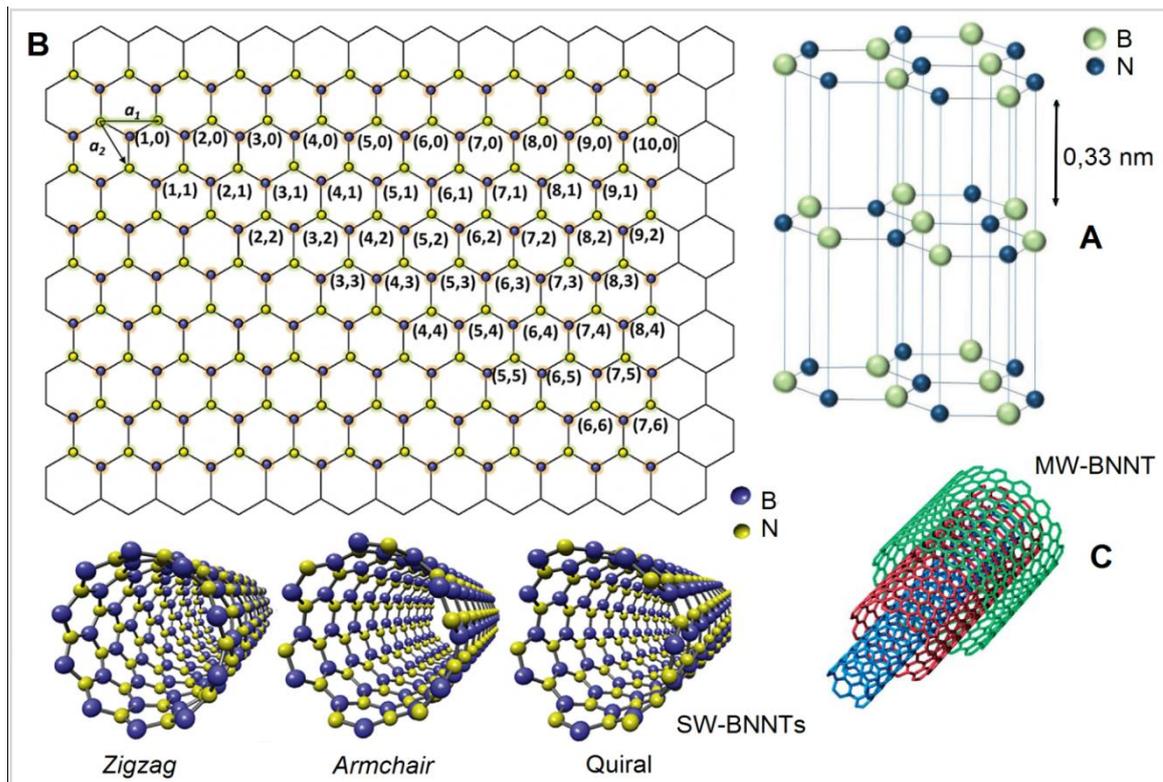
4.3. NANOESTRUTURAS DE NITRETO DE BORO

O nitreto de boro (BN - *Boron Nitride*) é um composto químico binário, formado por átomos de boro e nitrogênio intercalados, ligados entre si por fortes ligações covalentes. Como o boro pertence à família 3A da tabela periódica e o nitrogênio à família 5A, o BN contém diferentes estruturas cristalinas, com ligações do tipo sp^2 ou sp^3 . O BN hexagonal (h-BN) é o polimorfo mais estável (**Figura 7A**). Esse polimorfo contém estrutura cristalina disposta em camadas, similar à do grafite. Nela, as nanofolhas de h-BN, também denominadas BNNS (*Boron Nitride Nanosheets*), mantêm-se unidas por interações do tipo Van der Waals.

Segundo BHANDARI *et al.* (2016), os BNNTs podem ser didaticamente definidos como rolos cilíndricos constituídos de uma ou mais BNNS empilhadas. Os BNNTs de parede simples são designados SW-BNNTs (*Single-Walled Boron Nitride Nanotubes*), enquanto que os BNNTs de múltiplas paredes são designados MW-BNNTs (*Multi-walled Boron Nitride Nanotubes*) (**Figuras 7B e 7C**). Em vista das diversas combinações geométricas que os átomos de boro e nitrogênio podem assumir nos SW-BNNTs, a simetria dessa nanoestrutura, geralmente, é classificada de acordo com o ângulo de rolamento. Nanotubos com ângulo de

rolamento igual a 0° ou 30° , não possuem quiralidade, enquanto que nanotubos com ângulo de rolamento entre 0° e 30° , possuem simetria quiral (**Figura 7B**).

Figura 7 – Ilustração do h-BN (A), ângulos de rolamento dos SW-BNNTs (B) e organização estrutural dos MW-BNNTs (C).



Fonte: adaptado de BHANDARI *et al.* (2016) e IZYUMSKAYA *et al.* (2017).

Diversas técnicas podem ser empregadas para a síntese de BNNTs, por exemplo, ablação por laser, moinho de bolas, deposição química a partir de fase vapor (CVD - *Chemical Vapour Deposition*), descarga em arco elétrico, entre outras (FERREIRA, 2010). A CVD é uma das técnicas mais utilizadas para a produção de nanotubos de carbono e, recentemente, foi adotada para a síntese de nanoestruturas de h-BN. Segundo KIM *et al.* (2018), essa técnica oferece uma melhor controlabilidade dos parâmetros relacionados ao crescimento dos BNNTs, tornando possível a obtenção de nanoestruturas de alta qualidade.

A primeira tentativa de sintetizar BNNTs por CVD foi conduzida por LOURIE *et al.* (2000), empregando diversos tipos de catalisadores e borazina, formada *in situ*, como precursor (KIM *et al.*, 2018). A partir daí, a CVD foi classificada em diversas categorias, com

base no tipo de precursor e catalisador empregados (AHMADI *et al.*, 2015). Com o intuito de produzir BNNTs em larga escala (gramas), TANG *et al.* (2002) desenvolveram a CVD com oxidação do boro (BOCVD - *Boron oxide Chemical Vapor Deposition*). Nesse método, reagiu-se boro amorfo com óxido de magnésio, sob altas temperaturas e atmosfera redutora, para formar moléculas gasosas de dióxido de boro, capazes de reagir com um fluxo de gás amônia, possibilitando o crescimento dos BNNTs. No entanto, essa síntese inicial acarretou a obtenção de nanoestruturas com defeitos estruturais. Mais tarde, observou-se que a adição de óxido de ferro II na mistura reacional proposta por TANG *et al.* (2002) possibilita a obtenção de BNNTs com qualidade comparável àqueles obtidos em sínteses de pequena escala (KIM *et al.*, 2018).

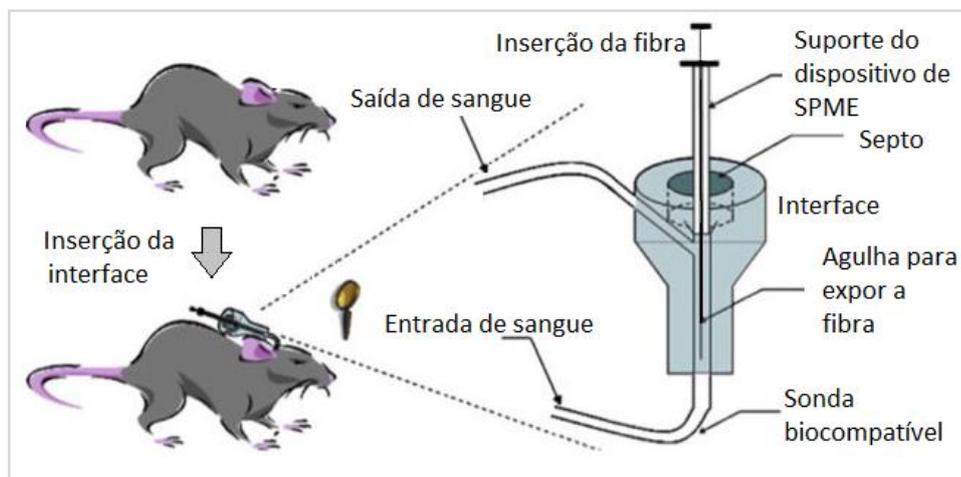
Desde a descoberta dos BNNTs em 1990, várias abordagens de modificação química de superfície foram desenvolvidas. Em relação às modificações do tipo covalente, tanto os átomos de boro, quanto os átomos de nitrogênio são locais suscetíveis a reações de ativação e/ou ligação de modificadores diversos (GAO *et al.*, 2016). Historicamente, o primeiro experimento de funcionalização covalente dos BNNTs foi conduzido por ZHI *et al.* (2005). Nesse estudo, os BNNTs foram reagidos em sistema de refluxo com cloreto de estearoil, sob presença de solvente orgânico e temperatura de 100 °C, por 120 horas. Pouco tempo depois, ZHI *et al.* (2009), descobriram que o tratamento dos BNNTs em autoclave com dióxido de hidrogênio, sob temperatura de 120 °C, é capaz de introduzir grupo hidroxila nos átomos de boro. Mais tarde, CIOFANI *et al.* (2012) oxidaram os átomos de boro dos BNNTs, empregando ácidos oxidantes fortes, como o ácido nítrico. Os grupos B-OH formados nessas duas últimas reações, consideradas como reações de ativação, permitiram a ligação covalente de diversas moléculas polares e apolares na superfície dos BNNTs.

Os BNNTs possuem características atraentes para uma variedade de aplicações (dureza, boa estabilidade química, suscetibilidade à funcionalização, entre outras). Atualmente, devido à notável biocompatibilidade e elevada área superficial ($> 100 \text{ m}^2/\text{g}$), os BNNTs vêm sendo estudados como nanomateriais para a utilização em dispositivos terapêuticos e de diagnóstico (CIOFANI, 2010). Pode-se citar, por exemplo, o uso dos BNNTs como nanovetores para a liberação direcionada e controlada de fármacos (FERREIRA *et al.*, 2011). No que diz respeito ao emprego dos BNNTs em dispositivos de SPE, nenhum artigo com foco na análise de compostos em amostras biológicas foi encontrado na literatura. Até o momento, somente FU *et al.* (2014) empregaram os BNNTs como nanosorvente, em um dispositivo miniaturizado, para a extração de hidrocarbonetos

aromáticos policíclicos em amostras de água. Nesse cenário, o emprego de BNNTs funcionalizados com grupos C18 como nanosorvente, caracteriza uma inovação na área de preparo de amostras.

O estudo de nanosorventes biocompatíveis e termoestáveis, como os BNNTs, pode contribuir para o aprimoramento de configurações consideradas inovadoras, como a SPME *in vivo*. Nas análises *in vivo*, a amostragem depende do contato direto entre o sorvente e o tecido vivo, a fim de extrair os compostos de interesse, sem a remoção de volumes representativos de bioflúido. Portanto, os dispositivos de microextração devem ser biocompatíveis e esterilizáveis, de preferência por autoclavagem, de modo a prevenir a ocorrência de efeitos adversos e/ou tóxicos no organismo; como a coagulação do sangue e a ativação da resposta imune (**Figura 8**). Configurações como essa são importantes para a aplicação em estudos de farmacocinética, bioacumulação, metabolômica, toxicologia ambiental, entre outros (KATAOKA, 2011).

Figura 8 – Ilustração de um dispositivo de SPME *in vivo* para animais de pequeno porte.



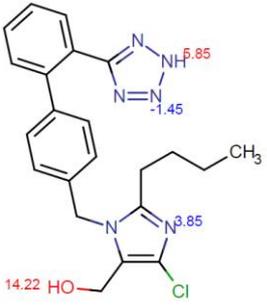
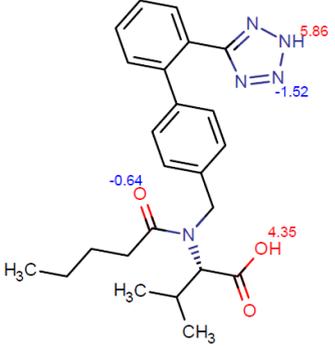
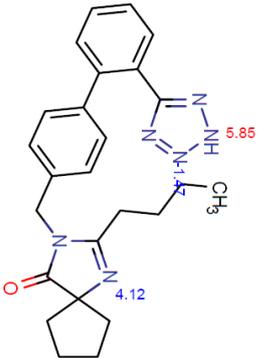
Fonte: KATAOKA (2011).

4.4. ANTAGONISTAS DOS RECEPTORES DA ANGIOTENSINA II

Os ARAs II são anti-hipertensivos capazes de antagonizar a ação da angiotensina II na neuro-hipófise, vasos sanguíneos, supra-renais e rins, por meio do bloqueio competitivo e específico dos receptores AT1 (RAMOS e CASALI, 2012). Apesar de recente, essa classe contém seis fármacos e dois pró-fármacos; seis deles são comercializados no Brasil: losartana

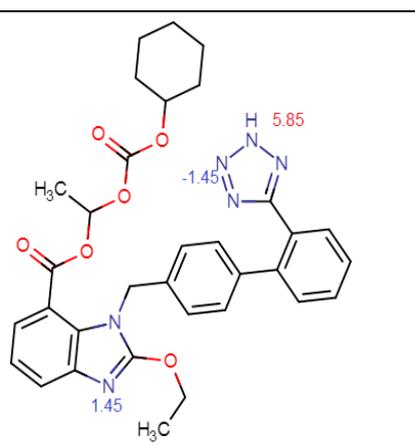
(LOS), valsartana (VAL), irbesartana (IRB), candesartana cilexetila (CAN CIL), olmesartana medoxomila e telmisartana. As principais propriedades físico-químicas dos ARAs II utilizados neste estudo são apresentadas no **Quadro 1**.

Quadro 1 – Principais propriedades físico-químicas dos ARAs II utilizados neste estudo.

ARA II	Estrutura química	Massa molar (g/mol)	pKa ^a	Log P ^b	Solubilidade
LOS		422,91	3,85 5,85	5,00	Solúvel em água e metanol (MeOH)
VAL		435,52	4,35 5,86	5,27	Levemente solúvel em água e solúvel em MeOH
IRB		428.54	4,12 5,85	5,39	Praticamente insolúvel em água e levemente solúvel em MeOH

Continua

Continuação

CAN CIL*		610,67	1,45 5,85	6,10	Praticamente insolúvel em água e fracamente solúvel em MeOH
-------------	---	--------	--------------	------	---

Final

* Pró-fármaco.

^a Coeficiente de ionização. ^b Coeficiente de partição.

Fonte: CHEMICALIZE (2019).

4.5. MÉTODOS BIOANALÍTICOS RECENTES PARA A DETERMINAÇÃO DOS FÁRMACOS EM PLASMA HUMANO

No **Quadro 2** são expostos os métodos bioanalíticos, publicados na literatura, para a determinação de ARAs II em plasma humano, desde o ano de 2017. Pode-se observar que a precipitação de proteínas tem sido empregada com frequência no preparo de amostras. Todavia, os trabalhos que empregaram essa técnica, quantificaram simultaneamente vários fármacos anti-hipertensivos, o que facilita a condução de análises de rotina e justifica a seleção da técnica. Foi possível observar também o emprego de um material alternativo à sílica, em um dispositivo comercial de SBSE – o polímero poliacrilato. Como a maioria dos sorventes comerciais é baseada em sílica, nenhum trabalho empregou esse tipo de fase sólida. ESFANDIARNEJAD *et al.* (2019) estudaram um novo material para SPE – a polianilina imobilizada em fibras poliméricas de policaprolactama em escala nanométrica. Como esperado, a coluna analítica com fase ligada C18 e o detector ultravioleta foram os mais usados; em razão, respectivamente, da popularidade, e do baixo custo e ampla aplicabilidade. Todavia, também foram usadas coluna analítica com grupos ciano e detectores mais seletivos, como o fluorimétrico e espectrômetro de massas. ESFANDIARNEJAD *et al.* (2019) e NAGEL *et al.* (2017) obtiveram os melhores limites inferiores de quantificação (LIQs). O primeiro devido ao enriquecimento dos analitos no preparo de amostras, e o segundo devido à maior sensibilidade do espectrômetro de massas.

Quadro 2 – Métodos bioanalíticos, publicados nos últimos cinco anos, para a determinação de ARAs II em plasma humano.

Autores	Analito	PI	Preparo de amostras	Sorvente	Separação	Deteção	LIQ (ng/mL)
SOUZA <i>et al.</i> , 2020	LOS VAL IRB Outros	CAN CIL	<p><u>Precipitação de proteínas</u></p> <p>Precipitante: ACN (1:2 v/v)^a Volume de plasma: 400 µL Centrifugação: 480 x g, por 10 min, a 4 °C</p>	Não se aplica	<p><u>CLAE</u></p> <p>Coluna: ciano (250 x 4,6 mm; 5 µm) FM: ácido fosfórico 0,1% (v/v) e ACN Eluição: gradiente Vazão: 1,2 mL/min Volume de injeção: 80 µL Temperatura: 35 °C</p>	FLU (ex. 260 nm e 370 nm) (em. 410 nm)	35
			<p><u>Evaporação do sobrenadante e reconstituição</u></p> <p>Evaporação: a 45 °C, sob corrente de ar comprimido seco Reconstituição: 200 µL de mistura de ACN e água (20:80 v/v)</p>		25		
ESFANDIAR-NEJAD <i>et al.</i> , 2019	LOS VAL IRB	Não informado	<p><u>Precipitação de proteínas</u></p> <p>Precipitante: MeOH (1:2 v/v)^a Volume de plasma: 1 mL Centrifugação: 6000 rpm, por 7 min</p>	Polianilina imobilizada em nanofibras de policaprolactama	<p><u>CLAE</u></p> <p>Coluna: C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm) FM: tampão acetato 0,02 M pH 4, e mistura de ACN e MeOH (50:50 v/v) Eluição: gradiente Vazão: 0,5 mL/min Volume de injeção: não informado Temperatura: não informada</p>	Ultravioleta (250 nm)	5
			<p><u>Diluição do sobrenadante e SPE</u></p> <p>Diluição: 1 mL de sobrenadante e 4 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7 Extração: SPE eletroquímica com dessorção <i>off-line</i> (300 µL de ACN)</p>		10		

Continua

Continuação

BABARAHIMI <i>et al.</i> , 2018	LOS VAL	Diazepam	<u>SBSE</u>		Polímero monolítico de acrilato	<u>CLAE</u>		Ultravioleta (220 nm)	24 91
			Volume de amostra: 5 mL de plasma diluído com tampão acetato 10 mM pH 2 (1:4 v/v) Agitação: 1000 rpm Força iônica: 25% (p/v) de cloreto de sódio Temperatura: 70 °C Tempo de extração: 120 min Dessorção: <i>off-line</i> com MeOH, sob sonicação, a 50 °C, por 10 min	Coluna: C18 (100 x 4,6 mm; 5 µm) FM: tampão acetato 10 mM pH 3,8 e ACN Eluição: gradiente Vazão: 1 mL/min Volume de injeção: 20 µL Temperatura: 35 °C					
NAGEL <i>et al.</i> , 2017	LOS VAL Outros	Enalapril	<u>Precipitação de proteínas</u>		Não se aplica	<u>CLUE</u>		Espectrômetro de massas seqüencial	4,0 6,0
			Precipitante: mistura de ACN e MeOH, 1:1 v/v (1:4 v/v) ^a Volume de plasma: 50 µL Centrifugação: 16 000 x g, por 5 min <u>Diluição do sobrenadante</u> Diluição: 150 µL do sobrenadante e 450 µL de mistura de ácido fórmico 0,1% (v/v) e MeOH (5:95 v/v)	Coluna: C18 (100 x 2,1 mm; 1,7 µm) FM: ácido fórmico 0,1% (v/v) e MeOH Eluição: gradiente Vazão: 0,5 mL/min Temperatura: 70 °C					

Final

Em que: ACN = Acetonitrila, FM = Fase móvel, CLUE = Cromatografia a líquido de ultra eficiência.

^aProporção plasma:precipitante.

CAPÍTULO 1

**OBTENÇÃO DOS NANOTUBOS DE NITRETO DE BORO FUNCIONALIZADOS COM
GRUPOS OCTADECILA**

1. INTRODUÇÃO

Os BNNTs utilizados neste estudo foram sintetizados, funcionalizados e caracterizados pelo Dr. Wellington Marcos da Silva do LMNB do CDTN da UFMG, coordenado pela Prof^a. Dra. Edésia Martins Barros de Sousa. Logo, este estudo é fruto da parceria entre o LMNB, que desenvolve materiais nanoestruturados e investiga suas potencialidades de aplicação em diferentes ramos da biotecnologia, e o LCQ, que desempenha atividades nas áreas de desenvolvimento, validação e aplicação de métodos diversos para a análise de medicamentos e cosméticos. Para expor as características do nanomaterial cedido pelo LMNB ao LCQ, os métodos empregados em cada etapa para a obtenção dos BNNTs e os resultados de caracterização obtidos são apresentados neste capítulo.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar os BNNTs por BOCVD.
- Purificar e oxidar os BNNTs recém-sintetizados com uma mistura de ácidos fortes.
- Funcionalizar os BNNTs recém-oxidados com octadecilamina (ODA), via reação química conduzida em reator de micro-ondas.
- Avaliar a organização estrutural dos BNNTs e comprovar as modificações químicas da superfície dessa nanoestrutura por meio de técnicas de caracterização.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Reagentes, solventes e consumíveis

Todos os reagentes e solventes, grau para análises (P.A), foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, EUA). A água ultrapura foi obtida de um sistema Milli-Q. As tiras de papel indicador de pH foram adquiridas da Merck (Darmstadt, Hesse, Alemanha). Membranas filtrantes de politetrafluoretileno, com diâmetro de 47 mm e poros de 0,22 μm , adquiridas da Merck, foram utilizadas para filtrar as amostras.

3.1.2. Equipamentos

Balança analítica da marca Shimadzu, modelo AUW220D; forno tubular horizontal da marca Lindberg Blue, modelo SRT55433; agitador magnético com aquecimento da marca Solab, modelo SL 91; bomba de vácuo da marca Vacuubrand, modelo ME 1C; sistema de ultrapurificação de água da marca Millipore Milli-Q, modelo Direct-Q 3 UV; estufa da marca DeLeo, modelo A4AF; reator de micro-ondas da marca CEM, modelo Discover; aparelho de ultrassom da marca Elma, modelo Elmasonic S; microscópio eletrônico de transmissão da marca FEI Tecnai, modelo G2 F20 Super-Twin (Centro de Microscopia, UFMG); difratômetro de raios X da marca Rigaku, modelo D-MAX 2000 Ultima Plus; espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier da marca Thermo Fisher Scientific, modelo Nicolet 6700; analisador de potencial zeta da marca Malvern Instruments, modelo Zetasizer Nano ZS e analisador termogravimétrico da marca Shimadzu, modelo TGA-50WS.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Síntese, purificação e oxidação dos nanotubos de nitreto de boro

3.2.1.1. Síntese

Para sintetizar os BNNTs, misturou-se boro amorfo, óxido de magnésio e hematita, com relação estequiométrica previamente estabelecida (1:1:1), até completa homogeneização. A mistura obtida foi colocada em um cadinho de alumina, que foi levado à região central de um forno tubular horizontal. Sob fluxo de gás nitrogênio, o sistema foi aquecido a uma taxa de 10 °C/min até 1300 °C. Após atingir essa temperatura, o fluxo de gás nitrogênio foi interrompido e um fluxo de gás amônia foi inserido por duas horas. Sob o restabelecimento do fluxo de gás nitrogênio, o sistema foi resfriado a uma taxa de 10 °C/min até a temperatura ambiente. A amostra não purificada de BNNTs foi denominada BNNT-NP.

3.2.1.2. Purificação e oxidação

Para remover as impurezas presentes na superfície dos BNNTs e promover, concomitantemente, a oxidação dessa nanoestrutura, transferiu-se uma porção da amostra BNNT-NP para um balão contendo ácido sulfúrico e ácido nítrico concentrados (proporção 3:1). A mistura reacional foi mantida sob refluxo e agitação, à temperatura de 80 °C, por três

horas. A amostra de BNNTs purificados e oxidados (BNNT-P) foi filtrada a vácuo, lavada com água ultrapura até pH 5,5 - 6,0 e seca em estufa.

3.2.2. Funcionalização dos nanotubos de nitreto de boro

Uma porção da amostra BNNT-P foi funcionalizada com ODA via reação química conduzida em reator de micro-ondas. O reator operou com agitação de 50%, rampa de aquecimento de 20 minutos (até 120 °C), potência de 120 Watts e tempo de reação de 30 minutos. A amostra de BNNTs funcionalizados com grupos C18 (BNNT-C18) foi resfriada, dispersa em etanol absoluto, filtrada a vácuo e seca em estufa.

3.2.3. Caracterização dos nanotubos de nitreto de boro

As amostras foram caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET), difração de raios X (DRX), espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR - *Fourier-transform Infrared Spectroscopy*), análise de potencial zeta e análise termogravimétrica (TGA - *Thermogravimetric Analysis*).

3.2.3.1. Microscopia eletrônica de transmissão

A MET foi utilizada para identificar os tipos de nanoestruturas presentes no nanomaterial e avaliar as características morfológicas dos BNNTs. Para isso, a amostra BNNT-P foi dispersa em acetona, em banho ultrassônico, por 30 minutos. Uma gota da suspensão obtida foi colocada sobre uma grade de cobre com 200 mesh, revestida com filme de carbono (*Holey Carbon*). As análises foram conduzidas no Centro de Microscopia da UFMG.

3.2.3.2. Difração de raios X

Para comprovar a fase cristalina hexagonal das nanoestruturas, a amostra BNNT-P foi analisada por DRX, empregando valores de ângulo de Bragg de 20° a 80° e taxa de varredura de 0,02°/min.

3.2.3.3. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier

A FTIR foi utilizada para identificar as ligações químicas dos BNNTs e os grupos funcionais dos ligantes incorporados à superfície dessa nanoestrutura. Todas as amostras foram analisadas no modo de reflectância total atenuada, empregando 64 varreduras no intervalo de 4000 cm^{-1} a 500 cm^{-1} e resolução espectral de 4 cm^{-1} .

3.2.3.4. Potencial Zeta

A medida do potencial zeta das amostras BNNT-NP e BNNT-P foi realizada para avaliar as possíveis mudanças de carga na superfície das nanoestruturas. As amostras foram dispersas em solução aquosa com pH 6, na concentração de $0,1\text{ mg/mL}$, utilizando ultrassom por 30 min, e, em seguida, analisadas.

3.2.3.5. Análise termogravimétrica

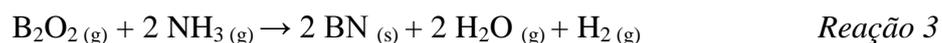
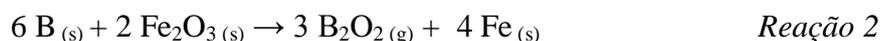
Para avaliar a estabilidade térmica dos BNNTs e a decomposição térmica dos ligantes, aproximadamente, 4 mg de cada amostra foram analisados por TGA. Durante as análises, empregaram-se razão de aquecimento de 10 °C/min e fluxo de ar de 10 mL/min . As determinações das percentagens de massa foram realizadas na faixa de temperatura de 25 °C a 800 °C .

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. SÍNTESE DOS NANOTUBOS DE NITRETO DE BORO

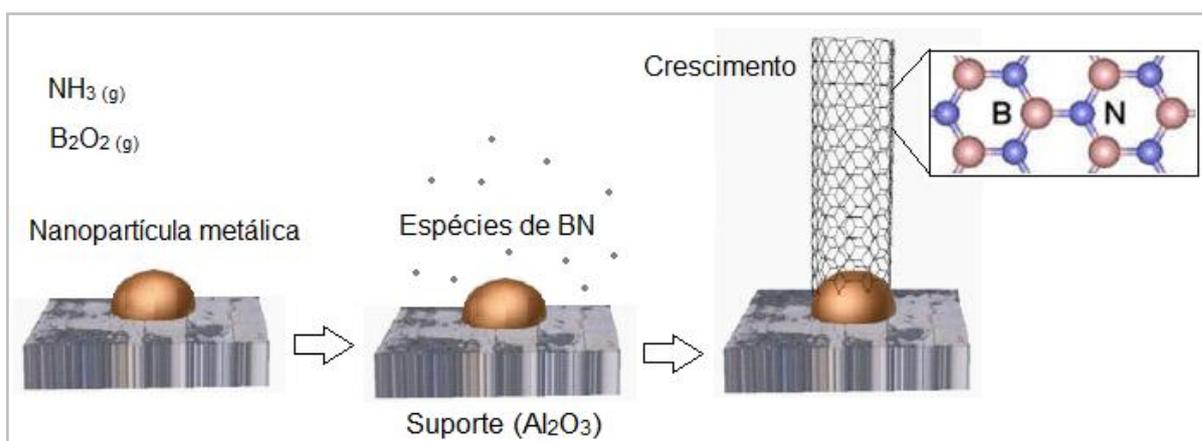
É notório que a síntese de BNNTs por BOCVD, freqüentemente, requer o uso de catalisadores (KIM *et al.*, 2018). Neste estudo, o óxido de magnésio e o óxido de ferro III foram usados como catalisadores. Logo, durante o aquecimento da mistura reacional, sob atmosfera redutora, dá-se a redução desses óxidos metálicos, formando nanopartículas condensadas de magnésio e ferro (**Reações 1 e 2**). Essas reações de oxirredução também são responsáveis pela formação de dióxido de boro gasoso, que durante a etapa isotérmica reage com o gás amônia, possibilitando a formação das nanoestruturas de h-BN (**Reação 3**). Nesse

contexto, o boro amorfo e o gás amônia são os precursores da síntese (FERREIRA, 2010; SANTOS, 2017).



Devido à diversidade de técnicas e condições de síntese, têm sido propostos múltiplos mecanismos de formação dos BNNTs. No mecanismo de crescimento vapor-líquido-sólido, por exemplo, a reação entre o dióxido de boro e a amônia produz espécies gasosas de BN, capazes de difundir-se para regiões em torno das nanopartículas condensadas (**Figura 9**). A absorção dessas espécies na superfície das nanopartículas, seguida da dissolução na fase líquida do metal, acarreta um processo de supersaturação. Durante o resfriamento do sistema, há a segregação das espécies recém-dissolvidas para a superfície das nanopartículas, formando sítios que permitem a incorporação adicional de espécies gasosas de BN. Esse fenômeno ocasiona o crescimento dos BNNTs (AHMAD *et al.*, 2015).

Figura 9 – Representação esquemática do mecanismo de formação dos BNNTs.

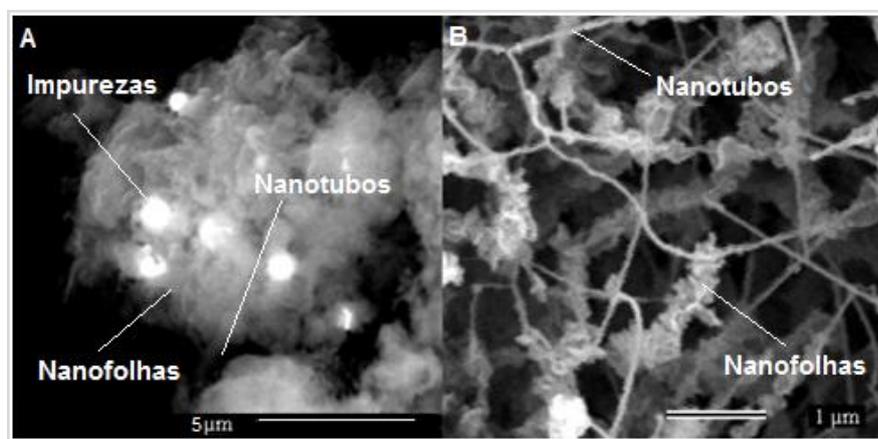


Fonte: adaptado de COVILLE *et al.* (2011).

4.2. PURIFICAÇÃO, OXIDAÇÃO E FUNCIONALIZAÇÃO DOS NANOTUBOS DE NITRETO DE BORO

Assim como os nanotubos de carbono, os BNNTs contêm determinadas impurezas em sua superfície, por exemplo, óxidos de boro e nanopartículas metálicas. Dependendo da aplicação, como nos estudos com hipertermia magnética, a presença de nanopartículas metálicas é importante para o desempenho dos BNNTs. Todavia, em outros casos, como nos estudos de sorção de micromoléculas, a remoção dessas impurezas é essencial para explorar as propriedades físico-químicas do nanomaterial (FERREIRA *et al.*, 2011). Nesse contexto, o tratamento dos BNNTs com mistura de ácido sulfúrico e ácido nítrico é capaz de remover as impurezas, geralmente, espalhadas ou na forma de pequenos aglomerados sobre a superfície das nanoestruturas (**Figura 10**). Pode-se observar que a presença de BNNTs e BNNS é uma característica do nanomaterial.

Figura 10 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura de BNNTs não purificados (A) e purificados com tratamento ácido (B).



Fonte: FERREIRA *et al.* (2011).

Além de remover as impurezas dos BNNTs, o tratamento ácido também promove a oxidação das nanoestruturas (SILVA *et al.*, 2018a). Como as ligações B-N contêm ionicidade, os átomos de boro são reativos à nucleófilos, enquanto que os átomos de nitrogênio são suscetíveis à eletrófilos. Segundo PORTO *et al.* (2018), a mistura de ácido sulfúrico e ácido nítrico envolve diversas reações de equilíbrio (**Reações 4 a 6**). Entretanto, dentre as espécies formadas *in situ*, o íon nitrônio é o principal agente oxidante, responsável pela transferência de oxigênio para os átomos de boro (**Figura 11A**). Na etapa de funcionalização, as hidroxilas

presentes na superfície dos BNNTs e BNNS, são substituídas por moléculas do agente modificador (**Figura 11B**). Até o momento, não foram encontrados na literatura mecanismos para essas reações. Todavia, as modificações químicas da superfície foram comprovadas por técnicas de caracterização (RIBEIRO e VILELA, 2018; SILVA *et al.*, 2018a).

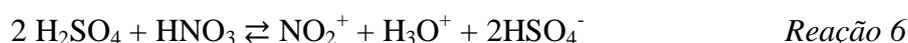
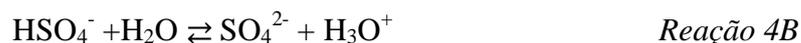
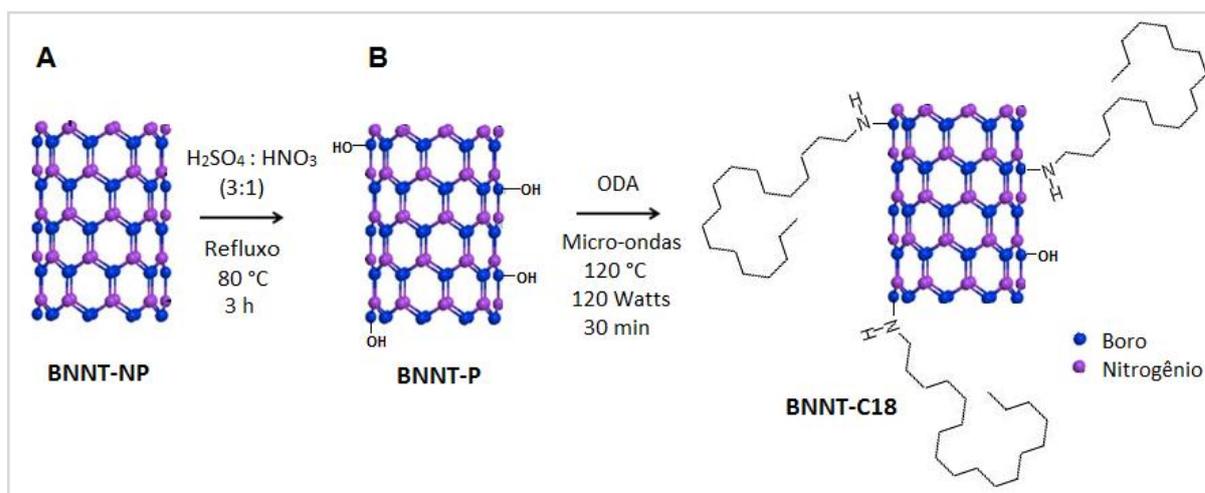


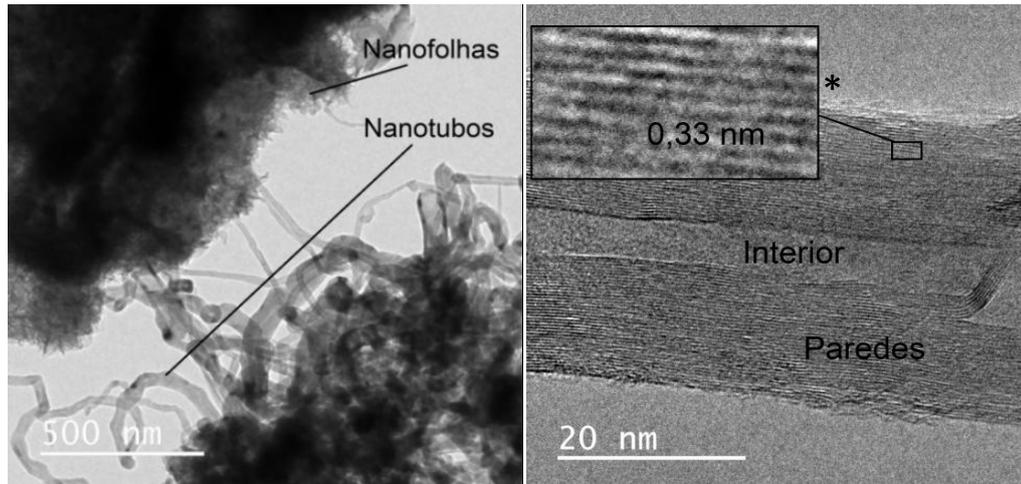
Figura 11 – Oxidação dos BNNTs com mistura de ácido sulfúrico e ácido nítrico (A) e funcionalização dos BNNTs com ODA (B).



4.3. CARACTERIZAÇÃO DOS NANOTUBOS DE NITRETO DE BORO

4.3.1. Microscopia eletrônica de transmissão

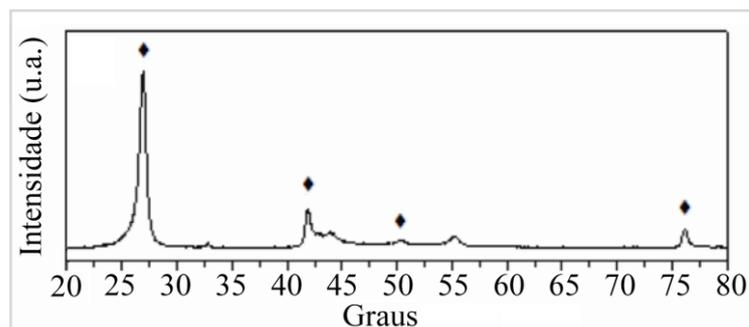
A MET comprovou que o nanomaterial sintetizado é formado, tipicamente, por BNNTs e nanofolhas de BN (**Figura 12**). Como o esperado, os BNNTs apresentaram-se sob forma de tubos com múltiplas paredes, contorcidos ou não, com diâmetro e comprimento variáveis. O espaçamento entre as paredes foi de, aproximadamente, 0,33 nm (SILVA *et al.*, 2018b).

Figura 12 – Imagens de MET da amostra BNNT-P.

* Ampliação.

4.3.2. Difração de raios X

A fase cristalina hexagonal das nanoestruturas foi comprovada pela análise da amostra BNNT-P por DRX (**Figura 13**). Segundo FERREIRA *et al.* (2011), os picos com valores de ângulo de Bragg de $26,75^\circ$; $41,58^\circ$; $50,16^\circ$ e $75,86^\circ$ são típicos do h-BN.

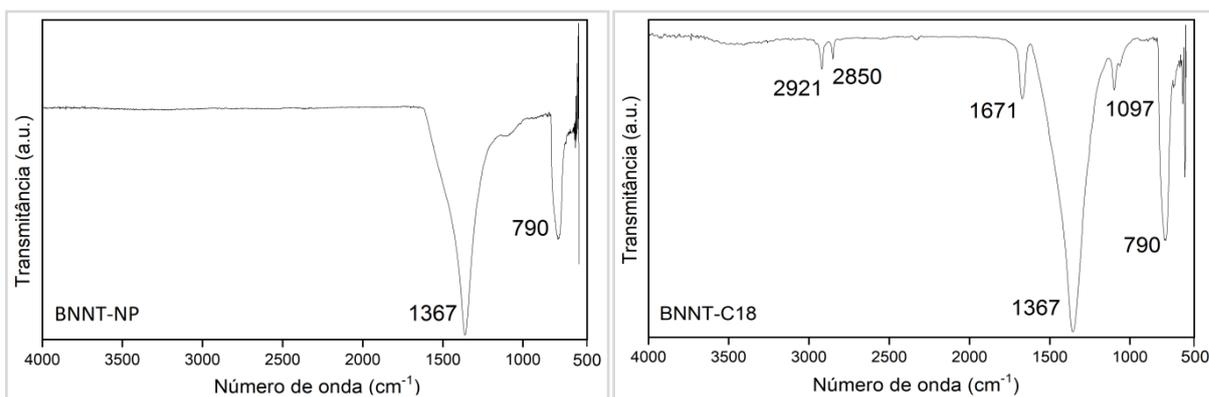
Figura 13 – Espectro de DRX da amostra BNNT-P.

4.3.3. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier e potencial zeta

Pode-se observar na **Figura 14** que os espectros de FTIR exibiram as bandas características das ligações químicas dos BNNTs. As bandas de absorção em 1367 cm^{-1} e 790

cm^{-1} são atribuídas, respectivamente, ao estiramento simétrico das ligações B=N no eixo longitudinal dos nanotubos e ao movimento radial dos átomos de boro e nitrogênio (LEE *et al.*, 2008).

Figura 14 – Espectros de FTIR das amostras BNNT-NP e BNNT-C18.



A FTIR comprovou a funcionalização com ODA dos BNNTs. No espectro da amostra BNNT-C18, as bandas em 2921 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento das ligações C-H dos grupos CH_2 e CH_3 , respectivamente. As bandas em 1671 cm^{-1} e 1097 cm^{-1} são atribuídas, respectivamente, à deformação angular das ligações N-H e ao estiramento das ligações C-N. O intervalo entre, aproximadamente, 3600 cm^{-1} e 3200 cm^{-1} , corresponde à região em que se observa a banda larga de estiramento das ligações N-H dos grupos amina secundária (FERREIRA *et al.*, 2013; PAVIA *et al.*, 2015). Devido ao limite de detecção da técnica, não se observou a banda fraca em, aproximadamente, 3500 cm^{-1} , atribuída ao estiramento das ligações BO-H, no espectro da amostra BNNT-P (FERREIRA *et al.*, 2014). Todavia, a confirmação da funcionalização dos BNNTs, em conjunto com a redução do valor de potencial zeta da amostra BNNT-P, em comparação com a amostra BNNT-NP, comprovou a oxidação das nanoestruturas (**Tabela 1**).

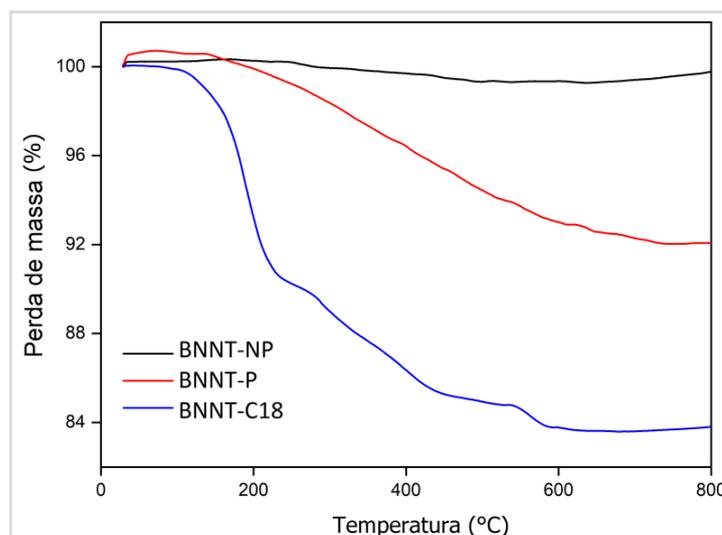
Tabela 1 – Média dos valores de potencial zeta das amostras BNNT-NP e BNNT-P.

Amostra	Média do potencial zeta (mV) (n = 3)
BNNT-NP	-19,77
BNNT-P	-25,67

4.3.4. Análise termogravimétrica

A TGA foi utilizada, principalmente, para avaliar o grau de oxidação e funcionalização do nanomaterial. A amostra BNNT-NP não apresentou perda de massa significativa, o que comprovou a estabilidade térmica das nanoestruturas (**Figura 15**). As amostras BNNT-P e BNNT- C18 tiveram uma perda de massa de, aproximadamente, 7% (entre 150 - 750 °C) e 16% (entre 100 - 600 °C), respectivamente. Segundo a literatura, essas percentagens de perda de massa são atribuídas à decomposição térmica dos ligantes orgânicos incorporados à superfície das nanoestruturas. Logo, elas são capazes de indicar o grau de oxidação e funcionalização das amostras modificadas (FERREIRA *et al.*, 2013 e FERREIRA *et al.*, 2014).

Figura 15 – Curvas termogravimétricas das amostras BNNT-NP, BNNT-P e BNNT-C18.



5. CONCLUSÃO

Por meio dos resultados de caracterização, concluiu-se que o nanomaterial obtido possui características químicas e morfológicas adequadas para o emprego em dispositivos de SPE. Os BNNTs e BNNS por si só são capazes de extrair micromoléculas de diversas amostras líquidas pelo mecanismo de adsorção. A capacidade de estabelecer interações do tipo π com os analitos, e a elevada área superficial, faz com que esses nanomateriais sejam potencialmente úteis, principalmente, para a extração de moléculas mais apolares. Além de possibilitar a inserção de diversos grupos modificadores na superfície das nanoestruturas, o

processo oxidativo aumenta a dispersibilidade do nanomaterial, reduzindo a formação de agregados e facilitando os processos sortivos. A funcionalização da superfície dos BNNTs e BNNS com grandes cadeias alquílicas pode aumentar a capacidade de retenção do nanosorvente, devido à inclusão do mecanismo de absorção dos compostos de interesse na fase ligada. Acredita-se que o impedimento estérico causado pelo grande volume da cadeia do modificador, impossibilite a funcionalização de todos os átomos de boro oxidados. É sabido que esse fenômeno também ocorre durante a funcionalização dos grupos silanóis presentes na superfície da sílica. Segundo SNYDER *et al.* (1997), apenas 30% dos silanóis da superfície da sílica, no máximo, são funcionalizados com grupos C18.

CAPÍTULO 2

**ESTUDO PRELIMINAR DE EXTRAÇÃO DOS ANTAGONISTAS DOS RECEPTORES
DA ANGIOTENSINA II**

1. INTRODUÇÃO

Antes de iniciar os experimentos em plasma humano, conduziu-se um estudo preliminar de extração dos ARAs II de soluções aquosas, com o objetivo de determinar as variáveis experimentais capazes de afetar, de maneira significativa, a extração da LOS, VAL, IRB e CAN CIL pelos BNNTs funcionalizados com grupos C18. Esse estudo de triagem de variáveis, e também de caráter exploratório, uma vez que permite obter informações básicas, porém desconhecidas, sobre o sistema de SPE em estudo, também permitiu selecionar o PI para o método bioanalítico.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método analítico para determinar simultaneamente os ARAs II no solvente dos extratos finais da SPE por CLAE-FLU.
- Validar o método analítico recém-desenvolvido, conforme o preconizado nos guias nacionais e internacionais de validação.
- Confeccionar cartuchos para SPE, utilizando os BNNTs funcionalizados com grupos C18 como nanosorvente.
- Realizar o estudo preliminar de extração, empregando um planejamento fatorial fracionário (PFF).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Insumos farmacêuticos ativos

A IRB usada neste estudo foi extraída de comprimidos comerciais, purificada e caracterizada pelo Dr. Mateus Araújo Castro e Souza do LCQ. Os métodos empregados e os resultados obtidos foram descritos em sua tese intitulada *Desenvolvimento de métodos cromatográficos para a determinação simultânea, em plasma humano, de fármacos usados no tratamento de doenças cardiovasculares*. Resumidamente, as análises de caracterização

comprovaram que a IRB foi obtida com alto grau de pureza (SOUZA, 2021). Os demais insumos farmacêuticos ativos foram adquiridos da Purifarma (losartana potássica – LOS K e VAL) e da Sun Chemical Trading (CAN CIL).

3.1.2. Reagentes, solventes e consumíveis

O ácido fórmico, ácido fosfórico e trietilamina, todos com grau P.A, foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O fosfato de potássio monobásico anidro grau P.A, MeOH grau CLAE e ACN grau CLAE, foram adquiridos da J. T. Baker (Xalostoc, Morelos, México). A água ultrapura foi obtida de um sistema Milli-Q. A coluna cromatográfica bifenila (100 x 4,6 mm; 2,6 μm), do tipo *core-shell*, foi adquirida da Phenomenex (Torrance, Califórnia, EUA). Membranas de ésteres de celulose, com diâmetro de 47 mm e poros de 0,45 μm , adquiridas da Merck, foram usadas para filtrar a FM. Filtros para seringa de fluoreto de polivinilideno, com diâmetro de 25 mm ou 13 mm, e poros de 0,45 μm , adquiridos da Agilent (Santa Clara, Califórnia, EUA), foram usados para filtrar as amostras e extratos.

3.1.3. Equipamentos

Balança analítica da marca Shimadzu, modelo AUY220; pipetas automáticas do tipo monocanal com volume variável da marca Mettler Toledo, modelo Rainin Classic; refrigerador da marca Solab, modelo SL-210/1100; ultrapurificador de água da marca Merck Millipore, modelo Milli-Q Direct-Q 3 UV; potenciômetro da marca Metrohm, modelo 827; bomba de vácuo da marca KNF, modelo N820.3; aparelho de ultrassom da marca Unique, modelo USC-1400; sistema de filtração a vácuo do tipo Manifold com 24 posições da marca Phenomenex (acoplado a uma bomba da marca Merck Millipore, modelo WP6211560); concentrador de amostras da marca Tecnal, modelo TE-0194 e cromatógrafo a líquido de alta eficiência da marca Waters, modelo 2695 (composto de bomba quaternária, injetor automático, forno para colunas e detector de fluorescência, modelo 2475).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Desenvolvimento do método analítico

Para o desenvolvimento do método analítico, consideraram-se as características físico-químicas dos ARAs II e os fundamentos básicos da teoria de separação por CLAE. Para a seleção do gradiente, injetou-se, reiteradamente, o “branco”; isso é, metanol; e uma solução metanólica com 400 ng/mL de LOS e 250 ng/mL de VAL, IRB e CAN CIL. As condições cromatográficas empregadas em métodos presentes na literatura foram devidamente ponderadas.

3.2.2. Validação do método analítico

O método analítico foi validado conforme o estabelecido na Resolução da Diretoria Colegiada n° 166, de 24 de julho de 2017, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e no Guia *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)* da *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*. Os softwares Microsoft Excel 2007 e Minitab 18 foram utilizados para analisar os dados dos parâmetros da validação analítica.

3.2.2.1. Parâmetros da validação

Adequação do sistema

A adequação do sistema cromatográfico foi avaliada por meio da injeção, em quintuplicata, de uma solução metanólica com 400 ng/mL de LOS e 250 ng/mL de VAL, IRB e CAN CIL. A média dos valores de número de pratos teóricos (N), fator de capacidade (k) e fator de cauda (T), e o desvio padrão relativo (DPR) das áreas sob os picos de cada analito, foram analisados. Os critérios de aceitação foram estabelecidos conforme as recomendações do Guia *Reviewer Guidance - Validation of Chromatographic Methods* da *Food and Drug Administration* (FDA, 1994).

Seletividade

A seletividade foi avaliada mediante a comparação dos cromatogramas do “branco”; isso é, do MeOH; com os cromatogramas de uma solução metanólica com 160 ng/mL de LOS e 110 ng/mL de VAL, IRB e CAN CIL. Os cromatogramas foram obtidos por meio da injeção, em duplicata, dessas amostras.

Limites inferiores de quantificação

Os LIQs foram estabelecidos por meio da análise dos resultados obtidos na determinação da linearidade e dos resultados de precisão e de exatidão do método. Logo, estabeleceram-se as menores concentrações dos analitos capazes de serem quantificadas com precisão e exatidão aceitáveis (ANVISA, 2017a). Assim como no método bioanalítico, obtiveram-se LIQs com razões sinal/ruído de, no mínimo, 5:1 (EMA, 2011; FDA, 2018).

Linearidade

As curvas analíticas foram obtidas por meio da análise de soluções metanólicas com concentrações decrescentes dos analitos. Dessa forma, foram preparadas três soluções dos ARAs II, provenientes da diluição de soluções estoque distintas, para cada nível de concentração (ANVISA, 2017a). As faixas de concentração testadas foram 400,0 - 2,5 ng/mL para a LOS e 250,0 - 2,5 ng/mL para a VAL, IRB e CAN CIL. As concentrações correspondentes aos LIQs e aos limites superiores de quantificação (LSQs) foram determinadas considerando os resultados de precisão e de exatidão do método. Após avaliar o DPR das áreas sob os picos de cada analito, em cada nível de concentração, verificou-se a homocedasticidade dos dados utilizando o teste de C de Cochran. Os dados recém-analisados foram submetidos à regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (MMQ), e os coeficientes de determinação (R^2) e de correlação (r) foram analisados. Os testes F e T (de Fisher-Snedecor e de Student) foram utilizados, respectivamente, para avaliar a significância das regressões e os interceptos com o eixo y. A análise dos resíduos foi conduzida para avaliar a adequabilidade dos modelos matemáticos (ANVISA, 2017b).

Precisão e exatidão

Para avaliar a repetibilidade e a exatidão foram analisadas três réplicas autênticas ¹ em três níveis de concentração dos ARAs II (baixo, médio e alto). A repetibilidade foi expressa como DPR das concentrações experimentais de cada analito, em cada nível de concentração, enquanto que a exatidão foi expressa como recuperação (**Equação 1**). A precisão intermediária foi avaliada de maneira idêntica à repetibilidade, porém as análises foram conduzidas em dia diferente, por analista diferente. Nesse caso, o DPR das concentrações experimentais foi calculado levando em consideração os dados obtidos para as seis réplicas (ANVISA, 2017a). Os critérios de aceitação foram estabelecidos conforme o Guia *Guidelines for Standard Method Performance Requirements* da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2016).

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{média das concentrações experimentais} \times 100}{\text{concentração teórica}}$$

Equação 1

Robustez

Na avaliação da robustez, uma solução metanólica com 400 ng/mL de LOS e 250 ng/mL de VAL, IRB e CAN CIL, foi injetada, em duplicata, sob as condições originais do método analítico e após a variação da temperatura dos fornos (± 2 °C), vazão da FM ($\pm 0,1$ mL/min) e pH da FM ($\pm 0,1$ unidade). Os parâmetros de adequação do sistema cromatográfico de cada par de injeções e o DPR das áreas sob os picos de cada analito foram avaliados (AOAC, 2016; FDA, 1994).

3.2.3. Estabilidade dos analitos em metanol

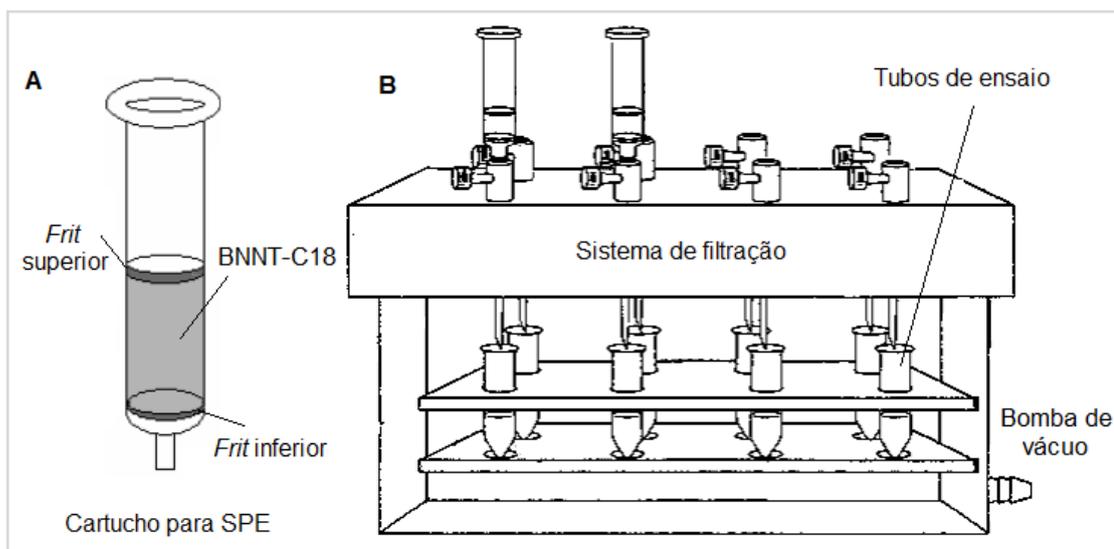
Uma solução estoque dos ARAs II em MeOH, com concentrações idênticas às maiores concentrações utilizadas na validação do método analítico, foi preparada em triplicata. As soluções foram diluídas, filtradas, transferidas para tubos do tipo *vial* e injetadas no cromatógrafo, após o preparo e após o armazenamento em refrigerador (2 - 8 °C), ao abrigo da luz, por 7 e 14 dias (ANVISA, 2012).

¹ Soluções metanólicas preparadas individualmente desde o início do procedimento de preparo.

3.2.4. Montagem dos cartuchos para extração em fase sólida

Para montar os cartuchos para SPE, utilizaram-se seringas de polipropileno de grau médico com capacidade de 1 mL e *frits* de polietileno com poros de 20 μm . Após o posicionamento dos *frits* inferiores no interior das seringas, adicionou-se o nanomaterial seco e posicionaram-se os *frits* superiores sem pressionar a fase sólida. A passagem de 1 mL de MeOH pelos cartuchos, permitiu a acomodação das partículas do nanosorvente e, conseqüentemente, o posicionamento adequado dos *frits* superiores. Para promover a passagem de amostras e solventes pelos cartuchos durante as análises, acoplaram-se os cartuchos à um sistema de filtração a vácuo do tipo Manifold (**Figura 16**).

Figura 16 - Ilustração dos cartuchos para SPE (A) e do sistema de filtração a vácuo do tipo Manifold (B).



Fonte: adaptado de ORLANDO *et al.* (2011).

3.2.5. Estudo preliminar de extração

O estudo preliminar de extração dos ARAs II de soluções aquosas foi conduzido empregando um modelo de PFF; selecionado após a determinação das condições fixas e a identificação das variáveis envolvidas no processo extrativo. Para analisar os dados experimentais, utilizou-se uma planilha automática desenvolvida pelo Laboratório de Quimiometria (LQTA) do Instituto de Química da Universidade Federal de Campinas

(UNICAMP, 2021). As variáveis consideradas estatisticamente significativas ou inertes foram determinadas pela estimativa dos efeitos dos fatores de primeira, segunda e terceira ordem.

3.2.5.1. Variáveis

Após a determinação das condições fixas, identificaram-se seis variáveis envolvidas no processo extrativo. Para não excluir variáveis importantes para a recuperação dos ARAs II, incluíram-se todas as variáveis no PFF (**Tabela 2**). Tendo em vista que as interações de ordem elevada podem ser desconsideradas, já que, normalmente, não são de interesse prático, por possuírem efeitos desprezíveis, selecionou-se o PFF 2^{6-2} resolução IV (2^{6-2}_{IV}). Nesse modelo de planejamento, os fatores de primeira ordem são confundidos apenas com os fatores de terceira ordem, enquanto que os fatores de segunda ordem são confundidos entre si (NETO *et al.*, 2001).

Tabela 2 – Variáveis do PFF 2^{6-2}_{IV} .

Variável		Nível	
Não codificada	Codificada	Inferior	Superior
Quantidade de nanosorvente nos cartuchos (mg)	X ₁	50	60
Volume de MeOH para ativação da fase sólida (mL)	X ₂	1	2
Volume de tampão para condicionamento dos cartuchos (µL)	X ₃	250	500
Vazão da etapa de introdução da amostra (mL/min) *	X ₄	0,8	1,0
Proporção de tampão de KH ₂ PO ₄ 10 mM pH 2 e de MeOH no solvente da etapa de lavagem	X ₅	100:0	85:15
Solvente para a eluição dos ARAs II	X ₆	MeOH	ACN

* Vácuo do sistema de filtração de 5,0 inHg e 7,5 inHg, respectivamente.

3.2.5.2. Níveis

Os níveis das variáveis X₁ e X₅ foram selecionados com base em trabalhos encontrados na literatura (FISCHNALLER *et al.*, 2016; JIA *et al.*, 2016). Os níveis das variáveis X₂ e X₃ foram selecionados visando a garantia da ativação da fase sólida e do

condicionamento dos cartuchos, sem comprometer a praticidade do método de extração. Duas vazões inferiores a 1,5 mL/min foram selecionadas para a variável X_4 . Segundo JIA *et al.* (2016), vazões entre 0,5 - 1,5 mL/min mostraram-se adequadas para a extração de bifenilos em cartuchos para SPE à base de BNNS. Para a variável X_6 , selecionaram-se o MeOH e a ACN. Com o objetivo de igualar a força dos extratos, evaporaram-se os extratos acetanólicos, sob temperatura de 45 ° C e corrente de ar comprimido seco, conforme SOUZA (2021), e reconstituíram-se os extratos com 2 mL de MeOH.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

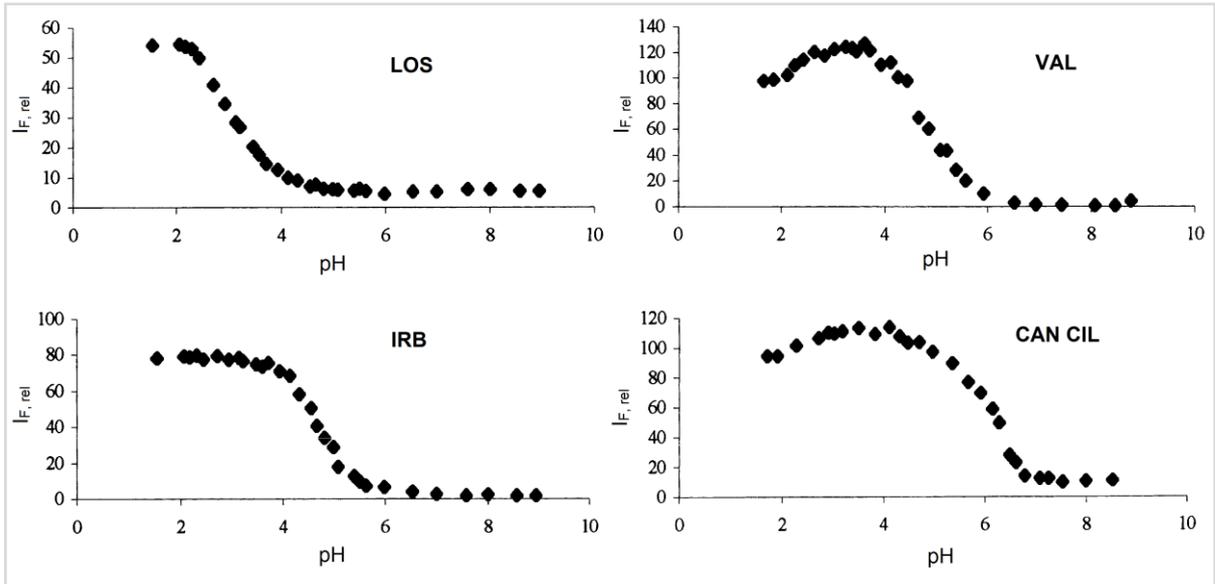
4.1. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO

4.1.1. Fase móvel

Com o objetivo de reduzir a formação de cauda nos picos, devido às interações dos ARAs II (analitos com grupos funcionais básicos) com os silanóis residuais da superfície da sílica, empregaram-se coluna capeada e FM contendo solução de trietilamina 0,1% (v/v) como solvente A. Como o grupo nitrila da ACN é capaz de formar complexos do tipo doador-aceptor de elétrons com a fase estacionária (FE) e/ou com os analitos, suprimindo as interações desse último com a FE, selecionou-se o MeOH como solvente orgânico (solvente B) (MALDANER *et al.*, 2010).

A seleção do pH da FM baseou-se nas propriedades físico-químicas dos compostos de interesse. De acordo com os gráficos de intensidade relativa de fluorescência e distribuição de espécies em função do pH (**Figuras 17 e 18**), a fluorescência nativa dos ARAs II é atribuída à protonação do grupo funcional imidazol e/ou tetrazol. Logo, a fluorescência desses compostos dá-se sob valores de pH inferiores a 6. Pode-se observar na **Figura 17** que a faixa de pH “ideal” para a detecção simultânea dos ARAs II está entre 2 e 4. Entretanto, estudos práticos revelaram que a VAL e a CAN CIL têm ligeiras variações de emissão de fluorescência em pH 2 e 3 (GONZÁLEZ *et al.*, 2002). Com o objetivo de melhorar a detecção da LOS e favorecer a formação de espécies ionizadas ou não ionizadas dos analitos na FM, sem reduzir a vida útil da coluna analítica, empregou-se um pH de 3,2 na FM. Para isso, a solução de trietilamina 0,1% (v/v) e o MeOH foram acidificados com ácido fórmico.

Figura 17 – Gráficos de intensidade relativa de fluorescência *versus* pH dos ARAs II.



Fonte: CAGIGAL *et al.* (2001).

Figura 18 – Diagramas de distribuição de espécies dos ARAs II (continua).

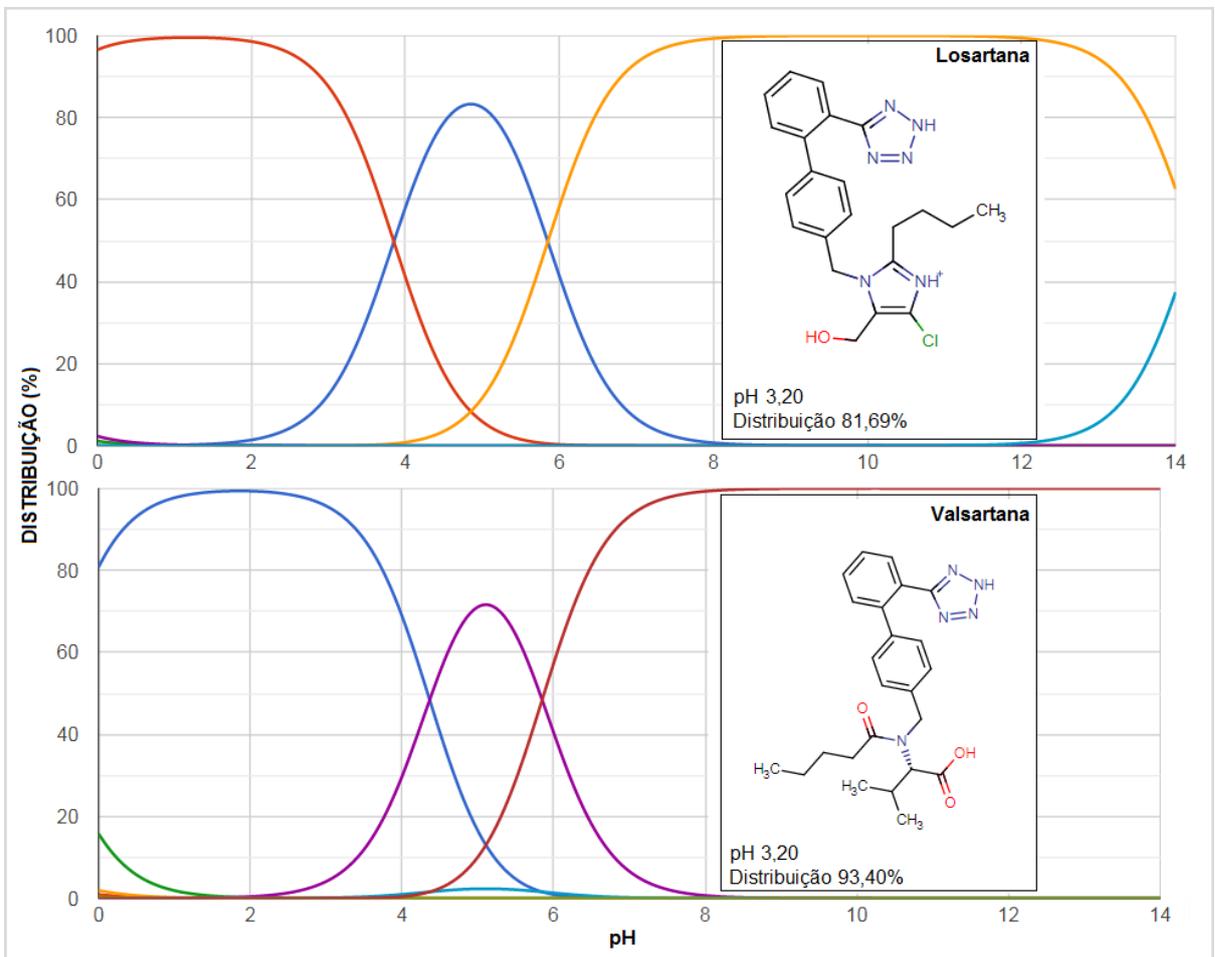
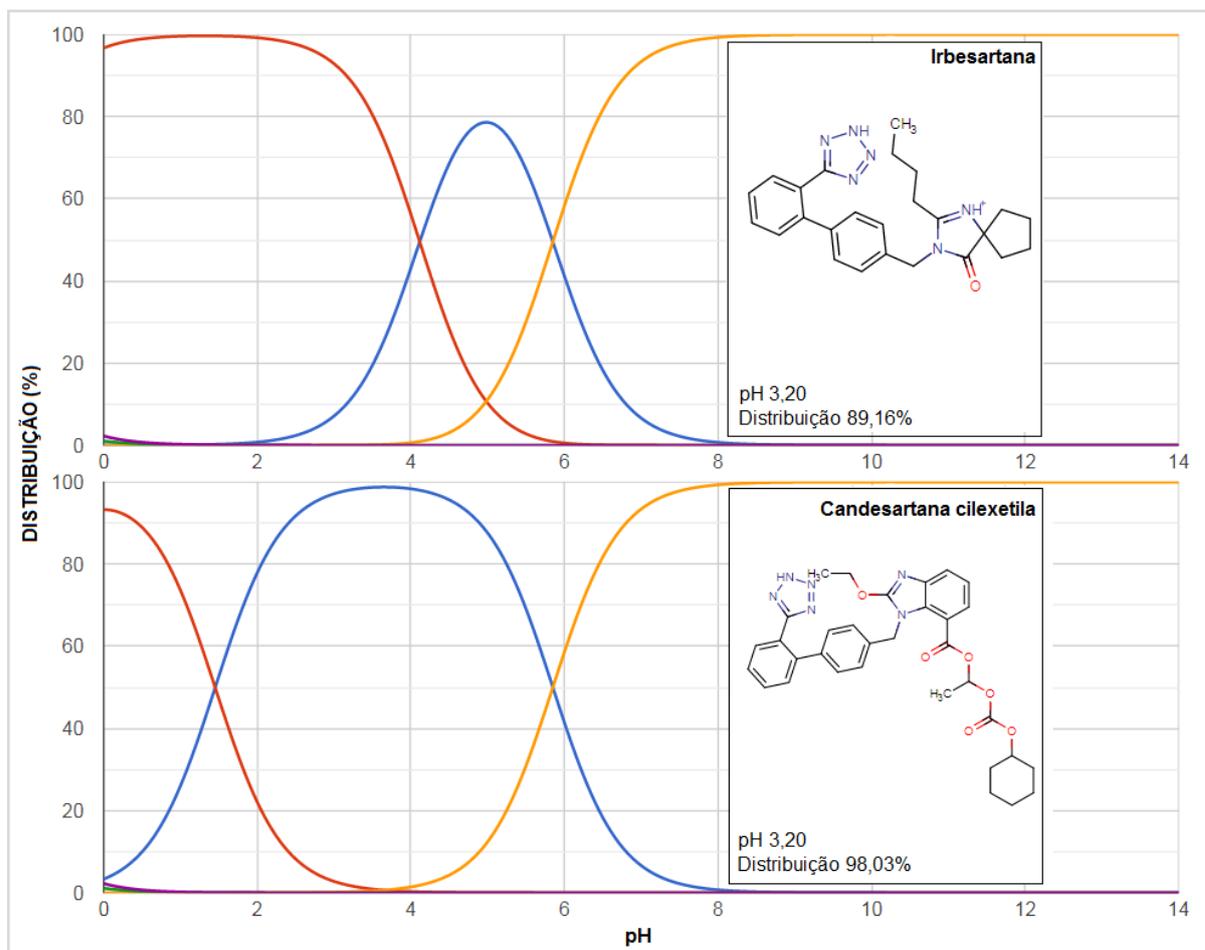


Figura 18 – Diagramas de distribuição de espécies dos ARAs II (continuação).

Fonte: CHEMICALIZE (2019).

4.1.2. Coluna analítica

Como o uso de colunas analíticas à base de sílica quimicamente ligada a grupos bifenila é vantajoso para a separação de compostos aromáticos, especialmente compostos polinucleares e nitroaromáticos como os ARAs II, selecionou-se uma coluna Kinetex Bifenil, com 4,6 mm de diâmetro, 100 mm de comprimento e partículas com 2,6 μm de diâmetro (MALDANER *et al.*, 2010). Quando comparada com as colunas convencionais ², essa coluna proporciona além da maior seletividade, maior eficiência e resolução. A principal vantagem do emprego de partículas com núcleo fundido (*core-shell*) é o estreitamento das bandas cromatográficas, em razão da rápida transferência de massa e do “empacotamento” ordenado da FE. O tamanho reduzido das partículas é essencial para a retenção dos analitos, que assim como a obtenção de bandas cromatográficas estreitas, é responsável pela elevada eficiência da

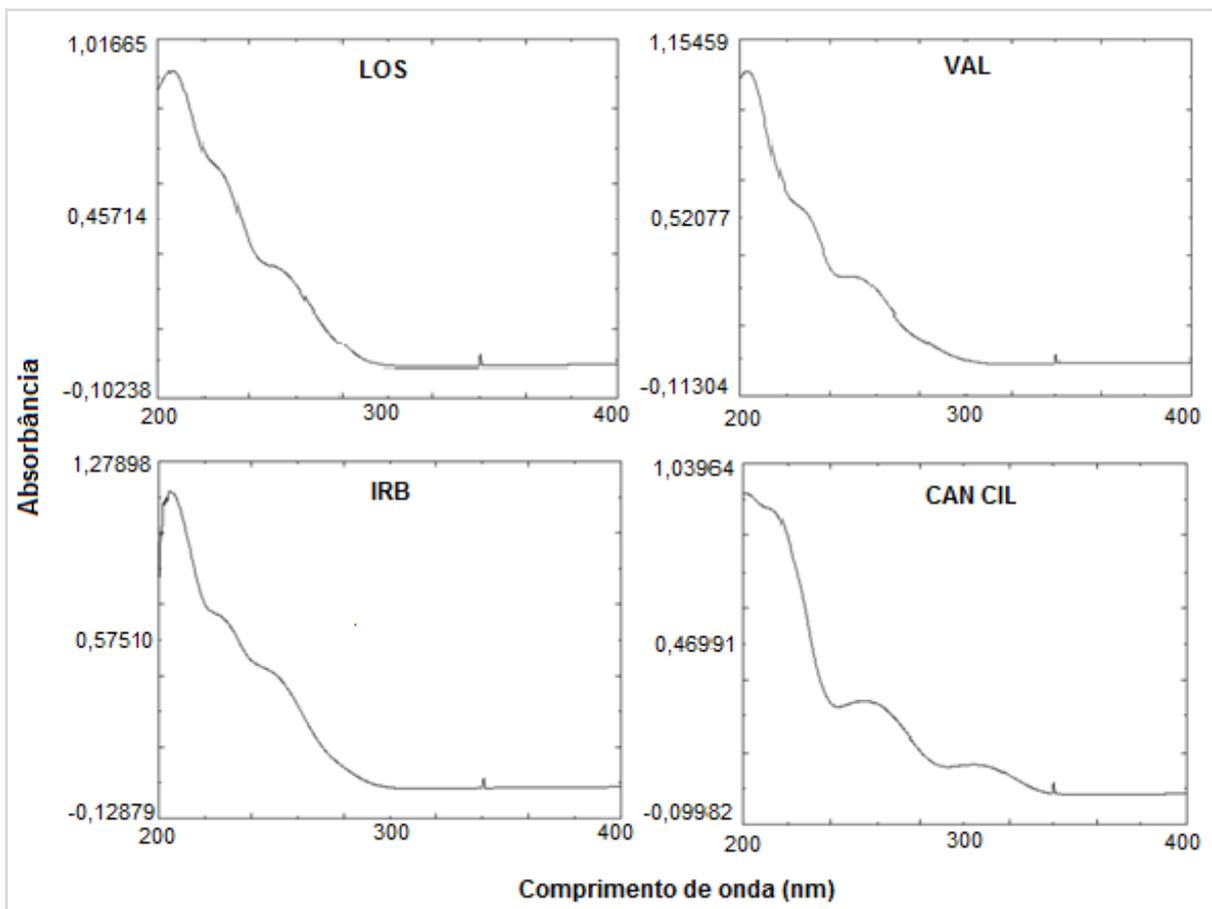
² Colunas com fase ligada C18 e partículas com 5 μm de diâmetro.

coluna. Além de reduzir a difusão longitudinal das bandas cromatográficas, potencializada por baixas vazões de FM, o pequeno comprimento da coluna é indispensável para a operação do equipamento dentro dos limites de pressão aceitáveis (LANÇAS, 2010).

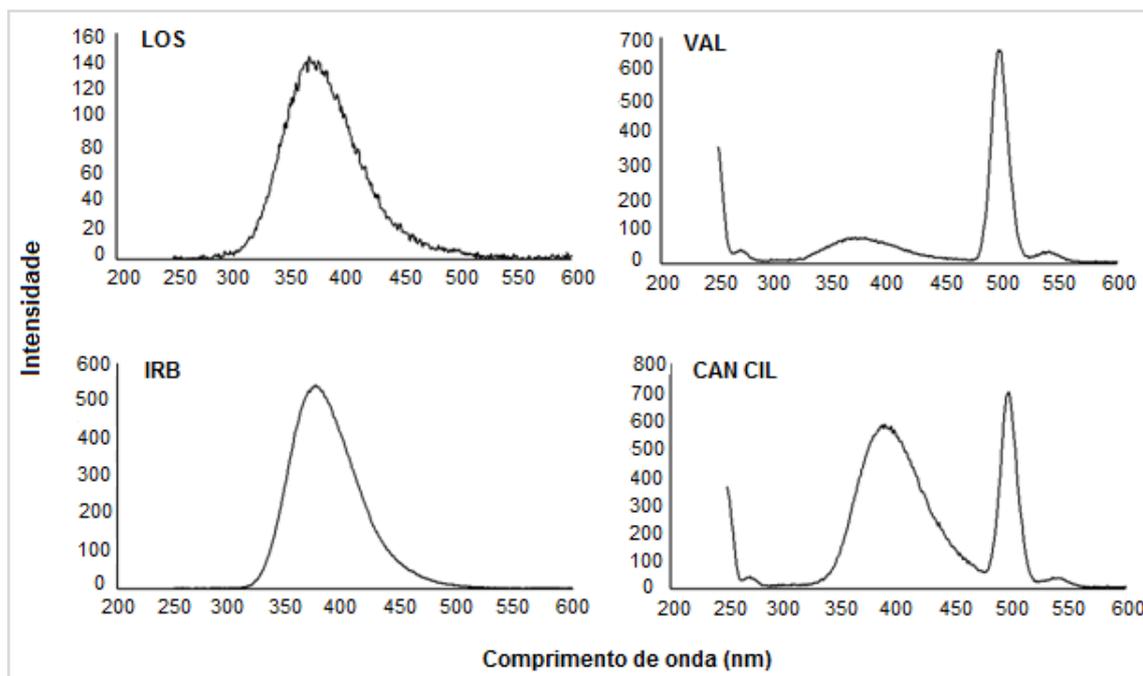
4.1.3. Comprimentos de onda para detecção

Os comprimentos de onda para detecção foram selecionados por meio da análise de espectros de absorção na região do ultravioleta e espectros de emissão de fluorescência dos ARAs II (**Figuras 19 e 20**). Para obter um método analítico com detecção simultânea, e especificidade e detectabilidade adequadas, selecionou-se um comprimento de onda de excitação de 250 nm e um comprimento de onda de emissão de 375 nm. Valores semelhantes foram encontrados na literatura (GONZÁLEZ *et al.*, 2002).

Figura 19 – Espectros de absorção na região do ultravioleta dos ARAs II.



Fonte: SOUZA (2021).

Figura 20 – Espectros de emissão de fluorescência dos ARAs II.

Fonte: SOUZA (2021).

4.1.4. Demais condições cromatográficas

Como a intensidade de fluorescência dos ARAs II reduz com o aumento da temperatura (EL-SHABOURY *et al.*, 2012), a temperatura do amostrador automático e do compartimento da coluna foi mantida a 25 ± 3 °C. Um gradiente linear com inclinação de 1,67% de B/min permitiu a separação dos ARAs II entre si e de compostos interferentes (0 - 15 min: 70% → 95% de B). Após a inclusão do gradiente reverso e da etapa de reequilíbrio do sistema cromatográfico, concluiu-se a corrida em 20 minutos (15 - 16 min: 95% de B; 16 - 17 min: 95% → 70% de B; 17 - 20 min: 70% de B). Foram empregados vazão de FM de 0,7 mL/min³ e volume de injeção de 10 µL (**Quadro 3**).

Quadro 3 – Condições cromatográficas do método analítico.

Condição	Descrição
Coluna analítica	Bifenila <i>core-shell</i> (100 x 4,6 mm; 2,6 µm)
Composição da FM	Solução de trietilamina 0,1% (v/v) e MeOH (pH 3,2)
Vazão da FM	0,7 mL/min

Continua

³ A pressão do sistema permaneceu entre 2500 e 3000 psi.

Continuação

Modo de eluição	Gradiente
Temperatura dos fornos	25 ± 3 °C
Volume de injeção	10 µL
Deteção	Comprimento de onda de excitação de 250 nm e de emissão de 375 nm

Final

4.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

4.2.1. Parâmetros da validação

4.2.1.1. Adequação do sistema

Antes de conduzir as etapas propriamente ditas da validação, é preciso assegurar que o sistema selecionado para a execução das análises esteja apto a fornecer resultados confiáveis. Como preconizado pela FDA, os parâmetros de adequação do sistema cromatográfico foram determinados por meio da injeção, em quintuplicata, de uma solução metanólica dos ARAs II (**Figura 21**). Os parâmetros obtidos foram apropriados, de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos: $N > 2000$; $1 \leq k \leq 10$; $T \leq 2$; DPR das áreas sob os picos de cada analito $\leq 1\%$ e resolução entre os picos dos ARAs II e dos compostos interferentes ≥ 2 (**Tabela 3**) (FDA, 1994; SNYDER *et al.*, 1997). Esses parâmetros foram monitorados em todos os ensaios da validação analítica.

Figura 21 – Cromatograma da solução metanólica com 400 ng/mL de LOS e 250 ng/mL de VAL, IRB e CAN CIL.

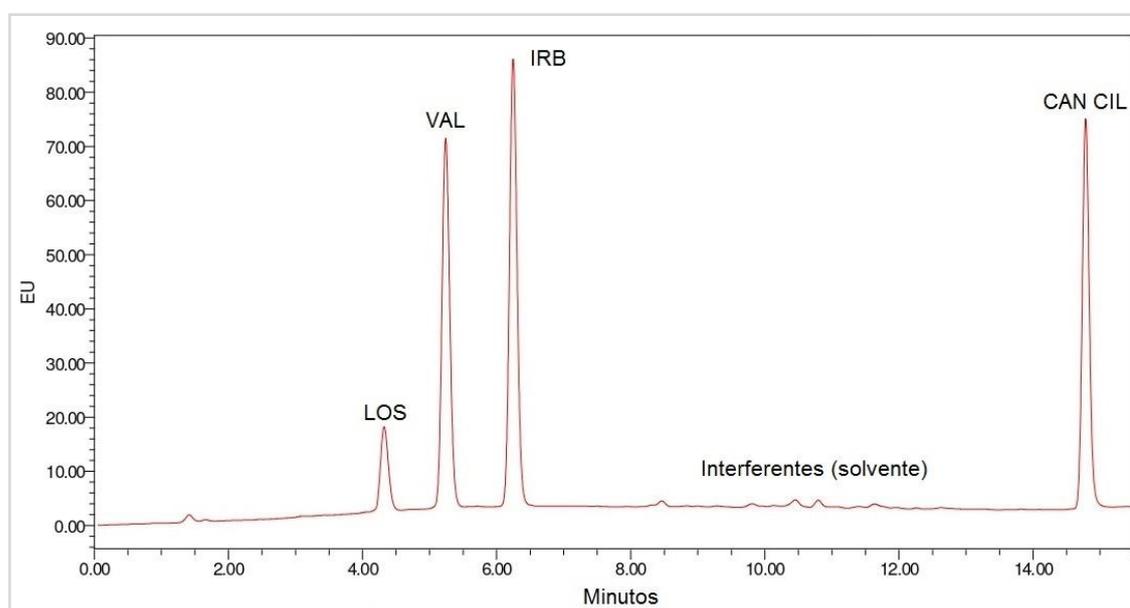


Tabela 3 – Resultados da avaliação da adequação do sistema cromatográfico.

ARA II	Parâmetros (n = 5)				
	t _R (min) *	N	k	T	DPR das áreas (%)
LOS	4,28	3942,72	1,58	1,30	0,16
VAL	5,19	6414,59	2,13	1,20	0,24
IRB	6,20	10180,12	2,74	1,28	0,14
CAN CIL	14,74	72384,26	7,90	1,32	0,67

* t_R: tempo de retenção.

4.2.1.2. Seletividade

A seletividade refere-se à capacidade do método em determinar os compostos de interesse, inequivocamente, na presença de compostos interferentes. Conforme estabelecido pela ANVISA, a seletividade foi demonstrada por meio da comprovação de que as respostas analíticas se devem, exclusivamente, aos analitos, sem interferência do solvente (**Figura 22**). Como nenhum composto interferente proveniente do MeOH coeluiu com os ARAs II, considerou-se o método seletivo (ANVISA, 2017a).

Figura 22 – Cromatograma do MeOH e da solução metanólica com 160 ng/mL de LOS e 110 ng/mL de VAL, IRB e CAN CIL (continua).

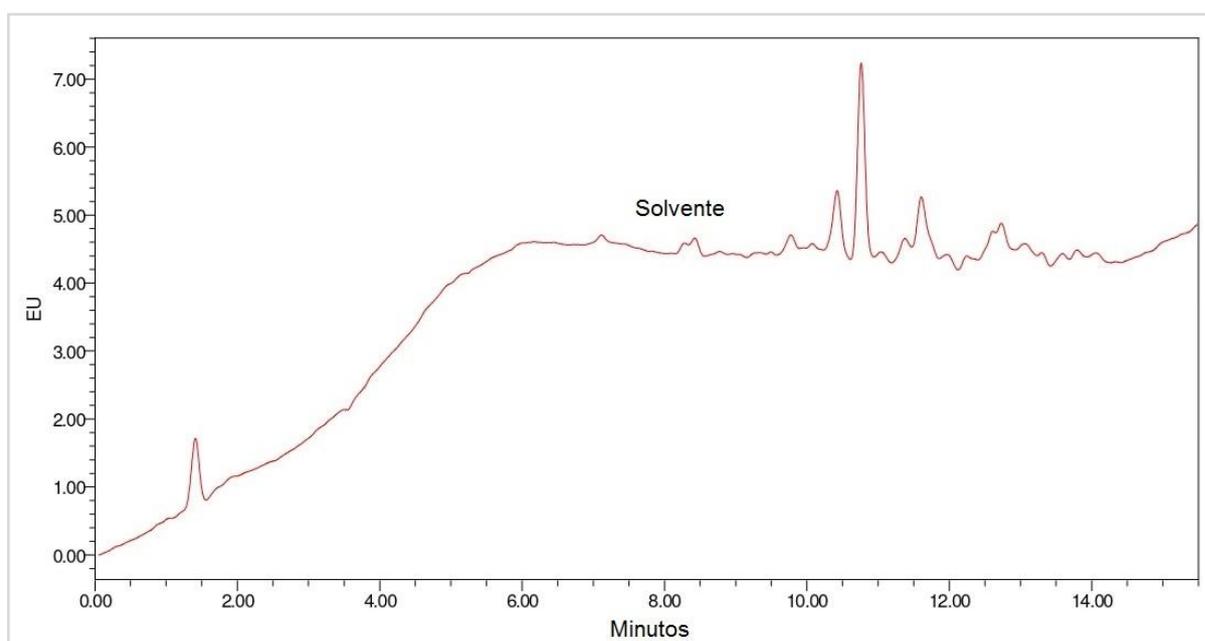
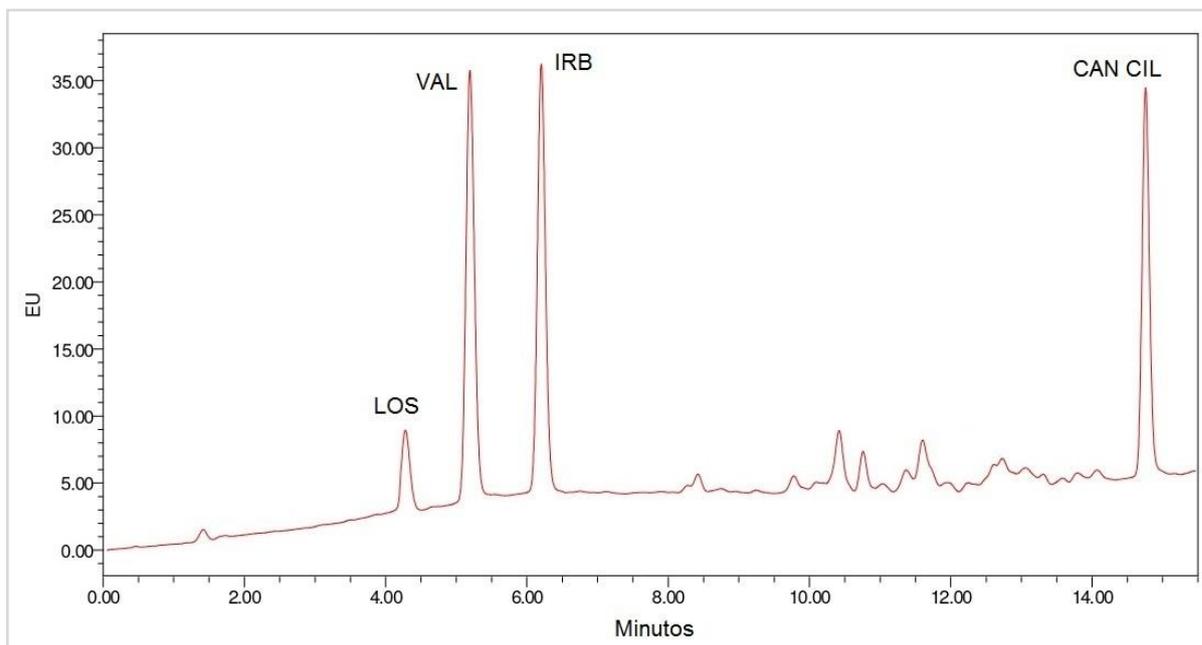


Figura 22 – Cromatograma do MeOH e da solução metanólica com 160 ng/mL de LOS e 110 ng/mL de VAL, IRB e CAN CIL (continuação).



4.2.1.3. Limites inferiores de quantificação

O LIQ é utilizado para demonstrar a habilidade do método em quantificar baixas concentrações do analito. Logo, o LIQ é a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis (ANVISA, 2017a). Neste estudo, o LIQ de cada ARA II foi determinado por meio da análise de soluções metanólicas com concentrações decrescentes dos analitos. Os LIQs obtidos foram 10 ng/mL para LOS e CAN CIL, e 5 ng/mL para VAL e IRB. Os resultados da avaliação da precisão e da exatidão do método são apresentados na **Subseção 4.2.1.5**.

4.2.1.4. Linearidade

Para qualquer método quantitativo, existem faixas de concentração dos analitos, nas quais o método pode ser aplicado. As faixas de concentração testadas neste estudo foram selecionadas com base nas necessidades do estudo preliminar de extração. As faixas lineares obtidas foram 10 - 400 ng/mL para LOS, 5 - 250 ng/mL para VAL e IRB, e 10 - 250 ng/mL para CAN CIL. Os DPRs das áreas sob os picos dos analitos, em cada nível de concentração,

foram inferiores a 7% (**Tabela 4**). Segundo a AOAC, DPRs de, no máximo, 15% são aceitos para esses níveis de concentração (AOAC, 2016). Como os dados experimentais foram considerados homocedásticos pelo teste de Cochran; uma vez que os valores de C calculado (C_{CAL}) foram inferiores aos valores de C tabelado (C_{TAB}), com nível de significância de 5%, o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) foi utilizado para obter as curvas analíticas (ANVISA, 2017b). Como as três curvas de cada ARA II foram consideradas estatisticamente iguais pelo teste de Chow, com nível de significância de 5% (**Tabela 4**), plotou-se curvas analíticas únicas, considerando todos os pontos dos gráficos de dispersão, de modo a obter modelos matemáticos representativos no que diz respeito à variabilidade do método (BATTISTI, 2001).

Tabela 4 – Avaliação dos dados experimentais obtidos na linearidade.

LOS					
Concentração nominal (ng/mL)	Média das áreas (n = 3)	DPR das áreas (%)	Teste C de Cochran		Teste de Chow *
			C_{CAL}	C_{TAB}	
10	20479	6,42			
40	122312	4,68			
100	304116	2,49			
160	457746	2,31			
220	651680	4,66	0,41	0,52	Valor-p = 0,61
280	841246	1,94			
340	1029702	1,72			
400	1207250	1,92			
VAL					
Concentração nominal (ng/mL)	Média das áreas (n = 3)	DPR das áreas (%)	Teste C de Cochran		Teste de Chow *
			C_{CAL}	C_{TAB}	
5	158368	4,94			
40	974900	5,11			
75	1717196	6,45			
110	2508019	5,44			
145	3094386	4,81	0,28	0,52	Valor-p = 0,36
180	3922586	4,78			
215	4814865	2,34			
250	5534230	2,70			

Continua

Continuação

IRB					
Concentração nominal (ng/mL)	Média das áreas (n = 3)	DPR das áreas (%)	Teste C de Cochran		Teste de Chow *
			C _{CAL}	C _{TAB}	
5	96611	3,02			
40	857080	3,80			
75	1755770	2,17			
110	2346755	5,48			
145	3189855	1,73	0,35	0,52	Valor-p = 0,32
180	3859831	1,71			
215	4777199	2,00			
250	5407438	1,94			

CAN CIL					
Concentração nominal (ng/mL)	Média das áreas (n = 3)	DPR das áreas (%)	Teste C de Cochran		Teste de Chow *
			C _{CAL}	C _{TAB}	
10	158752	6,47			
40	773550	3,36			
75	1516671	3,78			
110	2207580	2,85			
145	2999910	2,07	0,18	0,52	Valor-p = 0,24
180	3603157	1,57			
215	4391779	1,47			
250	5065269	1,26			

Final

* Se o valor-p do teste de Chow for superior a 0,05, constata-se a igualdade das regressões.

Os R^2 das curvas analíticas são apresentados na **Figura 23**. Os r , resultados do teste F da análise de variância (ANOVA) e resultados do teste T, são apresentados na **Tabela 5**. Os R^2 e r foram superiores a 0,99; logo os pontos dos diagramas de dispersão apresentaram-se próximos às retas de regressão e o grau de relacionamento linear entre as variáveis é muito forte. As regressões foram consideradas significativas pelo teste F; uma vez que os valores de F calculado (F_{CAL}) foram superiores aos valores de F tabelado (F_{TAB}), com nível de significância de 5%; e os interceptos com o eixo y foram considerados estatisticamente iguais a zero pelo teste T; uma vez que os valores-p foram superiores a 0,05. Dessa forma, não se

observou interferência do solvente nos sinais analíticos (ANVISA, 2017b; SOUZA e JUNQUEIRA, 2005).

Figura 23 - Curvas analíticas dos ARAs II.

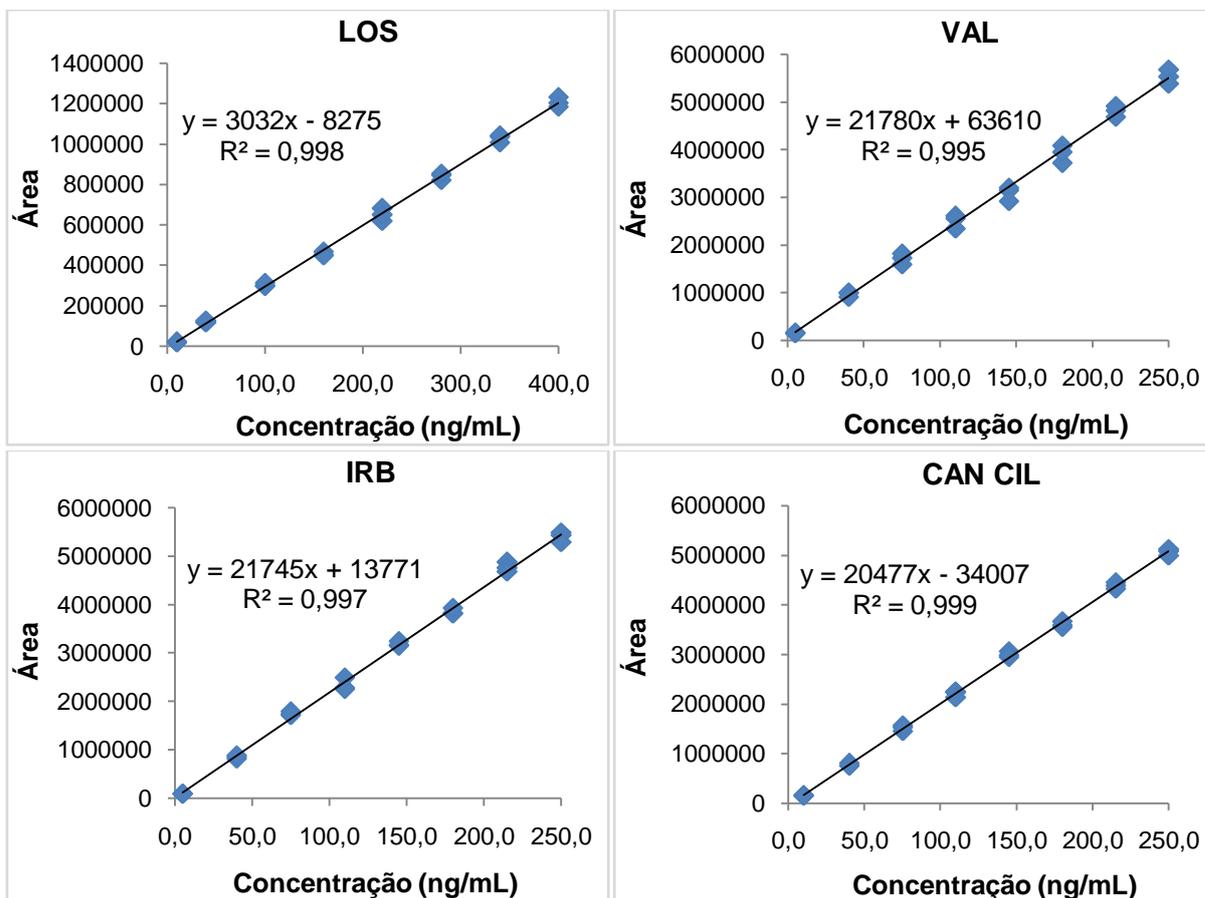


Tabela 5 – Valores dos r e resultados dos testes F e T.

Resultado	ARA II			
	LOS	VAL	IRB	CAN CIL
r	0,999	0,998	0,999	0,999
Teste F	$F_{CAL} = 13168,56$ $F_{TAB} = 4,30$	$F_{CAL} = 4723,13$ $F_{TAB} = 4,30$	$F_{CAL} = 8484,14$ $F_{TAB} = 4,30$	$F_{CAL} = 19556,95$ $F_{TAB} = 4,30$
Teste T	Valor-p = 0,20	Valor-p = 0,20	Valor-p = 0,70	Valor-p = 0,14

Conforme recomendado por SOUZA e JUNQUEIRA (2005), utilizou-se o teste de Ryan-Joiner, o teste de Durbin-Watson e o teste de Brown-Forsythe, para avaliar a normalidade, independência e homocedasticidade dos resíduos, respectivamente. O teste de Grubbs foi utilizado para avaliar a presença de valores extremos (*outliers*). Pode-se observar na **Tabela 6**, que nenhum valor extremo foi encontrado e os resíduos obtidos tiveram distribuição normal, e foram independentes e homocedásticos. Logo, os modelos matemáticos obtidos mostraram-se adequados para explicar a relação entre a variável resposta e a variável explicativa (ANVISA, 2017b). A dispersão aleatória dos resíduos pode ser observada nos gráficos dos resíduos em função dos valores previstos de y (**Figura 24**).

Tabela 6 – Resultados da análise dos resíduos.

Teste	ARA II			
	LOS	VAL	IRB	CAN CIL
Grubbs ^a	$Z_{CAL} = 2,27$	$Z_{CAL} = 2,43$	$Z_{CAL} = 2,09$	$Z_{CAL} = 2,38$
	$Z_{TAB} = 2,64$	$Z_{TAB} = 2,64$	$Z_{TAB} = 2,64$	$Z_{TAB} = 2,64$
Ryan-Joiner ^b	$R_{CAL} = 0,99$	$R_{CAL} = 0,97$	$R_{CAL} = 0,99$	$R_{CAL} = 0,99$
	$R_{TAB} = 0,96$	$R_{TAB} = 0,96$	$R_{TAB} = 0,96$	$R_{TAB} = 0,96$
Durbin-Watson ^c	$d = 2,21$	$d = 1,71$	$d = 1,69$	$d = 2,28$
	$d_U = 1,45$	$d_U = 1,45$	$d_U = 1,45$	$d_U = 1,45$
	$4-d_U = 2,55$	$4-d_U = 2,55$	$4-d_U = 2,55$	$4-d_U = 2,55$
Brown-Forsythe ^d	$F_{CAL} = 2,73$	$F_{CAL} = 2,54$	$F_{CAL} = 0,001$	$F_{CAL} = 2,74$
	$F_{TAB} = 4,30$	$F_{TAB} = 4,30$	$F_{TAB} = 4,30$	$F_{TAB} = 4,30$

^a Se o valor de Z calculado (Z_{CAL}) for inferior ao valor de Z tabelado (Z_{TAB}), não há valores extremos.

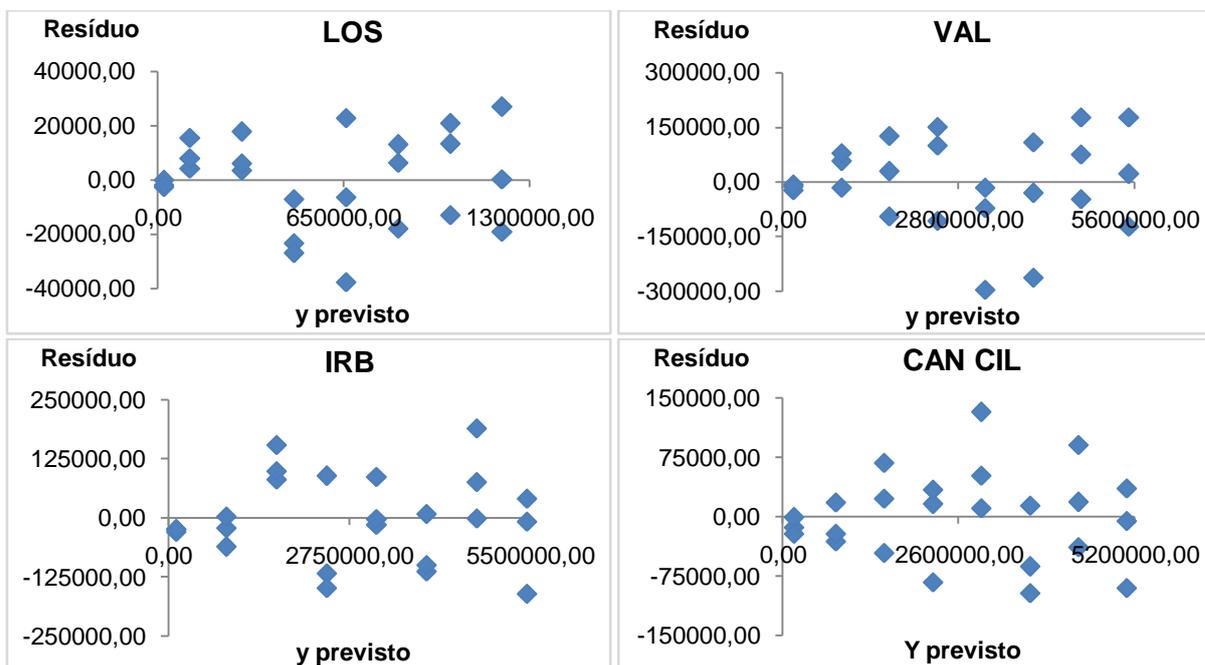
^b Se o valor de R calculado (R_{CAL}) for superior ao valor de R tabelado (R_{TAB}), os resíduos têm distribuição normal.

^c Se $d_U < d < 4-d_U$, os resíduos são considerados independentes.

^d Se o valor de F_{CAL} for inferior ao valor de F_{TAB} , os resíduos são considerados homocedásticos.

Foi utilizado um nível de significância de 5% em todos os testes estatísticos.

Figura 24 – Gráficos dos resíduos em função dos valores previstos de y.



4.2.1.5. Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão referem-se, respectivamente, à capacidade do método em fornecer dados com baixa dispersão e resultados de concentração próximos aos valores reais (ANVISA, 2017a). Os DPRs obtidos na avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária foram inferiores a 10% (**Tabela 7**). Os valores de recuperação obtidos na avaliação da exatidão permaneceram entre 80 e 110% (**Tabela 8**). Segundo a AOAC, DPRs inferiores a 15% e valores de recuperação entre 80 e 110% para os três níveis de concentração são considerados adequados (AOAC, 2016). Logo, o método mostrou-se preciso e exato nas faixas lineares supracitadas.

Tabela 7 – Resultados da avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária.

ARA II	Concentração nominal (ng/mL)	Repetibilidade		Precisão intermediária	
		Média das concentrações (ng/mL) (n = 3)	DPR das concentrações (%)	Média das concentrações (ng/mL) (n = 6)	DPR das concentrações (%)
LOS	10	9,34	6,18	9,19	5,56
	200	203,58	4,53	206,54	4,97
	400	419,35	3,50	408,08	4,39

Continua

<i>Continuação</i>					
VAL	5	4,74	9,82	4,77	9,29
	125	118,70	6,97	123,66	6,60
	250	249,35	3,24	257,13	5,79
IRB	5	4,23	7,38	4,36	7,24
	125	110,40	6,03	112,82	6,27
	250	259,02	3,34	258,29	2,90
CAN CIL	10	9,09	8,03	8,78	8,33
	125	121,27	4,77	123,91	4,86
	250	260,29	3,20	255,03	3,42

Final

Tabela 8 – Resultados da avaliação da exatidão.

ARA II	Concentração nominal (ng/mL)	Exatidão	
		Média das concentrações (ng/mL) (n = 3)	Recuperação (%)
LOS	10	9,34	93,40
	200	203,58	101,79
	400	419,35	104,84
VAL	5	4,74	94,77
	125	118,70	94,96
	250	249,35	99,74
IRB	5	4,23	84,60
	125	110,40	88,32
	250	259,02	103,61
CAN CIL	10	9,09	90,92
	125	121,27	97,02
	250	260,29	104,11

4.2.1.6. Robustez

A robustez avalia a suscetibilidade do método a pequenas variações que podem ocorrer durante as análises de rotina. Logo, os testes da robustez são de fundamental importância para que os analistas conheçam quais precauções deverão ser tomadas durante o emprego do método recém-validado (CASSIANO *et al.*, 2009). Como as variações de temperatura dos fornos, variação de pH da FM para 3,3 e variação de vazão da FM para 0,6 mL/min produziram resultados de adequação do sistema cromatográfico e DPRs das áreas sob os picos dos ARAs II dentro dos critérios de aceitação estabelecidos, considerou-se o método robusto à essas variações (**Tabela 9**). Todavia, em razão da vulnerabilidade do método à variação de pH da FM para 3,1 e à variação de vazão da FM para 0,8 mL/min, foram

necessários a verificação periódica da vazão e o emprego de potenciômetros devidamente calibrados durante o preparo da FM. Esse procedimento teve como objetivo evitar a sobreposição de bandas cromatográficas e o emprego de valores de pH muito próximos de 3,0, que são, freqüentemente, associados à variações de emissão de fluorescência dos ARAs II (GONZÁLEZ *et al.*, 2002).

Tabela 9 – Resultados da avaliação da robustez (n = 2).

LOS				
Variação	N	k	T	DPR das áreas (%)
Nenhuma	3928,04	1,58	1,30	
Vazão da FM de 0,6 mL/min	4273,12	2,11	1,26	
pH da FM de 3,3	4198,43	1,60	1,29	0,63 *
Temperatura dos fornos de 23 °C	3968,12	1,59	1,31	
Temperatura dos fornos de 27 °C	3810,66	1,55	1,28	
VAL				
Variação	N	k	T	DPR das áreas (%)
Nenhuma	6438,23	2,13	1,20	
Vazão da FM de 0,6 mL/min	7380,76	2,73	1,17	
pH da FM de 3,3	6732,18	2,15	1,20	0,52 *
Temperatura dos fornos de 23 °C	6651,67	2,14	1,22	
Temperatura dos fornos de 27 °C	6380,95	2,11	1,19	
IRB				
Variação	N	k	T	DPR das áreas (%)
Nenhuma	10163,21	2,74	1,28	
Vazão da FM de 0,6 mL/min	11539,95	3,41	1,24	
pH da FM de 3,3	10516,36	2,75	1,29	0,61 *
Temperatura dos fornos de 23 °C	10294,44	2,75	1,29	
Temperatura dos fornos de 27 °C	10031,56	2,71	1,27	
CAN CIL				
Variação	N	k	T	DPR das áreas (%)
Nenhuma	72261,10	7,89	1,32	
Vazão da FM de 0,6 mL/min	83377,86	8,75	1,28	
pH da FM de 3,3	74085,32	7,88	1,32	0,64 *
Temperatura dos fornos de 23 °C	72511,06	7,90	1,33	
Temperatura dos fornos de 27 °C	72151,24	7,87	1,30	

* DPR dos dez valores de área.

Resolução entre os picos dos ARAs II e dos compostos interferentes ≥ 2 .

4.3. ESTABILIDADE DOS ANALITOS EM METANOL

Os ARAs II foram estáveis em MeOH por, no mínimo, 14 dias sob refrigeração. Conforme estabelecido pela ANVISA, o DPR das áreas obtidas para cada ARA II foi inferior a 10% (ANVISA, 2012). A estabilidade após duas semanas não foi avaliada. Segundo GONZÁLEZ *et al.* (2002), quando protegidos da luz, os ARAs II são estáveis em MeOH por, no mínimo, 1 ano, a 4 °C.

4.4. ESTUDO PRELIMINAR DE EXTRAÇÃO

4.4.1. Condições fixas

4.4.1.1. Solvente para ativação da fase sólida e para condicionamento dos cartuchos

Considerando as características físico-químicas da fase ligada do nanosorvente, selecionou-se o MeOH como solvente para a etapa de ativação. A passagem desse solvente pelos cartuchos ordena as cadeias alquílicas da fase ligada, que se encontram emaranhadas no nanomaterial seco. A presença do grupo funcional hidroxila na molécula do solvente orgânico permite a interação com moléculas de água, facilitando a permeação de solventes aquosos entre as partículas da fase sólida. Com o objetivo de remover o solvente orgânico dos cartuchos e equiparar o solvente presente no nanosorvente com o solvente das amostras; impedindo que os analitos presentes nas porções inicial e final das amostras sejam submetidos à SPE sob valores de pH demasiadamente diferentes, selecionou-se uma solução tampão fosfato de potássio monobásico anidro 10 mM pH 2 como solvente para a etapa de condicionamento ⁴ (**Quadro 4**).

4.4.1.2. Concentrações das amostras e volume de amostra

As concentrações das amostras; isso é, das soluções aquosas dos ARAs II; foram selecionadas tendo em vista as concentrações plasmáticas máximas, no estado de equilíbrio, obtidas após a administração de dose usual da LOS e VAL⁵, e a possível utilização da IRB ou CAN CIL como PI no método bioanalítico (LEIDIG *et al.*, 2001; SASAKI *et al.*, 1996).

⁴ pH ajustado com ácido fosfórico.

⁵ 50 mg/dia e 80 mg/dia, respectivamente.

Devido à baixa solubilidade dos ARAs II em água, as amostras foram preparadas por meio da diluição de soluções estoque dos ARAs II em MeOH ⁶. Todavia, o volume de MeOH nas amostras foi inferior ou igual a 1%. Essa conduta é importante para evitar que o MeOH, presente nas amostras, afete a extração dos ARAs II na etapa de SPE. O volume de amostra foi selecionado com base no trabalho de GONZÁLEZ *et al.* (2002).

4.4.1.3. Acidificação das amostras

Antes de serem submetidas à SPE, as alíquotas das amostras foram acidificadas, na proporção 1:1, com ácido fosfórico 1 M (pH final < 2). A importância dessa etapa para a extração dos ARAs II, principalmente de plasma humano, é discutida com detalhes na **Subseção 4.2 do Capítulo 3**.

4.4.1.4. Volume de solvente para lavagem da fase sólida e para eluição dos analitos

Para que não houvesse a alteração da ionização dos ARAs II retidos pela fase sólida, selecionou-se 250 µL de mistura de tampão fosfato de potássio monobásico anidro 10 mM pH 2 e MeOH como solvente para a etapa de lavagem. O volume de solvente para a eluição dos ARAs II foi selecionado com base no trabalho de FERREIRÓS *et al.* (2016). Independentemente das recuperações obtidas (40 – 100%), as concentrações dos extratos permaneceram dentro das faixas lineares do método analítico.

4.4.1.5. Vazão da etapa de ativação e de lavagem da fase sólida, de condicionamento dos cartuchos e de eluição dos analitos

As vazões das etapas da SPE foram controladas por meio do vácuo do sistema de filtração. Na etapa de ativação, de condicionamento e de eluição, empregou-se um vácuo de 10 inHg, enquanto que na etapa de lavagem empregou-se um vácuo de 5 inHg. Devido às diferentes viscosidades dos solventes, obteve-se uma vazão de, aproximadamente, 2,1 mL/min na etapa de ativação (MeOH), 1,3 mL/min na etapa de condicionamento (tampão fosfato de potássio monobásico anidro 10 mM pH 2), 0,8 mL/min na etapa de lavagem

⁶ As amostras foram preparadas no momento do uso e, em seguida, descartadas.

(mistura de tampão fosfato de potássio monobásico anidro 10 mM pH 2 e MeOH) e 2,1 mL/min (MeOH) ou 3,4 mL/min (ACN) na etapa de eluição.

Quadro 4 – Condições fixas do estudo preliminar de extração.

Etapa da SPE	Condição fixa	Descrição
Ativação	Tipo de solvente	MeOH
Condicionamento		Tampão de KH ₂ PO ₄ 10 mM pH 2
Introdução da amostra	Concentração da amostra *	Amostra A: 250 ng/mL de LOS
		Amostra B: 1640 ng/mL de VAL, e 205 ng/mL de IRB e CAN CIL
	Volume de amostra	250 µL
Volume de H ₃ PO ₄ 1 M		
Lavagem	Volume de solvente	2 mL
Eluição		

* Devido à menor intensidade de fluorescência da LOS, conduziu-se a extração desse fármaco separadamente.

4.4.2. Planejamento fatorial

4.4.2.1. Tipo do planejamento

A quimiometria é uma ferramenta útil para estudar um sistema complexo, em que diversos fatores podem influenciar a resposta sob observação do analista (NETO *et al.*, 2001). Como a condução de um planejamento fatorial (PF) completo caracteriza-se um verdadeiro desperdício; uma vez que o estudo preliminar de extração requer a obtenção de pouca informação, todavia cruciais para o método bioanalítico, selecionou-se um modelo de PFF. Vale enfatizar, que esse tipo de planejamento é considerado ideal, quando não se conhece, a priori, a relação completa dos fatores capazes de afetar, de maneira significativa, a resposta sob observação do analista. Nesses casos, a inclusão de todas as variáveis envolvidas no processo extrativo, torna, na maioria das vezes, a execução do número de ensaios requeridos pelo PF completo impraticável (NETO *et al.*, 2001).

4.4.3. Análise dos dados experimentais

4.4.3.1. Seleção do PI para o método bioanalítico

A matriz e resultados de recuperação do PFF são apresentados na **Tabela 10**. Os ensaios de extração da LOS, VAL e IRB obtiveram valores de recuperação satisfatórios. Considerando apenas os valores de log P dos ARAs II, a ordem esperada dos valores de recuperação é LOS < VAL < IRB. Todavia, devido às características físico-químicas do nanosorvente e à ionização da LOS e da IRB; o que aumenta a hidrofobicidade desses fármacos; a IRB obteve valores de recuperação inferiores, quando comparada com a VAL. Devido à evidência de degradação da CAN CIL pela solução de ácido fosfórico 1 M, selecionou-se o fármaco IRB como PI para o método bioanalítico. Conforme os requisitos para seleção de PI, descritos por SNYDER *et al.* (1997), a IRB não se encontra presente na matriz biológica original; está disponível comercialmente com alto grau de pureza; é estável e reproduz o comportamento dos analitos durante o preparo de amostras; e possui estrutura química, retenção cromatográfica e resposta analítica similares aos analitos.

Tabela 10 – Matriz e resultados de recuperação do PFF 2⁶⁻²_{IV}.

Ensaio	Variável ^a						Recuperação (%) ^b		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	LOS	VAL	IRB
1 A-B	-1	-1	-1	-1	-1	-1	77,55	87,94	80,28
2 A-B	1	-1	-1	-1	1	-1	77,13	85,42	82,44
3 A-B	-1	1	-1	-1	1	1	74,74	80,49	79,82
4 A-B	1	1	-1	-1	-1	1	83,21	90,34	83,78
5 A-B	-1	-1	1	-1	1	1	73,28	82,15	77,62
6 A-B	1	-1	1	-1	-1	1	82,07	88,82	86,36
7 A-B	-1	1	1	-1	-1	-1	78,39	85,38	83,55
8 A-B	1	1	1	-1	1	-1	78,88	84,78	81,98
9 A-B	-1	-1	-1	1	-1	1	72,90	81,36	79,11
10 A-B	1	-1	-1	1	1	1	66,52	80,22	73,03
11 A-B	-1	1	-1	1	1	-1	64,05	77,66	70,49
12 A-B	1	1	-1	1	-1	-1	76,56	81,85	81,02
13 A-B	-1	-1	1	1	1	-1	63,60	75,57	68,35
14 A-B	1	-1	1	1	-1	-1	76,16	82,80	80,99
15 A-B	-1	1	1	1	-1	1	74,94	81,71	80,42
16 A-B	1	1	1	1	1	1	68,57	81,11	74,39

^a O nível inferior foi codificado como -1 e o nível superior como 1.

^b Os maiores valores de recuperação são apresentados em negrito.

4.4.3.2. Determinação das variáveis significativas

Os efeitos dos fatores de primeira, segunda e terceira ordem, estimados pelo PFF, são apresentados na **Tabela 11**. Os gráficos de probabilidade normal desses efeitos são apresentados na **Figura 25**⁷. Apenas as variáveis X₁, X₄ e X₅ foram capazes de afetar, significativamente, a recuperação dos ARAs II; com nível de significância de 5%. Logo, mantiveram-se essas variáveis no estudo de extração. Como esperado, o aumento da quantidade de nanosorvente nos cartuchos aumentou as recuperações, enquanto que o aumento da vazão da etapa de introdução da amostra e da proporção de MeOH no solvente da etapa de lavagem reduziram as recuperações. Em razão da maior hidrofobicidade da VAL, a recuperação desse fármaco foi menos impactada pela redução da quantidade de nanosorvente nos cartuchos, pelo aumento da vazão da etapa de introdução da amostra e pelo aumento da proporção de MeOH no solvente da etapa de lavagem.

Tabela 11 – Estimativa dos efeitos e confundimento dos fatores do PFF 2⁶⁻²_{IV}.

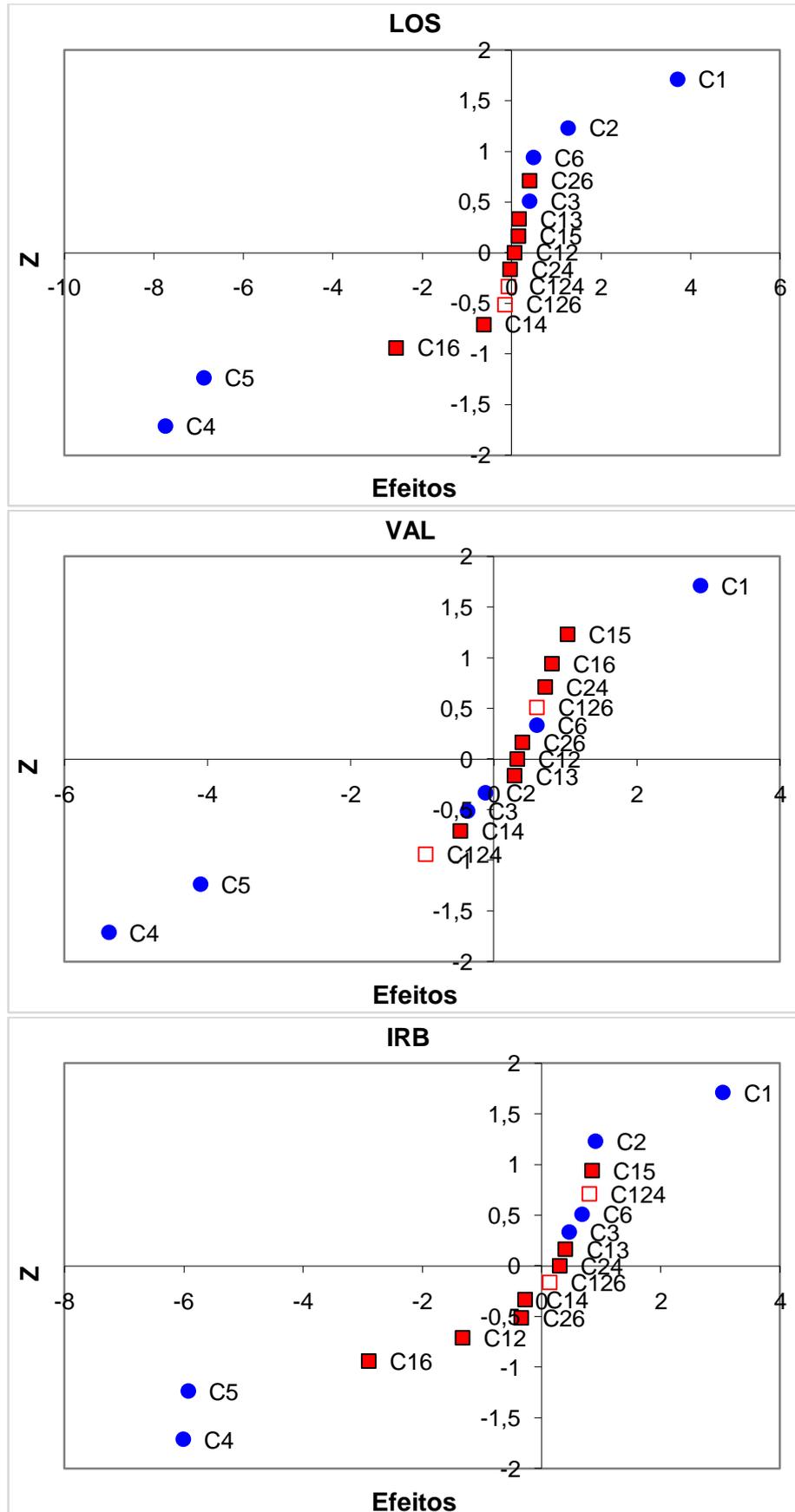
Fator	Efeito ^a			Confundimento			
	LOS	VAL	IRB				
1	3,71	2,89	3,04	1	235	456	-
2	1,27	-0,12	0,91	2	135	346	-
3	0,40	-0,37	0,46	3	125	246	-
4	-7,74	-5,38	-6,00	4	156	236	-
5	-6,88	-4,10	-5,92	5	123	146	-
6	0,49	0,60	0,68	6	145	234	-
12	0,07	0,33	-1,32	12	35	-	-
13	0,16	0,29	0,40	13	25	-	-
14	-0,63	-0,47	-0,28	14	56	-	-
15	0,15	1,03	0,85	15	23	46	-
16	-2,58 ^b	0,81	-2,90 ^b	16	45	-	-
24	-0,03	0,71	0,30	24	36	-	-
26	0,41	0,40	-0,34	26	34	-	-
124	-0,08	-0,95	0,81	124	136	256	345
126	-0,15	0,61	0,14	126	134	245	356

^a Os efeitos significativos são apresentados em negrito. Utilizou-se um nível de significância de 5%.

^b Fator de segunda ordem confundido com o fator de segunda ordem 45.

⁷ Os fatores mais afastados de zero, têm efeitos com maior magnitude e, portanto, mais significativos.

Figura 25 – Gráficos de probabilidade normal dos efeitos.



As variáveis X_2 , X_3 e X_6 apresentaram-se inertes, e por esse motivo foram fixadas. O volume de MeOH para a ativação da fase sólida foi fixado em 2 mL (**Quadro 5**). O volume de tampão fosfato de potássio monobásico anidro 10 mM pH 2 para o condicionamento dos cartuchos foi fixado em 500 μ L. Como 2 mL de MeOH ou ACN foram capazes de promover a eluição completa dos fármacos, e verificou-se por meio de análise univariada que volumes inferiores de MeOH ou ACN acarretam recuperações insatisfatórias, selecionou-se 2 mL de MeOH para a eluição dos ARAs II. O uso de 2 mL de ACN, nesse caso, acarretaria a inclusão de uma etapa desnecessária ao preparo de amostras, além de aumentar a quantidade de compostos interferentes nos extratos provenientes de plasma humano, devido à maior eluição de compostos fortemente retidos pela fase sólida.

Quadro 5 – Condições otimizadas no estudo preliminar de extração.

Etapa da SPE	Condição otimizada	Descrição
Ativação	Volume e tipo de solvente	2 mL de MeOH
Condicionamento		500 μ L de tampão de KH_2PO_4 10 mM pH 2
Eluição		2 mL de MeOH

5. CONCLUSÃO

Além de possibilitar a triagem das variáveis, e a seleção do PI para o método bioanalítico, o estudo preliminar de extração permitiu reduzir o gasto de amostras biológicas, comumente disponíveis em quantidades limitadas, além de reduzir o número total de ensaios e, conseqüentemente, o tempo de análise e custos envolvidos. Ademais, colaborou para a expansão do conhecimento sobre o objeto de pesquisa. Logo, todo o esforço despendido nesse estudo, voltou-se produtivamente para a clarificação gradativa do tema, contribuindo para a tomada de decisão racional.

CAPÍTULO 3

DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE LOSARTANA E VALSARTANA EM PLASMA HUMANO

1. INTRODUÇÃO

Após conhecer quais são as variáveis capazes de afetar significativamente a extração dos ARAs II pelos BNNTs funcionalizados com grupos C18, conduziu-se um estudo de extração dos fármacos de plasma humano, como o objetivo de obter um método de extração otimizado. O método bioanalítico obtido foi validado e empregado na determinação simultânea de LOS e VAL em plasma humano, utilizando a IRB como PI.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar o método cromatográfico apresentado no **Capítulo 2**.
- Realizar o estudo de extração para otimizar as variáveis significativas, empregando o método cromatográfico recém-otimizado.
- Validar o método bioanalítico, conforme o preconizado nos guias nacionais e internacionais de validação.
- Aplicar o método bioanalítico recém-validado na análise de amostras de plasma de pacientes hipertensos sob tratamento medicamentoso com LOS ou VAL.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Reagentes, solventes, consumíveis e equipamentos

A nicotina (NIC) grau P.A, com pureza superior a 99%, foi adquirida da Acros Organics (lote A0333681). Uma pré-coluna da marca Phenomenex, modelo Security Guard, com cartucho C18 (4 x 3 mm), foi usada para proteger a coluna analítica. Uma centrífuga com refrigeração da marca Thermo Fisher Scientific, modelo MR23I (equipada com rotor oscilante, modelo SWM 180.5), foi usada para centrifugar as amostras de sangue. Um ultrafreezer vertical da marca Revco, modelo UTL-2186-5-D34, foi usado para armazenar as amostras de plasma. Um agitador do tipo vórtex da marca Loccus, modelo Mini Flexvórtex 3800, e uma centrífuga com refrigeração da marca Eppendorf, modelo 5424 R, foram usados

durante a etapa de fortificação do plasma e de preparo de amostras. Os solventes, e demais reagentes, consumíveis e equipamentos usados, foram descritos no **Capítulo 2**.

3.1.2. Insumos farmacêuticos ativos e substâncias químicas de referência

O besilato de anlodipino, insumo farmacêutico ativo, foi adquirido da Purifarma (lote AMB/070/08/16). A hidroclorotiazida (HCT), substância química de referência, foi adquirida da Farmacopeia Brasileira (lote 1003). O felodipino (FEL), nifedipino (NIF), nimodipino (NIM) e cafeína (CAF), todas substâncias químicas de referência, foram adquiridos da farmacopeia dos Estados Unidos (lote H0I178, K0D401, F0F203 e K0D372, respectivamente). Os demais insumos farmacêuticos ativos usados foram descritos no **Capítulo 2**.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Obtenção das amostras de plasma

3.2.1.1. Coleta das amostras de sangue

As amostras de sangue foram coletadas a vácuo, em tubos jateados com spray seco de heparina de lítio. As amostras de sangue de voluntários sadios (amostras “branco”) foram coletadas conforme as recomendações da ANVISA (ANVISA, 2012), no Laboratório de Hematologia Clínica da FAFAR da UFMG. As amostras “branco” normais e hemolisadas foram coletadas pela manhã, com os voluntários sob jejum, enquanto que as amostras lipêmicas foram coletadas duas horas após o almoço. As amostras de sangue de voluntários hipertensos sob terapia anti-hipertensiva foram coletadas no Ambulatório de Anticoagulação do Serviço de Hematologia e Oncologia do Hospital das Clínicas da UFMG. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG. O número do Certificado de Apresentação para Apreciação Ética é 01455418.4.0000.5149.

3.2.1.2. Centrifugação das amostras de sangue

Para promover a precipitação dos elementos figurados, as amostras de sangue foram centrifugadas a 1431 x g, sob temperatura de 4 °C, por 10 minutos. O plasma de cada amostra

de sangue foi coletado e transferido para tubos do tipo falcon devidamente identificados. Todas as amostras de plasma foram armazenadas em ultrafreezer, sob temperatura de -70 °C, até o momento do uso. Amostras de *pool* de plasma foram obtidas misturando alíquotas iguais de amostras individuais de plasma “branco”.

3.2.2. Otimização do método cromatográfico

3.2.2.1. Procedimento

Para otimizar as condições cromatográficas do método apresentado no **Capítulo 2**, com o objetivo de separar os ARAs II e compostos interferentes provenientes do MeOH e da matriz biológica, injetou-se, reiteradamente, um extrato proveniente de uma alíquota de amostra de *pool* de plasma, fortificada com os ARAs II no nível de concentração correspondente aos presumíveis LSQs do método bioanalítico. Um extrato proveniente de uma alíquota da mesma amostra de plasma, não fortificada com os ARAs II, também foi injetado.

3.2.2.2. Obtenção dos extratos

Fortificação do plasma

Devido a baixa solubilidade dos ARAs II em água, prepararam-se soluções estoque dos fármacos em MeOH. Todavia, a solução para a fortificação da alíquota de plasma foi preparada por meio da diluição de soluções estoque dos ARAs II em água ultrapura. A proporção de MeOH na solução para fortificação foi inferior a 20%. Na etapa de fortificação, a alíquota de plasma foi transferida para um tubo do tipo eppendorf; fortificada com 5% de solução para fortificação ⁸ e agitada em vórtex. A proporção de MeOH na alíquota de plasma foi inferior a 1%.

⁸ Porcentagem em relação ao volume de plasma.

Acidificação das amostras

Antes de serem submetidas à SPE, a alíquota de plasma fortificada com os ARAs II e a alíquota de plasma não fortificada com os ARAs II (recém-transferida para um tubo do tipo eppendorf) foram acidificadas com ácido fosfórico 1 M, na proporção 1:1; agitadas em vórtex; e centrifugadas a 10.000 x g, sob temperatura de 4 °C, por 5 minutos.

Extração em fase sólida

Para obter os extratos, empregaram-se as condições de extração otimizadas até esta etapa, e selecionaram-se as condições de extração não otimizadas, com base nos maiores valores de recuperação alcançados no estudo preliminar de extração. Dessa forma, empregaram-se 60 mg de BNNTs funcionalizados com grupos C18 no cartucho para SPE; ativou-se a fase sólida com 2 mL de MeOH; condicionou-se o cartucho com 500 µL de tampão fosfato de potássio monobásico anidro 10 mM pH 2; passaram-se as amostras pelo cartucho, sob vácuo de 5 inHg⁹; lavou-se a fase sólida com 250 µL de tampão fosfato de potássio monobásico anidro 10 mM pH 2 e eluíram-se os ARAs II com 2 mL de MeOH. Para a remoção de compostos interferentes fortemente retidos no cartucho, limpou-se a fase sólida com 1 mL de ACN¹⁰. Antes de serem injetados no cromatógrafo, ambos os extratos foram filtrados e transferidos para tubos do tipo *vial*.

3.2.3. Estudo de extração

Para otimizar as variáveis significativas, conduziu-se um estudo de extração da LOS, VAL e IRB de plasma humano. Para isso, empregou-se um PF com ponto central (PC), e utilizou-se a planilha automática do LQTA e o software Statistica versão 10 para a análise dos dados experimentais. As variáveis foram otimizadas visando à obtenção de recuperações adequadas, com o mínimo de compostos interferentes possível.

⁹ Devido à maior viscosidade do plasma, obteve-se uma vazão de, aproximadamente, 0,5 mL/min.

¹⁰ Condição de extração selecionada por meio de análise univariada. Vácuo de 10 inHg (vazão de, aproximadamente, 3,4 mL/min).

3.2.3.1. Variáveis e níveis

Como apenas três variáveis foram estatisticamente significativas, selecionou-se um PF 2³. Para contornar a necessidade da realização de repetições autênticas, incluiu-se um experimento com repetições no centro do planejamento, onde os valores médios dos níveis das variáveis foram empregados (PC). Para permitir a inclusão dos níveis intermediários, ajustaram-se o nível inferior ou superior das variáveis X₄ e X₅ (**Tabela 12**). Segundo a literatura, esse tipo de planejamento minimiza o risco de perder a relação não linear entre os intervalos, uma vez que é possível estimar o grau de curvatura na superfície de resposta. No geral, quando o PC se encontra próximo da região da superfície de resposta considerada como ponto ótimo (PO), a superfície de resposta contém curvatura significativa (TEÓFILO e FERREIRA, 2006).

Tabela 12 – Variáveis e níveis do PF 2³ com PC.

Variável		Nível		
Não codificada	Codificada	Inferior	Médio	Superior
Quantidade de nanosorvente nos cartuchos (mg)	X ₁	50	55	60
Vazão da etapa de introdução da amostra (mL/min) *	X ₄	0,3	0,5	0,7
Proporção de tampão de KH ₂ PO ₄ 10 mM pH 2 e de MeOH no solvente da etapa de lavagem	X ₅	100:0	95:5	90:10

* Vácuo de 2,5 inHg, 5,0 inHg e 7,5 inHg, respectivamente.

3.2.4. Validação do método bioanalítico

O método bioanalítico foi validado conforme o estabelecido na Resolução da Diretoria Colegiada n° 27, de 17 de maio de 2012, da ANVISA; no Guia *Bioanalytical Method Validation - Guidance for Industry* da FDA e no *Guideline on Bioanalytical Method Validation* da Agência Europeia de Medicamentos (EMA - *European Medicines Agency*). Os softwares descritos na **Subseção 3.2.2** do **Capítulo 2**, também foram utilizados para a análise dos dados dos parâmetros da validação bioanalítica.

3.2.4.1. Padronização interna

Por tratar-se de um método bioanalítico com etapa de preparo de amostras, utilizou-se o método de padronização interna. Dessa forma, todas as amostras de plasma fortificadas com os analitos (LOS e VAL) foram, concomitantemente, fortificadas com 205 ng/mL de IRB. As respostas analíticas foram obtidas por meio das razões entre as áreas sob os picos dos analitos e a área sob o pico do PI.

3.2.4.2. Fortificação do plasma

Como supracitado, prepararam-se soluções estoque dos ARAs II em MeOH. Todavia, as soluções para a fortificação das alíquotas de plasma foram preparadas por meio da diluição de soluções estoque dos ARAs II em água ultrapura. A proporção de MeOH nas soluções para fortificação foi inferior ou igual a 20%. Na etapa de fortificação, as alíquotas de plasma foram transferidas para tubos do tipo eppendorf; fortificadas com 25 µL de solução para fortificação e agitadas em vórtex. A proporção de MeOH nas alíquotas de plasma foi inferior ou igual a 1%.

3.2.4.3. Preparo de amostras

Após a etapa de acidificação ¹¹, as alíquotas de plasma fortificadas ou não com os ARAs II foram submetidas à SPE. Nessa etapa, cartuchos contendo 60 mg de BNNTs funcionalizados com grupos C18 foram ativados com 2 mL de MeOH e condicionados com 500 µL de tampão fosfato de potássio monobásico anidro 10 mM pH 2. Após a passagem das amostras pelos cartuchos, sob vazão de, aproximadamente, 0,3 mL/min, lavou-se a fase sólida com 250 µL de mistura de tampão fosfato de potássio monobásico anidro 10 mM pH 2 e MeOH, proporção 90:10, e eluíram-se os ARAs II com 2 mL de MeOH. Para remover os compostos interferentes fortemente retidos nos cartuchos, limpou-se a fase sólida com 1 mL de ACN ¹². Antes de serem injetados no cromatógrafo, os extratos obtidos foram filtrados e transferidos para tubos do tipo *vial*.

¹¹ Conforme descrito na **subseção 3.2.2.2**.

¹² Condições otimizadas no estudo de extração.

3.2.4.4. Parâmetros da validação bioanalítica

Seletividade

A seletividade foi avaliada por meio da análise de seis amostras de plasma provenientes de voluntários sadios distintos; sendo quatro normais, uma lipêmica e uma hemolisada (ANVISA, 2012). Para isso, alíquotas com 500 µL dessas amostras foram submetidas ao preparo de amostras. Os cromatogramas obtidos foram comparados com um cromatograma proveniente da análise de uma alíquota com 500 µL de amostra de *pool* de plasma, fortificada com os ARAs II no nível de concentração correspondente aos LIQs dos analitos. Como a LOS e VAL são, freqüentemente, administradas com outros fármacos anti-hipertensivos, e a ANVISA estabelece a inclusão de outros xenobióticos, como a CAF e a NIC, na avaliação da seletividade; analisou-se também uma alíquota com 500 µL de amostra de *pool* de plasma, fortificada com 150 ng/mL de HCT, 8,5 ng/mL de anlodipino (ANL), 7,5 ng/mL de FEL, 110 ng/mL de NIF, 10 200 ng/mL de NIM, 3500 ng/mL de CAF e 50 ng/mL de NIC¹³ (ANVISA, 2012; EMA, 2011; FDA, 2018).

Limites inferiores de quantificação

Os LIQs foram estabelecidos por meio da análise dos resultados obtidos na determinação das curvas de calibração e dos resultados de precisão e de exatidão do método. Logo, estabeleceram-se as menores concentrações dos analitos capazes de serem quantificadas com precisão e exatidão aceitáveis (ANVISA, 2012). Segundo o guia da EMA e da FDA, recomenda-se que os LIQs sejam, no mínimo, cinco vezes superiores ao ruído da linha de base (EMA, 2011; FDA, 2018).

¹³ Concentrações idênticas às concentrações plasmáticas máximas, no estado de equilíbrio, obtidas após a administração de 25 mg/dia de HCT, 5 mg/dia de ANL, 20 mg/dia de FEL, 10 mg/dia de NIF e 120 mg/dia de NIM; e após a ingestão de 200 mg de CAF e o consumo de um cigarro (BORTEL *et al.*, 1989; CHEN *et al.*, 2012; DEVINENI *et al.*, 2014; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2002; ISAAC e RAND, 1972; LARSSON *et al.*, 1990; WICKHAM e SPRIET, 2018).

Curvas de calibração

Foram construídas três curvas de calibração para cada analito. Cada curva de calibração foi obtida por meio da análise de oito alíquotas com 500 µL de amostra de *pool* de plasma, fortificadas com concentrações decrescentes dos analitos. Uma alíquota da mesma amostra de plasma, não fortificada com os ARAs II, e uma alíquota da mesma amostra de plasma, fortificada apenas com o PI, também foi analisada. As soluções para a fortificação das alíquotas de plasma de cada curva de calibração foram obtidas por meio da diluição de soluções estoque dos ARAs II distintas. Após a obtenção das respostas analíticas, analisou-se a homocedasticidade dos dados utilizando o teste de C de Cochran, plotou-se as curvas de calibração (resposta analítica *versus* concentração) utilizando o MMQ e determinaram-se os desvios das concentrações experimentais em relação às concentrações nominais. Após a avaliação dos R^2 , r , e coeficientes angulares e lineares; avaliou-se a adequabilidade dos modelos matemáticos por meio da análise dos resíduos (ANVISA, 2012; EMA, 2011; FDA, 2018; SOUZA e JUNQUEIRA, 2005).

Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão foram determinadas em uma mesma corrida analítica e em três corridas diferentes, conduzidas em dias não consecutivos¹⁴. Em cada corrida foram analisadas cinco alíquotas com 500 µL de amostra de *pool* de plasma para cada nível de concentração. Os níveis de concentração testados foram LIQs dos analitos, 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) (ANVISA, 2012; EMA, 2011; FDA, 2018). As soluções para a fortificação das alíquotas de plasma de cada corrida foram obtidas por meio da diluição de soluções estoque dos ARAs II distintas (SOUZA e JUNQUEIRA, 2005). A precisão foi expressa como DPR das concentrações experimentais de cada analito em cada nível de concentração, enquanto que a exatidão foi expressa como erro padrão relativo (**Equação 2**).

¹⁴ As corridas II e III foram conduzidas por analistas diferentes.

$$\text{EPR (\%)} = \frac{\text{média das concentrações experimentais} - \text{concentração nominal}}{\text{concentração nominal}} \times 100$$

Equação 2

Efeito residual

A ausência de efeito residual entre injeções (*carry over*) foi avaliada por meio da injeção, em triplicata, de um extrato proveniente de uma alíquota com 500 µL de amostra de *pool* de plasma, não fortificada com os ARAs II; sendo uma injeção antes e duas injeções após a injeção de um extrato proveniente de uma alíquota com 500 µL da mesma amostra de plasma, fortificada com os ARAs II no nível de concentração correspondente aos LSQs dos analitos (ANVISA, 2012; EMA, 2011; FDA, 2018).

Recuperação

Os dados obtidos na avaliação da precisão e da exatidão do método foram utilizados para determinar as recuperações dos ARAs II nos níveis de concentração CQB, CQM e CQA (**Equação 3**). Para obter as áreas sob os picos dos ARAs II correspondentes ao alcance de 100% de recuperação, três extratos provenientes de três alíquotas com 500 µL de amostra de *pool* de plasma foram fortificados antes de serem filtrados e injetados no cromatógrafo¹⁵. As concentrações empregadas foram idênticas às concentrações calculadas do extrato do CQB, CQM e CQA (FDA, 2018).

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{média das áreas sob os picos do ARA II adicionado na matriz}}{\text{área sob o pico do ARA II adicionado no extrato}} \times 100$$

Equação 3

Efeito matriz

A ausência de efeito matriz foi avaliada por meio da injeção de dezesseis extratos fortificados com os ARAs II. Para isso, duas alíquotas com 500 µL de oito amostras de plasma de voluntários sadios distintos; sendo quatro normais, duas lipêmicas e duas hemolisadas; foram submetidas ao preparo de amostras. Antes de serem filtrados e injetados

¹⁵ 1975 µL dos extratos foram fortificados com 25 µL de solução dos ARAs II em MeOH.

no cromatógrafo, cada par de extratos obtido foi fortificado com os ARAs II, considerando as concentrações calculadas do extrato do CQB e CQA, com recuperações de 100% ¹⁶ (ANVISA, 2012). Duas alíquotas de MeOH também foram fortificadas, filtradas e injetadas no cromatógrafo. Os fatores de matriz normalizados por PI de cada amostra de plasma foram calculados conforme a **Equação 4**.

$$\text{FMN} = \frac{\text{resposta analítica do analito adicionado no extrato}}{\text{resposta analítica do analito adicionado no solvente}}$$

Equação 4

3.2.4.5. Estabilidade dos analitos na matriz biológica

Para cada estudo de estabilidade, seis alíquotas com 2 mL de amostra de *pool* de plasma foram fortificadas apenas com os analitos; três no nível de concentração correspondente ao CQB e três no nível de concentração correspondente ao CQA (ANVISA, 2012; EMA, 2011; FDA, 2018). Para isso, as alíquotas foram transferidas para tubos do tipo eppendorf, fortificadas com 50 µL de solução para fortificação e agitadas em vórtex. Após esse procedimento, 1 mL das alíquotas de plasma foram coletados, transferidos para tubos do tipo eppendorf, fortificados com 25 µL de solução para fortificação contendo apenas o PI e agitados em vórtex. 500 µL dessas amostras foram submetidos ao preparo de amostras. Os extratos obtidos foram filtrados, transferidos para tubos do tipo *vial* e injetados no cromatógrafo. O volume restante das alíquotas de plasma fortificadas com os analitos (i.e. sem a adição de PI e sem a realização da etapa de preparo de amostras) foi submetido às condições de seu respectivo estudo de estabilidade.

Estabilidade de longa duração

As alíquotas de plasma fortificadas com os analitos foram armazenadas em ultrafreezer, sob temperatura de -70 °C, por 30 dias e, em seguida, descongeladas à temperatura ambiente e fortificadas com o PI. 500 µL dessas amostras foram submetidos ao

¹⁶ 1975 µL dos extratos foram fortificados com 25 µL de solução dos ARAs II em MeOH.

preparo de amostras. Os extratos obtidos foram filtrados, transferidos para tubos do tipo *vial* e injetados no cromatógrafo.

Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

As alíquotas de plasma fortificadas com os analitos foram congeladas em temperatura de -70 °C por 24 horas e, em seguida, descongeladas à temperatura ambiente. Após repetir esse procedimento três vezes, fortificaram-se as alíquotas com o PI. 500 µL dessas amostras foram submetidos ao preparo de amostras. Os extratos obtidos foram filtrados, transferidos para tubos do tipo *vial* e injetados no cromatógrafo.

Estabilidade de curta duração

As alíquotas de plasma fortificadas com os analitos foram mantidas sobre a bancada do laboratório, sob temperatura de 22 °C, por 4 horas. Após esse tempo de espera, fortificaram-se as alíquotas com o PI. 500 µL dessas amostras foram submetidos ao preparo de amostras. Os extratos obtidos foram filtrados, transferidos para tubos do tipo *vial* e injetados no cromatógrafo.

Estabilidade pós-processamento

As alíquotas de plasma fortificadas com os analitos foram prontamente fortificadas com o PI. 500 µL dessas amostras foram submetidos ao preparo de amostras. Os extratos obtidos foram filtrados e transferidos para tubos do tipo *vial*. Os tubos foram lacrados, de modo a impedir a evaporação do solvente e, em seguida, foram armazenados no amostrador automático, com controle da temperatura (25 ± 3 °C), por 24 horas. Após esse tempo de espera, removeram-se os lacres dos tubos e injetaram-se os extratos no cromatógrafo.

3.2.5. Aplicação do método bioanalítico

Após a validação do método bioanalítico, aplicou-se o método na análise de três amostras de plasma de voluntários hipertensos (do sexo masculino e feminino) sob tratamento medicamentoso com LOS.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. FORTIFICAÇÃO DO PLASMA

Conforme as boas práticas para a fortificação de matrizes biológicas, adicionou-se 5% de solução para fortificação em relação ao volume das alíquotas de plasma; de modo a impedir a alteração da matriz e, portanto, obter amostras fortificadas, tão próximas quanto possível, de amostras “reais”¹⁷ (NOWATZKE e WOOLF, 2007). A proporção de MeOH nas soluções para fortificação foi controlada com o objetivo de obter amostras fortificadas com, no máximo, 1% de MeOH. Como discutido no estudo preliminar de extração, essa conduta é importante para impedir que o MeOH, presente nas amostras, afete a extração dos ARAs II na etapa de SPE.

4.2. ACIDIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

A utilização isolada de técnicas de SPE para a extração de ARAs II em plasma humano, geralmente, produz baixas recuperações, devido ao alto nível de ligação desses fármacos à proteínas plasmáticas (SOUZA *et al.*, 2020). À vista disso, soluções de ácido fosfórico são, freqüentemente, utilizadas, na proporção 1:1; para reduzir a viscosidade do plasma e interromper as interações desses fármacos com as proteínas (WATERS, 2018). Segundo FERREIRÓS *et al.* (2006) e GONZÁLEZ *et al.* (2002), na etapa de acidificação das amostras de plasma com ácido fosfórico 1 M, deve-se centrifugar as amostras a 10.000 x g, sob temperatura de 4 °C, por 5 minutos. Neste estudo, além de possibilitar a recuperação adequada dos ARAs II, devido à interrupção das interações do tipo fármaco-proteína, a etapa de acidificação favoreceu a formação, em elevada proporção, de espécies ionizadas ou não ionizadas dos fármacos nas amostras; em razão da protonação do grupo funcional imidazol, presente na LOS e IRB, porém, ausente na VAL. Graças à estabilidade química dos BNNTs, a utilização de amostras acidificadas (com pH inferior a 2), não compromete a estrutura do nanosorvente (FERREIRA *et al.*, 2015). Por outro lado, o acerto do pH das amostras para valores superiores a 2 é imprescindível para o uso de fases sólidas à base de sílica (JARDIM, 2010).

¹⁷ Amostras de plasma provenientes de indivíduos hipertensos sob tratamento medicamentoso com LOS ou VAL.

4.3. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Apenas o gradiente do método cromatográfico apresentado no **Capítulo 2** foi otimizado. Os ARAs II e compostos interferentes foram devidamente separados empregando um gradiente linear com inclinação de 0,67% de B/min (0 – 12 min: 65% → 73% de B). Antes de executar o gradiente reverso, utilizou-se uma maior proporção de solvente orgânico na FM para promover a eluição de compostos interferentes fortemente retidos pela FE (12 – 13 min: 73% → 100% de B; 13 – 16 min: 100% de B). Após a execução do gradiente reverso, adicionou-se a etapa de reequilíbrio do sistema e concluiu-se a corrida em 20 minutos (16 – 17 min: 100% → 65% de B; 17 – 20 min: 65% de B)

4.4. ESTUDO DE EXTRAÇÃO

4.4.1. Ajuste das condições fixas

Tendo em vista a faixa de trabalho do método bioanalítico, as recuperações obtidas no estudo preliminar de extração, o volume de eluente e os LIQs do método analítico, ajustou-se o volume de amostra com o objetivo de obter LIQs próximos aos relatados na literatura (**Quadro 6**). As concentrações das amostras (i.e. das alíquotas com 500 µL de amostra de *pool* de plasma, fortificadas com os ARAs II) foram ajustadas com base no nível de concentração correspondente aos presumíveis LSQs do método bioanalítico. Para promover a remoção de interferentes fortemente retidos pela fase sólida, utilizou-se o volume de ACN selecionado na etapa de otimização do método cromatográfico. O vácuo utilizado na etapa de lavagem foi ajustado para 2,5 inHg (vazão de 0,5 mL/min).

Quadro 6 – Condições fixas do estudo de extração.

Etapa da SPE	Condição fixa	Descrição
Ativação ^a	Volume e tipo de solvente	2 mL de MeOH
Condicionamento ^a		500 µL de tampão de KH ₂ PO ₄ 10 mM pH 2
Introdução da amostra	Concentração da amostra	1200 ng/mL de LOS, 1700 ng/mL de VAL e 205 ng/mL de IRB
	Volume de amostra	500 µL
	Volume de H ₃ PO ₄ 1 M	

Continua

Continuação

Lavagem	Volume de solvente	250 µL
Eluição ^a	Volume e tipo de solvente	2 mL de MeOH
Limpeza ^a		1 mL de ACN

Final

^a Condição otimizada.

4.4.2. Análise dos dados experimentais

A matriz, resultados de recuperação e efeitos dos fatores de primeira, segunda e terceira ordem do PF 2³ com PC são apresentados nas **Tabelas 13 e 14**. Conforme observado no estudo preliminar de extração, a ordem dos valores de recuperação foi LOS < IRB < VAL, exceto nos ensaios presentes na região da superfície de resposta correspondente ao PO. Mesmo apresentando um domínio experimental diferente, o estudo de extração também mostrou que os fatores de segunda e terceira ordem não são significativos, e que a recuperação da VAL foi menos impactada pela redução da quantidade de nanosorbente nos cartuchos, pelo aumento da vazão da etapa de introdução da amostra e pelo aumento da proporção de MeOH no solvente da etapa de lavagem.

Tabela 13 – Matriz e resultados de recuperação do PF 2³ com PC.

Ensaio	Variável ^a			Recuperação (%) ^b		
	X ₁	X ₄	X ₅	LOS	VAL	IRB
1	-1	-1	-1	85,36	91,39	88,54
2	1	-1	-1	91,49	92,42	90,73
3	-1	1	-1	70,52	81,62	75,11
4	1	1	-1	73,84	82,47	77,92
5	-1	-1	1	82,27	86,83	84,86
6	1	-1	1	82,61	92,25	87,40
7	-1	1	1	63,77	78,22	70,42
8	1	1	1	70,24	81,30	75,36
9	0	0	0	85,38	88,49	86,09
10	0	0	0	84,23	90,12	84,94
11	0	0	0	83,98	88,28	87,01

^a O nível intermediário foi codificado como 0.^b Os maiores valores de recuperação são apresentados em negrito.

Tabela 14 – Efeitos dos fatores do PF 2³ com PC.

Fatores	Efeitos ^a		
	LOS	VAL	IRB
1	4,07	2,60	3,12
2	-15,84	-9,82	-13,18
3	-5,58	-2,33	-3,57
12	0,83	-0,63	0,75
13	-0,66	1,66	0,62
23	0,41	0,04	-0,06
123	2,23	-0,54	0,44

^a Os efeitos significativos são apresentados em negrito. Foi utilizado um nível de significância de 5%.

Pode-se observar na **Tabela 15** que houve curvatura significativa na superfície de resposta, o que indica que o PC encontra-se próximo do PO, responsável pelos maiores valores de recuperação dos ARAs II. Caso o objetivo fosse determinar condições de extração para obter valores específicos de recuperação, seria necessário ampliar o PF por meio da inclusão de pontos axiais, formando um planejamento composto central, também conhecido como planejamento em estrela, capaz de fornecer os níveis adicionais cruciais para a construção de modelos matemáticos quadráticos (BREITKREITZ *et al.*, 2014). Porém, como o objetivo do estudo é determinar condições de extração capazes de produzir recuperações adequadas, com o mínimo de compostos interferentes possível, selecionaram-se as condições do ensaio 6 (**Quadro 7**) como ponto ideal (PIL). Os gráficos de contorno dos ARAs II são apresentados na **Figura 26**. As regiões representadas pelas áreas em vermelho indicam altos valores de recuperação.

Tabela 15 – Resultados da ANOVA.

Resultado	ARA II		
	LOS	VAL	IRB
Teste F da regressão ^a	F _{CAL} = 2,41	F _{CAL} = 4,05	F _{CAL} = 3,33
	F _{TAB} = 8,89	F _{TAB} = 8,89	F _{TAB} = 8,89
Teste F da falta de ajuste ^b	F _{CAL} = 192,73	F _{CAL} = 21,35	F _{CAL} = 45,21
	F _{TAB} = 18,51	F _{TAB} = 18,51	F _{TAB} = 18,51

^a Se F_{CAL} < F_{TAB} a regressão linear não é significativa.

^a Se F_{CAL} > F_{TAB} o modelo matemático linear não ajusta-se adequadamente aos dados experimentais.

Foi utilizado um nível de significância de 5%.

Quadro 7 – Condições do método de extração.

Condição	Descrição
Quantidade de nanosorvente nos cartuchos	60 mg
Volume e tipo de solvente para ativação da fase sólida	2 mL de MeOH
Vazão da etapa de ativação da fase sólida ^a	2,1 mL/min
Volume e tipo de solvente para condicionamento dos cartuchos	500 µL de tampão de KH ₂ PO ₄ 10 mM pH 2
Vazão da etapa de condicionamento dos cartuchos ^a	1,3 mL/min
Volume de amostra e de H ₃ PO ₄ 1 M	500 µL
Vazão da etapa de introdução da amostra ^b	0,3 mL/min
Volume e tipo de solvente para lavagem da fase sólida	250 µL de mistura de tampão de KH ₂ PO ₄ 10 mM pH 2 e MeOH (90:10)
Vazão da etapa de lavagem da fase sólida ^b	0,5 mL/min
Volume e tipo de solvente para eluição dos ARAs II	2 mL de MeOH
Vazão da etapa de eluição dos ARAs II ^a	2,1 mL/min
Volume e tipo de solvente para limpeza dos cartuchos	1 mL de ACN
Vazão da etapa de limpeza dos cartuchos ^a	3,4 mL/min

^a Vazão de 10 inHg. ^b Vazão de 2,5 inHg.

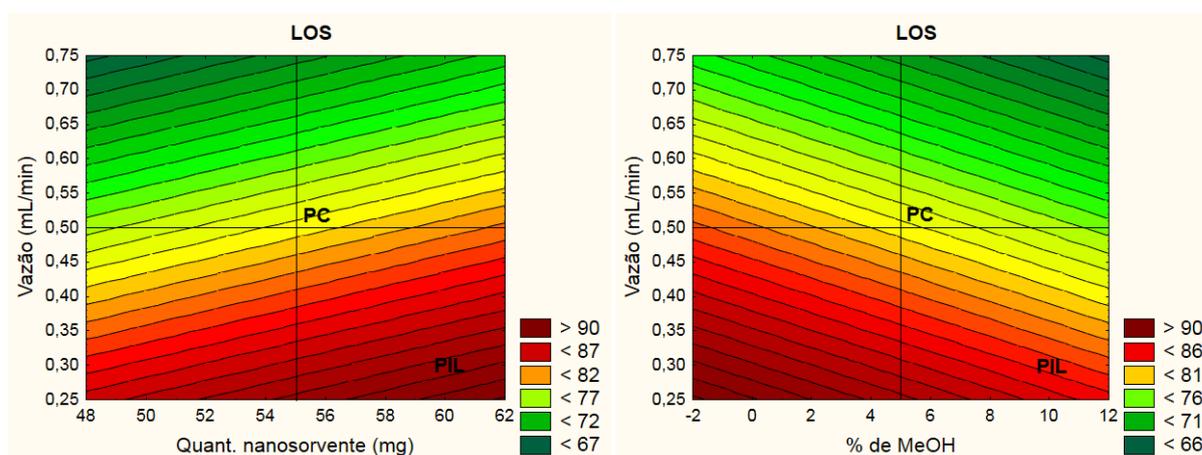
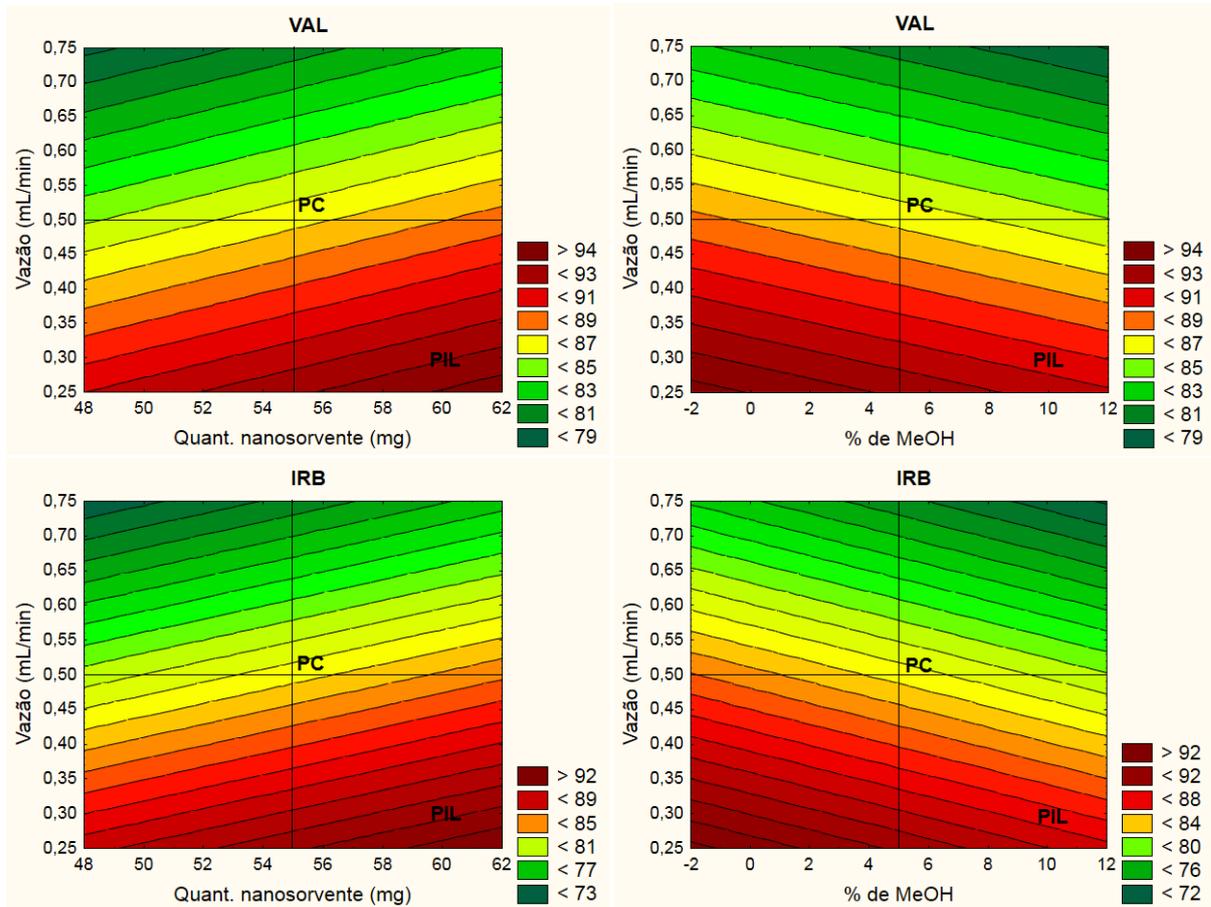
Figura 26 – Gráficos de contorno dos ARAs II (continua).


Figura 26 – Gráficos de contorno dos ARAs II (continuação).



4.5. VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO

4.5.1. Padronização interna

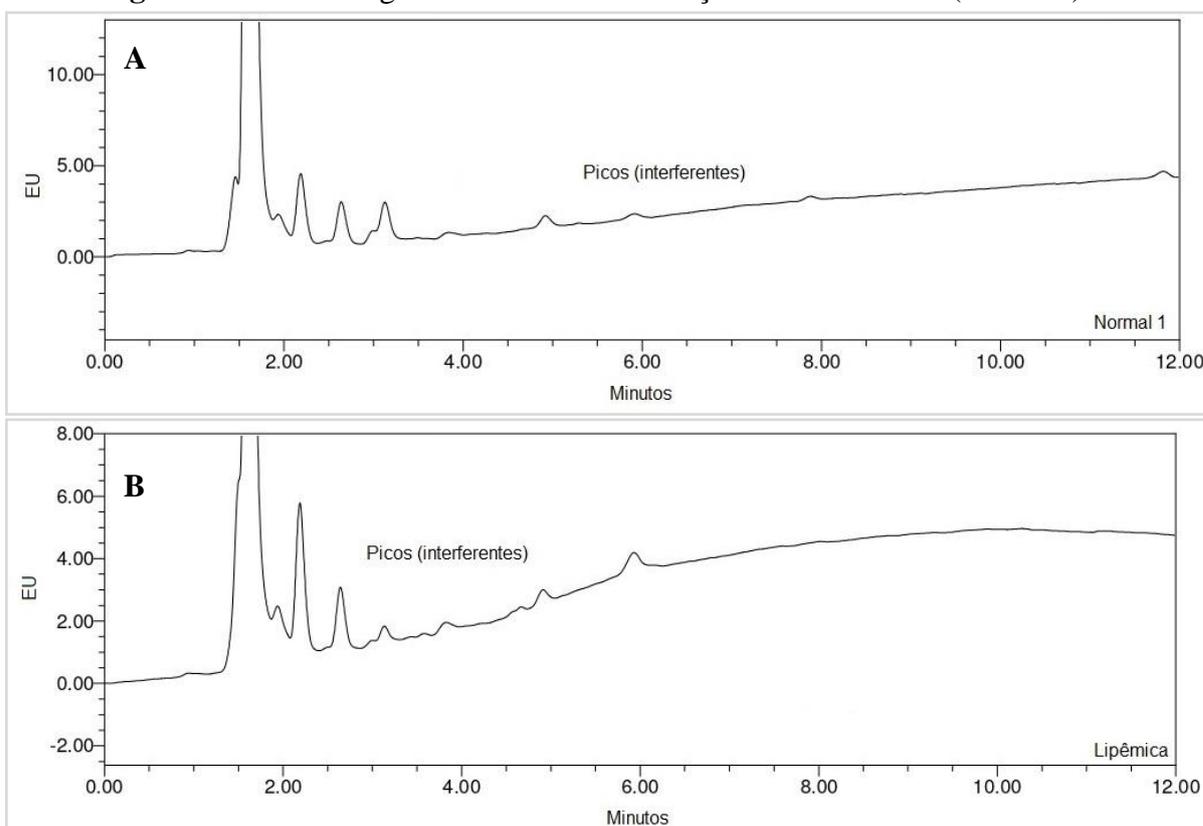
Escolher o método de padronização adequado é essencial para qualquer análise quantitativa. Dentre os métodos de padronização empregados têm-se a padronização interna, a padronização por adição de padrão e a padronização externa. A padronização interna, ou seja, a adição de uma quantidade constante de uma substância química conhecida às amostras “branco” e “reais”, foi empregada neste estudo por ser capaz de corrigir erros relacionados à perda dos analitos, devido à manipulação das amostras. Logo, esse método é considerado ideal para análises em matrizes biológicas, nas quais, na maioria das vezes, não se trabalha com a injeção direta das amostras no sistema cromatográfico (CASSIANO *et al.*, 2009).

4.5.2. Parâmetros da validação bioanalítica

4.5.2.1. Seletividade

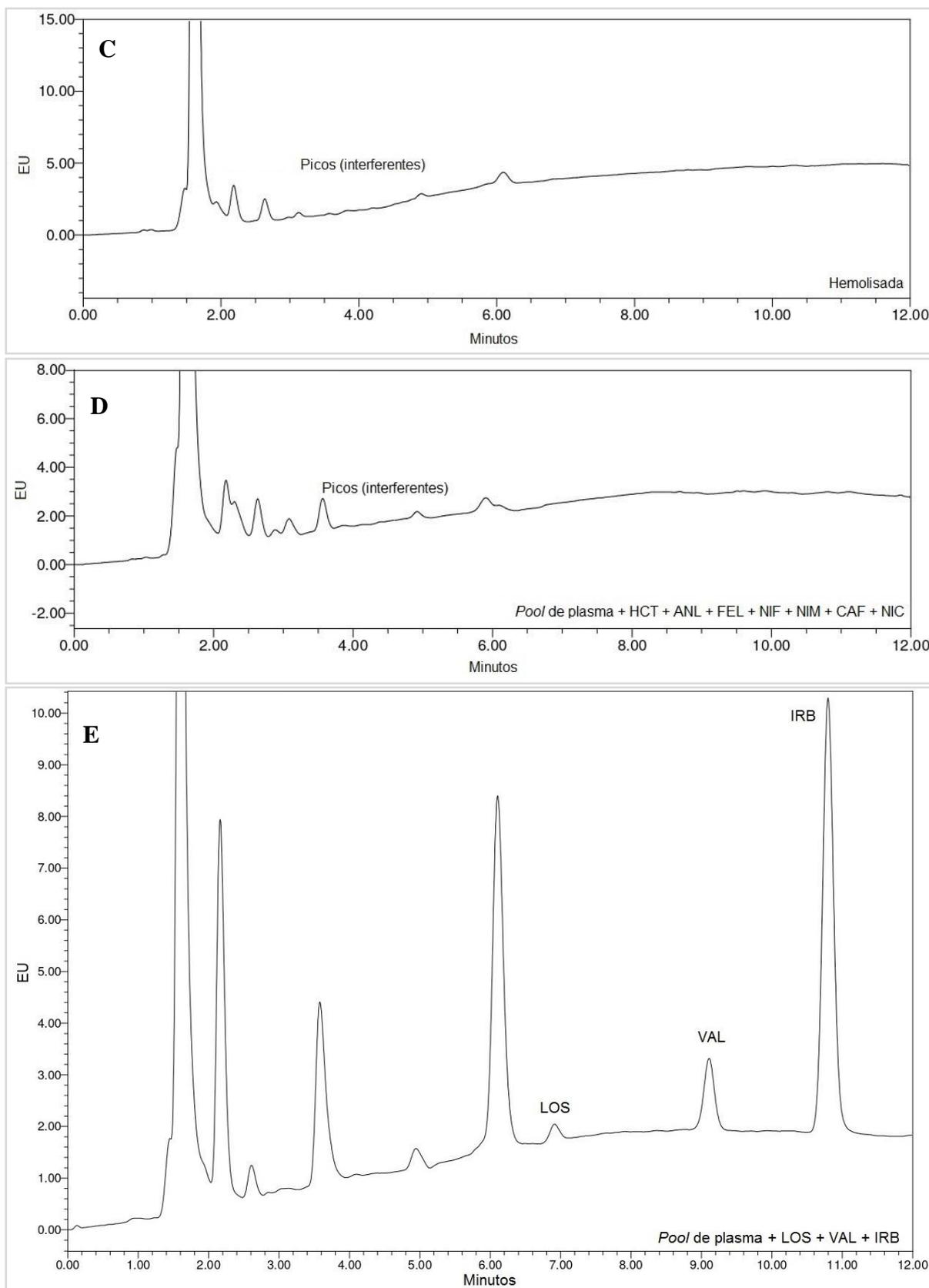
Os cromatogramas provenientes da análise das amostras de plasma de voluntários sadios distintos são apresentados nas **Figuras 27A a 27C**. Por meio da comparação desses cromatogramas com o cromatograma proveniente da análise de *pool* de plasma fortificado com os ARAs II no nível de concentração correspondente aos LIQs dos analitos (**Figura 27E**), constatou-se que nenhum composto interferente coeluiu com os compostos de interesse. A presença de picos de compostos interferentes nos mesmos tempos de retenção dos analitos e/ou PI só é aceitável quando a precisão e a exatidão do método não são comprometidas. Segundo a ANVISA, caso haja coeluição, a área sob o pico do composto interferente deve ser inferior a 20% da área sob o pico do analito ou inferior a 5% da área sob o pico do PI (ANVISA, 2012). Como não se observou pico adicional no cromatograma proveniente da análise de *pool* de plasma fortificado com os xenobióticos (**Figura 27D**), considerou-se o método seletivo (EMA, 2011; FDA, 2018).

Figura 27 – Cromatogramas obtidos na avaliação da seletividade (continua).¹⁸



¹⁸ O cromatograma A é representativo das amostras de plasma normais.

Figura 27 – Cromatogramas obtidos na avaliação da seletividade (continuação).



Em que: os tempos de retenção dos ARAs II foram 6,89 min, 9,08 min e 10,74 min. Os parâmetros de adequação do sistema cromatográfico foram apropriados, de acordo com os critérios de aceitação descritos no **Capítulo 2**. Esses parâmetros foram monitorados em todos os ensaios da validação bioanalítica.

4.5.2.2. Limites inferiores de quantificação

Os LIQs obtidos foram 50 ng/mL para a LOS e 20 ng/mL para a VAL. Valores semelhantes foram encontrados na literatura. Por exemplo, GONZÁLEZ *et al.* (2002), alcançaram LIQs de 16 ng/mL para a LOS e 50 ng/mL para a VAL, também utilizando detector fluorimétrico. Os resultados da avaliação da precisão e da exatidão do método são apresentados na **Subseção 4.5.2.4.**

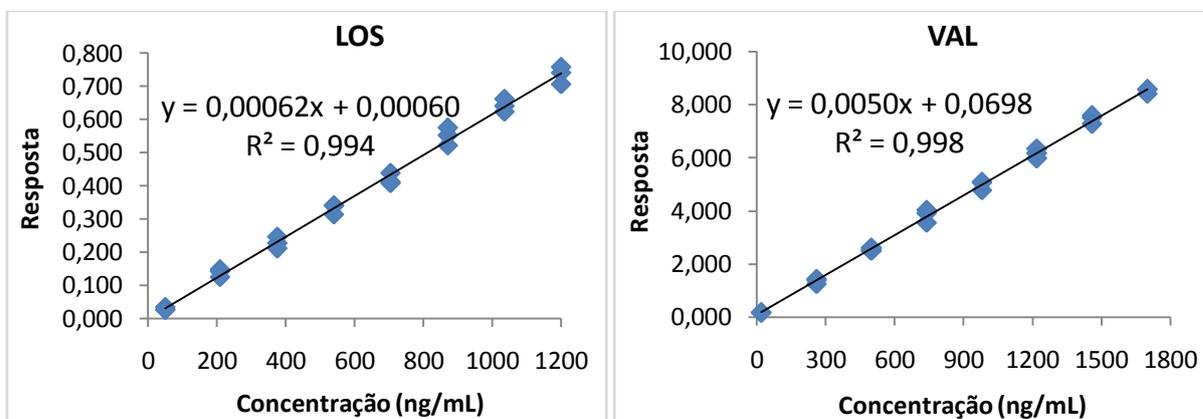
4.5.2.3. Curvas de calibração

Pode-se observar na **Tabela 16** que as respostas analíticas foram consideradas homocedásticas pelo teste C de Cochran, com nível de significância de 5%. As curvas de calibração obtidas por meio do MMQO e modelo de regressão linear são apresentadas na **Figura 28**. As faixas de concentração compreenderam os LIQs dos analitos e as concentrações plasmáticas máximas, obtidas no estado de equilíbrio, após a administração de dose máxima da LOS e dose usual da VAL (LEIDIG *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 2019).

Tabela 16 – Resultados da avaliação da homocedasticidade das respostas analíticas.

Teste	ARA II	
	LOS	VAL
C de Cochran	$C_{CAL} = 0,26$	$C_{CAL} = 0,35$
	$C_{TAB} = 0,52$	$C_{TAB} = 0,52$

Figura 28 – Curvas de calibração dos analitos.



Em que: a igualdade das regressões foi constatada pelo teste de Chow (valores-p de 0,12 e 0,38, respectivamente).

Todos os níveis de concentração das curvas de calibração foram aprovados, uma vez que o nível de concentração correspondente aos LIQs dos analitos teve desvios das concentrações experimentais menores ou iguais a 20% em relação à concentração nominal, e os demais níveis de concentração tiveram desvios das concentrações experimentais menores ou iguais a 15% em relação às concentrações nominais (**Tabela 17**) (ANVISA, 2012; EMA, 2011; FDA, 2018).

Tabela 17 – Desvio das concentrações experimentais em relação às concentrações nominais.

Nível	LOS			VAL		
	Concentração nominal (ng/mL)	Concentração experimental (ng/mL)	Desvio (%)	Concentração nominal (ng/mL)	Concentração experimental (ng/mL)	Desvio (%)
I	50	42,84	-14,32	20	17,58	-12,10
		56,04	12,08		22,63	13,16
		41,49	-17,03		17,02	-14,92
II	210	239,99	14,28	260	271,38	4,38
		229,83	9,44		234,95	-9,63
		201,36	-4,11		263,72	1,43
III	375	367,27	-2,06	500	493,59	-1,28
		398,35	6,23		483,88	-3,22
		341,67	-8,89		507,92	1,58
IV	540	508,41	-5,85	740	694,13	-6,20
		553,91	2,58		767,19	3,67
		551,98	2,22		789,76	6,72
V	705	662,36	-6,05	980	940,59	-4,02
		711,84	0,97		996,25	1,66
		666,95	-5,40		1004,11	2,46
VI	870	895,66	2,95	1220	1219,85	-0,01
		933,08	7,25		1252,66	2,68
		846,32	-2,72		1177,73	-3,47
VII	1035	1040,61	0,54	1460	1488,59	1,96
		1012,39	-2,18		1499,23	2,69
		1074,91	3,86		1436,61	-1,60
VIII	1200	1201,70	0,14	1700	1695,99	-0,24
		1145,96	-4,50		1664,86	-2,07
		1230,09	2,51		1699,76	-0,01

Em que: o nível de concentração I corresponde aos LIQs dos analitos e o nível VIII aos LSQs.

Os R^2 das curvas de calibração são apresentados na **Figura 28**. Os r , resultados do teste F da ANOVA e resultados do teste T, são apresentados na **Tabela 18**. Tanto os R^2

quanto os r foram superiores a 0,99. Assim como no tratamento estatístico da validação do método analítico, utilizaram-se os testes F e T para avaliar os coeficientes angulares e lineares; além de utilizar o teste de Ryan-Joiner, o teste de Durbin-Watson e o teste de Brown-Forsythe, para avaliar a normalidade, independência e homocedasticidade dos resíduos (**Tabela 19**). As regressões foram significativas e os interceptos com o eixo y foram estatisticamente iguais a zero, com nível de significância de 5%. Como os resíduos tiveram distribuição normal, e foram independentes e homocedásticos, consideraram-se os modelos matemáticos adequados para explicar a relação entre as variáveis. A dispersão aleatória dos resíduos pode ser observada nos gráficos dos resíduos em função dos valores previstos de y (**Figura 29**). Nenhum valor extremo foi encontrado pelo teste de Grubbs (ANVISA, 2017b; SOUZA e JUNQUEIRA, 2005).

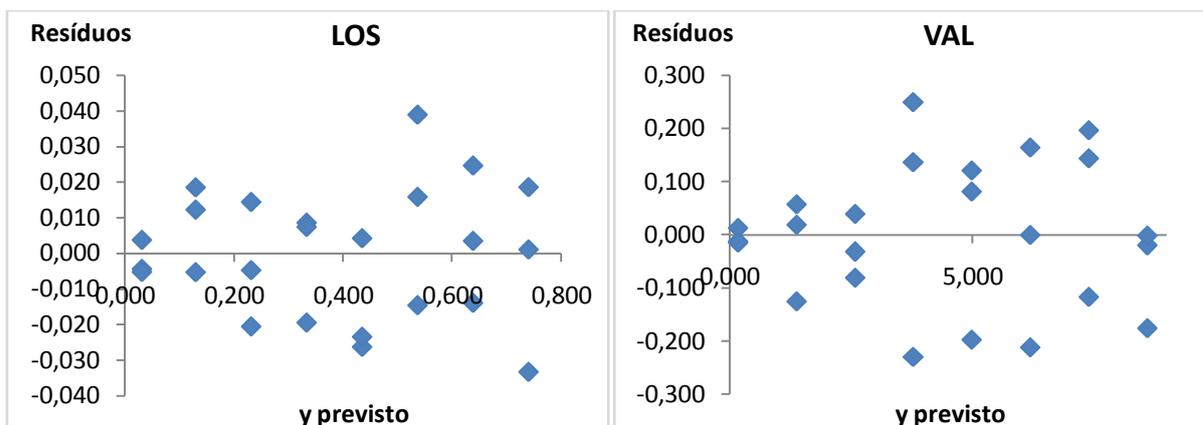
Tabela 18 – Valores dos r e resultados dos testes F e T.

Resultado	ARA II	
	LOS	VAL
r	0,997	0,999
Teste F	$F_{CAL} = 3940,58$ $F_{TAB} = 4,30$	$F_{CAL} = 10053,55$ $F_{TAB} = 4,30$
Teste T	p-valor = 0,93	p-valor = 0,19

Tabela 19 – Resultados da análise dos resíduos.

Teste	ARA II	
	LOS	VAL
Grubbs	$Z_{CAL} = 2,19$	$Z_{CAL} = 1,89$
	$Z_{TAB} = 2,64$	$Z_{TAB} = 2,64$
Ryan-Joiner	$R_{CAL} = 0,99$	$R_{CAL} = 0,99$
	$R_{TAB} = 0,96$	$R_{TAB} = 0,96$
Durbin-Watson	$d = 2,45$	$d = 2,64$ *
	$d_U = 1,45$	$d_U = 1,45$
	$4-d_U = 2,55$	$4-d_U = 2,55$
Brown-Forsythe	$F_{CAL} = 3,58$	$F_{CAL} = 1,12$
	$F_{TAB} = 4,30$	$F_{TAB} = 4,30$

* Resultado inconclusivo, com nível de significância de 5,0%. Todavia, os resíduos foram considerados independentes, com nível de significância de 2,5%.

Figura 29 – Gráficos dos resíduos em função dos valores previstos de y.

4.5.2.4. Precisão e exatidão

Conforme recomendado pela ANVISA, as concentrações do CQB foram até três vezes superiores às concentrações do nível correspondente aos LIQs dos analitos, e as concentrações do CQM e CQA foram próximas ao centro das curvas de calibração e entre 75 - 85% das concentrações do nível correspondente aos LSQs dos analitos, respectivamente (ANVISA, 2012). As concentrações do CQD foram superiores às concentrações plasmáticas máximas, obtidas no estado de equilíbrio, após a administração de dose máxima da LOS e VAL ¹⁹ (BHAD *et al.*, 2011; PARK *et al.*, 2019). Na avaliação da precisão e da exatidão no CQD, fortificaram-se cinco alíquotas com 500 µL de amostra de *pool* de plasma com 2000 ng/mL de LOS e 16 000 ng/mL de VAL, para cada corrida analítica. As alíquotas foram diluídas, na proporção 1:10, com *pool* de plasma e, em seguida, agitadas em vórtex. 500 µL dessas amostras foram coletados e submetidos ao preparo de amostras. Os DPRs das respostas analíticas foram inferiores a 12% e os EPRs permaneceram entre $\pm 11\%$ (Tabelas 20 e 21). Segundo os guias de validação, DPRs iguais ou inferiores a 20% e EPRs entre $\pm 20\%$ para o nível de concentração correspondente aos LIQs dos analitos, e DPRs iguais ou inferiores a 15% e EPRs entre $\pm 15\%$ para os demais níveis de concentração, são considerados aceitáveis (ANVISA, 2012; EMA, 2011; FDA, 2018).

¹⁹ 100 mg/dia de LOS e 320 mg/dia de VAL.

Tabela 20 – Resultados da precisão intracorrída e intercorrídas.

Nível	Corrída	LOS			VAL		
		Concentração nominal (ng/mL)	Resposta analítica		Concentração nominal (ng/mL)	Resposta analítica	
			DPR (%) (n=5)	DPR (%) (n=15)		DPR (%) (n=5)	DPR (%) (n=15)
LIQ	I		11,82			10,60	
	II	50	11,57	11,74	20	10,94	10,90
	III		11,74			11,73	
CQB	I		6,04			10,28	
	II	130	7,21	5,95	60	8,66	8,78
	III		5,26			9,04	
CQM	I		5,30			4,10	
	II	625	6,54	5,62	860	4,89	4,14
	III		6,77			3,59	
CQA	I		3,67			1,78	
	II	955	3,47	3,58	1340	3,44	2,46
	III		1,87			1,94	
CQD	I		6,01			3,04	
	II	2000	3,03	6,18	16 000	1,93	3,74
	III		5,75			3,83	

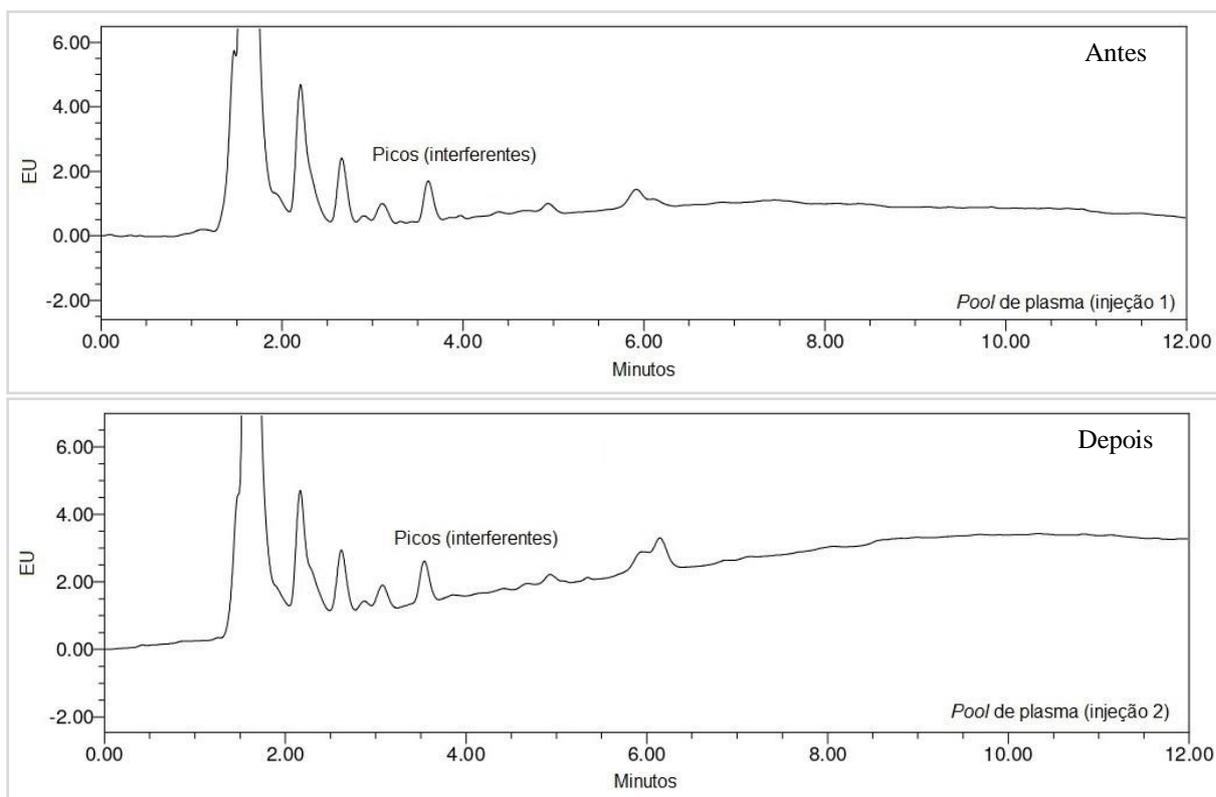
Tabela 21 – Resultados da exatidão intracorrída e intercorrídas.

Nível	Corrída	LOS			VAL		
		Concentração nominal (ng/mL)	EPR (%)		Concentração nominal (ng/mL)	EPR (%)	
			EPR (%) (n=5)	EPR (%) (n=15)		EPR (%) (n=5)	EPR (%) (n=15)
LIQ	I		7,90			-9,93	
	II	50	10,81	8,58	20	-4,54	-3,55
	III		7,04			3,80	
CQB	I		-7,46			3,06	
	II	130	-5,79	-6,18	60	7,70	5,74
	III		-5,29			6,47	
CQM	I		3,75			-2,61	
	II	625	-6,83	-2,18	860	-5,42	-4,41
	III		-3,47			-5,20	
CQA	I		-4,90			-2,05	
	II	955	-0,44	-2,54	1340	-0,12	-1,10
	III		-2,28			-1,13	
CQD	I		7,93			4,43	
	II	2000	3,74	4,95	16 000	1,61	1,48
	III		3,18			-1,61	

4.5.2.5. Efeito residual

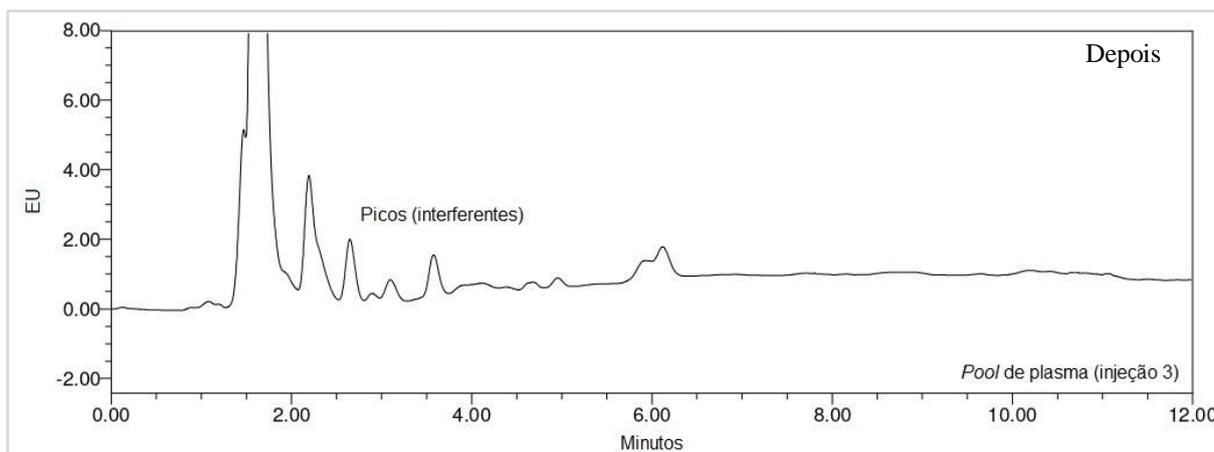
O efeito residual é caracterizado pelo aparecimento de sinal analítico ou aumento do sinal analítico nos tempos de retenção dos compostos de interesse; causado por contaminação oriunda de amostras precedentes (ANVISA, 2012). Segundo HUGHES *et al.* (2007), o efeito residual, geralmente, está relacionado à limpeza inadequada do injetor automático ou à ausência da etapa de lavagem da coluna analítica²⁰. Os cromatogramas do extrato proveniente de *pool* de plasma não fortificado com os ARAs II; injetado uma vez antes e duas vezes após a injeção do extrato proveniente da mesma amostra de plasma fortificada com os ARAs II no nível de concentração correspondente aos LSQs dos analitos; são apresentados na **Figura 30**. Por meio da comparação desses cromatogramas, constatou-se a ausência de contaminação intercorridas cromatográficas (ANVISA, 2012; EMA, 2011; FDA, 2018).

Figura 30 – Cromatogramas obtidos na avaliação do efeito residual (continua).



²⁰ Utilizou-se mistura de água ultrapura e MeOH, proporção 90:10, para a limpeza do autoinjeter.

Figura 30 – Cromatogramas obtidos na avaliação do efeito residual (continuação).



4.5.2.6. Recuperação

A recuperação avalia a eficiência do método de preparo de amostras (CASSIANO *et al.*, 2009). Conforme estabelecido pela FDA, esse parâmetro foi calculado utilizando as médias das áreas sob os picos dos ARAs II adicionados na matriz biológica e as áreas sob os picos dos ARAs II adicionados no extrato (FDA, 2018). Embora altos valores de recuperação sejam desejáveis para melhorar a detectabilidade do método, não é necessária a obtenção de recuperações iguais a 100% (CASSIANO *et al.*, 2009). Pode-se observar na **Tabela 22** que as recuperações obtidas nos três níveis de concentração testados foram inferiores a 100%, porém reprodutivas.

Tabela 22 – Recuperações dos ARAs II no CQB, CQM e CQA.

LOS				
Nível	Concentração nominal (ng/mL)	Média das áreas do ARA II adicionado na matriz (n=15)	Área do ARA II adicionado no extrato	Recuperação (%)
CQB	130	77729,60	95088	81,74
CQM	625	392244,53	471952	83,11
CQA	955	586122,33	711781	82,35

Continua

Continuação

VAL				
Nível	Concentração nominal (ng/mL)	Média das áreas do ARA II adicionado na matriz (n=15)	Área do ARA II adicionado no extrato	Recuperação (%)
CQB	60	397904,40	431246	92,27
CQM	860	4365151,40	4687230	93,13
CQA	1340	6865096,80	7392375	92,87
IRB				
Nível	Concentração nominal (ng/mL)	Média das áreas do ARA II adicionado na matriz (n=45)	Média das áreas do ARA II adicionado no extrato (n=3)	Recuperação (%)
Todos	205	1032778	1191538	86,68

Final

4.5.2.7. Efeito matriz

A investigação do efeito matriz avalia fenômenos de diminuição e/ou ampliação dos sinais analíticos, causados por compostos interferentes procedentes da matriz biológica, que coeluem com os compostos de interesse, mas não são monitorados pelo método (CASSIANO *et al.*, 2009). Conforme estabelecido pela ANVISA e EMA, o DPR dos FMNs de cada nível de concentração foi inferior a 15% (**Tabela 23**). Logo, não se observou efeito matriz (ANVISA, 2012; EMA, 2011).

Tabela 23 – DPR dos FMNs de cada nível de concentração.

Amostra de plasma	FMN			
	LOS		VAL	
	CQB	CQA	CQB	CQA
Normal 1	0,97	1,03	1,00	0,99
Normal 2	0,93	1,07	0,87	1,07
Normal 3	1,03	1,03	1,09	1,11
Normal 4	1,09	0,98	1,05	1,02
Lipêmica 1	0,93	0,90	0,90	0,98
Lipêmica 2	0,98	1,01	0,98	1,08
Hemolisada 1	1,06	1,05	1,02	1,01
Hemolisada 2	1,14	1,01	1,11	0,98
DPR (%)	7,51	5,23	8,50	4,61

4.5.3. Estabilidade dos analitos na matriz biológica

Os resultados dos estudos de estabilidade são apresentados nas **Tabelas 24 e 25**. Nenhuma degradação significativa dos analitos foi observada, uma vez que os desvios das médias das concentrações experimentais em relação às concentrações nominais foram inferiores a 15% (ANVISA, 2012). Resultados semelhantes foram encontrados na literatura. GONZÁLEZ *et al.* (2002), por exemplo, descreveram que a LOS e VAL são estáveis em plasma humano por, pelo menos, quatro meses, sob temperatura de -20 °C; e suportam, no mínimo, quatro ciclos de congelamento e descongelamento. Além disso, enfatizou-se que os analitos são estáveis em FM (mistura de tampão acetato 5 mM pH 4 e ACN, proporção 70:30) por, pelo menos, 24 horas de armazenamento no amostrador automático, sem o controle da temperatura.

Tabela 24 – Resultados dos estudos de estabilidade da LOS.

ESTABILIDADE DE LONGA DURAÇÃO				
Resultado	CQB		CQA	
	Amostra recém-preparada	Amostra submetida ao estudo	Amostra recém-preparada	Amostra submetida ao estudo
Média das concentrações (ng/mL) (n=3)	124,85	118,06	948,31	895,76
Desvio em relação à concentração nominal (%)	-3,96	-9,18	-0,70	-6,20
Variação	- 5,22		- 5,50	
ESTABILIDADE APÓS CICLOS DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO				
Resultado	CQB		CQA	
	Amostra recém-preparada	Amostra submetida ao estudo	Amostra recém-preparada	Amostra submetida ao estudo
Média das concentrações (ng/mL) (n=3)	128,08	117,67	958,23	880,24
Desvio em relação à concentração nominal (%)	-1,47	-9,48	0,34	-8,88
Variação	- 8,01		- 9,22	

Continua

Continuação

ESTABILIDADE DE CURTA DURAÇÃO				
Resultado	CQB		CQA	
	Amostra recém-preparada	Amostra submetida ao estudo	Amostra recém-preparada	Amostra submetida ao estudo
Média das concentrações (ng/mL) (n=3)	125,75	122,87	929,71	910,40
Desvio em relação à concentração nominal (%)	-3,27	-5,48	-2,65	-4,67
Variação	- 2,21		- 2,02	
ESTABILIDADE PÓS-PROCESSAMENTO				
Resultado	CQB		CQA	
	Amostra recém-preparada	Amostra submetida ao estudo	Amostra recém-preparada	Amostra submetida ao estudo
Média das concentrações (ng/mL) (n=3)	125,93	123,48	960,51	931,51
Desvio em relação à concentração nominal (%)	-3,13	-5,02	0,58	-2,46
Variação	- 1,89		- 3,04	

*Final***Tabela 25** – Resultados dos estudos de estabilidade da VAL.

ESTABILIDADE DE LONGA DURAÇÃO				
Resultado	CQB		CQA	
	Amostra recém-preparada	Amostra submetida ao estudo	Amostra recém-preparada	Amostra submetida ao estudo
Média das concentrações (ng/mL) (n=3)	61,52	58,51	1330,39	1249,18
Desvio em relação à concentração nominal (%)	2,53	-2,49	-0,72	-6,78
Variação	- 5,02		- 6,06	

Continua

Continuação

ESTABILIDADE APÓS CICLOS DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO				
Resultado	CQB		CQA	
	Amostra recém-preparada	Amostra submetida ao estudo	Amostra recém-preparada	Amostra submetida ao estudo
Média das concentrações (ng/mL) (n=3)	64,14	57,60	1331,08	1219,15
Desvio em relação à concentração nominal (%)	6,90	-3,99	-0,67	-9,02
Variação	- 10,89		- 8,35	
ESTABILIDADE DE CURTA DURAÇÃO				
Resultado	CQB		CQA	
	Amostra recém-preparada	Amostra submetida ao estudo	Amostra recém-preparada	Amostra submetida ao estudo
Média das concentrações (ng/mL) (n=3)	60,02	57,95	1271,88	1249,10
Desvio em relação à concentração nominal (%)	0,04	-3,42	-5,08	-6,78
Variação	- 3,46		- 1,70	
ESTABILIDADE PÓS-PROCESSAMENTO				
Resultado	CQB		CQA	
	Amostra recém-preparada	Amostra submetida ao estudo	Amostra recém-preparada	Amostra submetida ao estudo
Média das concentrações (ng/mL) (n=3)	61,43	60,81	1366,70	1325,07
Desvio em relação à concentração nominal (%)	2,39	1,35	1,99	-0,88
Variação	- 1,04		- 2,87	

Final

4.6. APLICAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO

Como a VAL não pertence ao elenco da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais, e as amostras de sangue foram coletadas de pacientes hipertensos em atendimento

no serviço público de saúde, encontrou-se apenas LOS nas amostras de plasma dos voluntários. As respostas analíticas e as concentrações obtidas são apresentadas na **Tabela 26**. Os resultados obtidos foram concordantes com a concentração plasmática máxima descrita na literatura, para pacientes que utilizam LOS na dose de 50 mg/dia (SASAKI *et al.*, 1996). O cromatograma proveniente da amostra de plasma do segundo voluntário é apresentado na **Figura 31**.

Figura 31 – Cromatograma da amostra de plasma do segundo voluntário.

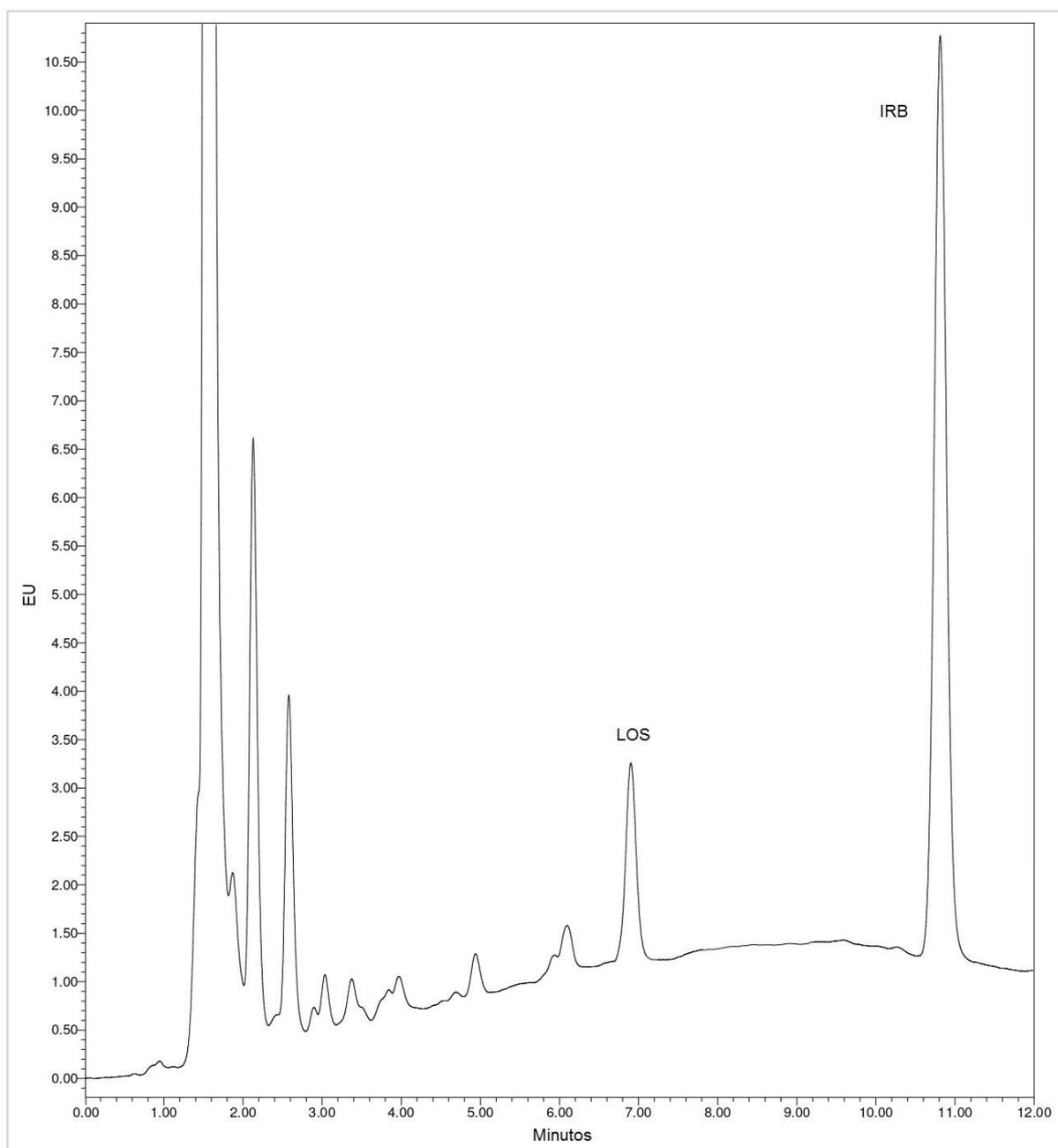


Tabela 26 – Concentração de LOS nas amostras de plasma dos voluntários hipertensos.

Amostra de plasma	Resposta analítica	Concentração (ng/mL)
Voluntário 1	0,098	159,74
Voluntário 2	0,159	259,83
Voluntário 3	0,119	194,26

5. CONCLUSÃO

A otimização das condições de extração foi essencial para obter altos valores de recuperação (> 80%) e, concomitantemente, reduzir a quantidade de compostos interferentes provenientes da matriz nos extratos. O uso do detector fluorimétrico possibilitou o alcance de LIQs adequados, mesmo sem o enriquecimento dos ARAs II no preparo de amostras, devido à sua maior seletividade e sensibilidade. Por meio da avaliação dos parâmetros de validação, observou-se que o método bioanalítico é seletivo e linear, preciso e exato nas faixas de concentração de 50 – 1200 ng/mL para LOS e 20 – 1700 ng/mL para VAL. Mesmo não sendo possível aplicar o método na análise de amostras de plasma de pacientes hipertensos sob tratamento medicamentoso com VAL, acredita-se que o método é adequado para essa finalidade, visto que o método mostrou-se adequado para a análise de LOS em amostras “reais” de plasma humano.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os BNNTs têm fascinado a comunidade científica desde sua descoberta. Esses nanomateriais relativamente novos possuem hoje uma ampla gama de aplicações, incluindo a área médica. Na busca de novos materiais de extração, FU *et al.* (2014) empregaram os BNNTs em um dispositivo miniaturizado, no qual o nanosorvente foi fixado em um fio de aço inoxidável. Todavia, essa aplicação teve como objetivo a extração/enriquecimento de poluentes de amostras de água. Até agora, não se encontraram trabalhos na literatura que empregaram os BNNTs puros ou quimicamente modificados como material extrator para a análise de amostras complexas. Logo, todo o potencial dos BNNTs em Química Analítica ainda não foi demonstrado. Felizmente, devido à vasta aplicação dos BNNTs na Biotecnologia, muitos grupos vêm estudando estratégias de síntese em larga escala, de modificações químicas da superfície, e de procedimentos eficientes de purificação e caracterização, visando à obtenção de produtos comerciais. Um número maior de obras, incluindo a exploração das diferentes possibilidades químicas, no que diz respeito à funcionalização dos BNNTs, bem como a aplicação desse nanomaterial em diferentes configurações miniaturizadas, é esperado. Desenvolvimentos futuros em todos esses aspectos certamente contribuirão para a expansão do uso dos BNNTs como material extrator e beneficiarão configurações inovadoras, como a SPME *in vivo*.

REFERÊNCIAS

AHMADI, A; KHANDAKER, M. U; KHAN, Z. R; AMIN, Y. M. Synthesis of boron nitride nanotubes via chemical vapour deposition: a comprehensive review. *Journal RSC Advances*, v. 5, n. 44, p. 35116-35137, 2015. DOI:10.1039/c5ra01594d.

AHMADI, M; ELMONGY, H; MADRAKIAN, T; ABDEL-REHIM, M. Nanomaterials as sorbents for sample preparation in bioanalysis: a review. *Analytica Chimica Acta*, v. 958, n. 15, p. 1-21, 2017. DOI:10.1016/j.aca.2016.11.062.

ANVISA. Resolução da diretoria colegiada nº 27, de 17 de maio de 2012. Ministério da Saúde, Brasil, 2012.

ANVISA. Resolução da diretoria colegiada nº 166, de 24 de julho de 2017. Ministério da Saúde, Brasil, 2017a. p. 1-21.

ANVISA. Guia para tratamento estatístico da validação analítica. Ministério da Saúde, Brasil, 2017b. p. 1-19.

AOAC. Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements. United States of America, 2016. p. 1-18.

BABARAHIMI, V; TALEBPOUR, Z; HAGHIGHI, F; ADIB, N; VAHIDI, H. Validated determination of losartan and valsartan in human plasma by stir bar sorptive extraction based on acrylate monolithic polymer, liquid chromatographic analysis and experimental design methodology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 153, n. 1, pag. 204-213, 2018. DOI:10.1016/j.jpba.2018.02.030.

BATTISTI, I. D. E. Comparação entre modelos de regressão com uma aplicação em biometria florestal. Dissertação (Mestrado em Estatística e Experimentação Agropecuária) – Departamento de Física, Estatística e Matemática, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

BHAD, P; AYALASOMAYAJULA, S; KARAN, R; LEON, S; RIVIERE, G; SUNKARA, G; JARUGULA, V. Evaluation of pharmacokinetic interactions between amlodipine, valsartan, and hydrochlorothiazide in patients with hypertension. *Journal of Clinical Pharmacology*, v. 51, n. 1, p. 933-942, 2011. DOI: 10.1177/0091270010376963.

BHANDARI, S; TIWARI, B; YAPICI, N; ZHANG, D; YAP, Y. K. Introduction to boron nitride nanotubes: synthesis, properties, functionalization, and cutting. *Boron nitride nanotubes in nanomedicine*, 1st ed. Elsevier Publisher, 2016. p.

BORTEL, L. V; BOHM, R; MOOIJ, J; SCHIFFERS, P; RAHN, K.H. Total and free steady-state plasma levels and pharmacokinetics of nifedipine in patients with terminal renal failure. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v. 37, n.1, p. 185-189, 1989. DOI: 10.1007/BF00558229.

BREITKREITZ, M. C; SOUZA, A. M; POPPI R. J. Experimento didático de quimiometria para planejamento de experimentos: avaliação das condições experimentais na determinação espectrofotométrica de ferro II com o-fenantrolina. Um tutorial, parte III. *Química Nova*, v. 37, n. 3, p. 564-573, 2014. DOI:10.5935/2F0100-4042.20140092.

CAGIGAL, E; GONZÁLEZ, L; ALONSO, R. M; JIMÉNEZ, R. M. pK_a determination of angiotensin II receptor antagonists (ARA II) by spectrofluorimetry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 26, n. 3, p. 477-486, 2001. DOI:10.1016/s0731-7085(01)00413-7.

CASSIANO, N. M; BARREIRO, J. C; MARTINS, L. R. R; OLIVEIRA, R. V; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Química Nova*, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009. DOI:10.1590/s0100-40422009000400033.

CHEMICALIZE. Plataforma da ChemAxon para cálculo de propriedades físico-químicas. Disponível em: <https://chemicalize.com>. Acesso em: Junho, 2019.

CHEN, X; HU, P; JIANG, J; LIU, T; ZHONG, W; LIU, H; ZHAO, Q. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles of a fixed-dose combination of olmesartan medoxomil and amlodipine in healthy Chinese males and females. *Clinical Drug Investigation*, v. 32, n. 12, p. 783-790, 2012. DOI: 10.1007/s40261-012-0026-0.

CIOFANI, G. Potential applications of boron nitride nanotubes as drug delivery systems. *Expert Opinion on Drug Delivery*, v. 7, n.8, p. 889-893, 2010. DOI: 10.1517/17425247.2010.499897.

CIOFANI, G; GENCHI, G.G; LIAKOS, I; ATHANASSIOU, A; DINUCCI, D; CHIELLINI, F; MATTOLI, V. A simple approach to covalent functionalization of boron nitride nanotubes. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 374, n. 1, p. 308-314, 2012. DOI:10.1016/j.jcis.2012.01.049.

COVILLE, N. J; MHLANGA, S. D; NXUMALO, E. N; SHAIKJEE, A. A review of shaped carbon nanomaterials. *South African Journal of Science*, v. 107, n. 3-4, p. 1-15, 2011. DOI: 10.4102/sajs.v107i3/4.418.

DEVINENI, D; VACCARO, N; POLIDORI, D; RUSCH, S; WAJS, E. Effects of hydrochlorothiazide on the pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerability of canagliflozin, a sodium glucose co-transporter 2 inhibitor, in healthy participants. *Clinical Therapeutics*, v. 36, n. 5, p. 698-710, 2014. DOI: 10.1016/j.clinthera.2014.02.022.

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, n. 1, p. 12-18, 2012. DOI: 10.1016/j.jpha.2011.10.005.

EMA. Guideline on bioanalytical method validation. Committee for Medicinal Products for Human Use, European Union, 2011. p. 1-23.

ESFANDIARNEJAD, R; SERESHTI, H; FARAHANI, A. Polyaniline immobilized on polycaprolactam nanofibers as a sorbent in electrochemically controlled solid-phase microextraction coupled with HPLC for the determination of angiotensin II receptor antagonists in human blood plasma. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 411, n. 16, p.3631-3640, 2019. DOI: 10.1007/s00216-019-01845-8.

FDA. Reviewer Guidance: validation of chromatographic methods. Center for Drug Evaluation and Research, United States of America, 1994. p. 1-33.

FDA. Bioanalytical method validation guidance for industry. Department of Health and Human Services, United States, 2018. p. 1-44.

FERREIRA, T. H. Nanoestruturas de nitreto de boro: síntese, caracterização e purificação. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais) – Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

FERREIRA, T. H; HOLLANDA, L. M; LANCELLOTTI, M; SOUSA, E. M. B. Boron nitride nanotubes chemically functionalized with glycol chitosan for gene transfection in eukaryotic cell lines. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 103, n.6, p. 2176-2185, 2014. DOI: 10.1002/jbm.a.35333.

FERREIRA, T. H; MARINO, A; ROCCA, A; LIAKOS, I; NITTI, S; ATHANASSIOU, A; MATTOLI, V; MAZZOLAI, B; SOUSA, E. M. B; CIOFANI, G. Folate-grafted boron nitride nanotubes: Possible exploitation in cancer therapy. *International Journal of Pharmaceutic*, v. 481, n. 1–2, p. 56-63, 2015. DOI:10.1016/j.ijpharm.2015.01.048.

FERREIRA, T. H; SILVA, P. R. O; SANTOS, R. G; SOUSA, E. M. B. A novel synthesis route to produce boron nitride nanotubes for bioapplications. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, v. 2, n.4, p. 426-434, 2011. DOI: 10.4236/jbnb.2011.24052.

FERREIRA, T. H; SOARES, D. C. F; MOREIRA, L. M. C; SILVA, P. R. O; SANTOS, R. G; SOUSA, E. M. B. Boron nitride nanotubes coated with organic hydrophilic agents: stability and cytocompatibility studies. *Materials Science and Engineering C*, v. 33, n.1, p. 4616-4623, 2013. DOI:10.1016/j.msec.2013.07.024.

FERREIRA, T. P. Estudo comparativo de métodos de extração para determinação de fluazuron em plasma bovino por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção em ultravioleta. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2016.

FERREIRÓS, N; IRIARTE, G; ALONSO, R. M. JIMÉNEZ, R. M. ORTÍZ. E. Validation of a solid phase extraction-high performance liquid chromatographic method for the determination of eprosartan in human plasma. *Journal of Chromatography A*, v. 1119, n. 1–2, p. 309-314, 2006. DOI:10.1016/j.chroma.2006.02.055.

FISCHANALLER, M; BAKRY, R; BONN, G. K. A simple method for the enrichment of bisphenols using boron nitride. *Food Chemistry*, v. 194, n.1, p. 149-155, 2016. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.07.117.

FU, M; XING, H; CHEN, X; ZHAO, R; ZHI, C; WU, C.L. Boron nitride nanotubes as novel sorbent for solid-phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 406, n. 24, p. 5751-5754, 2014. DOI: 10.1007/s00216-014-8032-0.

GAO, Z; ZHI, C; BANDO, Y.D.G; SERIZAWA, T. Functionalization of boron nitride nanotubes for applications in nanobiomedicine. *Boron nitride nanotubes in nanomedicine*. 1st ed. Elsevier Publisher, 2016. p. 17-40.

GONZÁLEZ, L; LÓPEZ, J. A; ALONSO, R. M; JIMÉNEZ, R. M. Fast screening method for the determination of angiotensin II receptor antagonists in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A*, v. 949, n. 1-2, p. 49-60, 2002. DOI: 10.1016/s0021-9673(01)01496-0.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, R; COLL, T; RACHITZKY, P; ARMAS-HERNÁNDEZ, M. J; ARMAS-PADILLA, M. C; VELASCO, M; RIZZO, A. Comparison of two nimodipine formulations in healthy volunteers. *Journal of Human Hypertension*, v. 16, n. 1, p. S142–S144, 2002. DOI: 10.1038/sj.jhh.1001361.

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, p. E353-E360, 2007. DOI: 10.1208/aapsj0903042.

International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. *Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1)*. European Union, 2005. p. 1-17.

ISAAC, P. F; RAND, M. J. Cigarette smoking and plasma levels of nicotine. *Nature*, v. 236, n.1, p. 308-310, 1972. DOI:10.1038/236308a0.

IZYUMSKAYA, N; DEMCHENKO, D. O; DAS, S; OZGUR, U; AVRUTIN, V; MORKOÇ, H. Recent development of boron nitride towards electronic applications. *Advanced Electronic Materials*, v.3, n. 5, p. 1-22, 2017. DOI: 10.1002/aelm.201600485.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em fase sólida: fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. *Scientia Chromatographica*, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010.

JIA, S; WANG, Z; DING, N; WONG, Y. L. E; CHEN, X; QIU, G; CHAN, T. W. D. Hexagonal boron nitride nanosheets as adsorbents for solid-phase extraction of polychlorinated biphenyls from water samples. *Analytica Chimica Acta*, v. 936, n. 1, p. 123-129, 2016. DOI: 10.1016/j.aca.2016.07.019.

KATAOKA, H. Recent developments and applications of microextraction techniques in drug analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 396, n. 1, p. 339-364, 2010. DOI: 10.1007/s00216-009-3076-2.

KATAOKA, H. Current developments and future trends in solid-phase microextraction techniques for pharmaceutical and biomedical analyses. *Analytical Sciences*, v. 27, n. 9, p. 893-905, 2011. DOI: 10.2116/analsci.27.893.

KATAOKA, H; ISHIZAKI, A; SAITO, K. Recent progress in solid-phase microextraction and its pharmaceutical and biomedical applications. *Analytical Methods*, v. 8, n. 29, p. 5773-5788, 2016. DOI: 10.1039/c6ay00380j.

KIM, J. H; PHAM, T. V; HWANG, J. H; KIM, C. S; KIM, M. J. Boron nitride nanotubes: synthesis and applications. *Nano Convergence*, v.5, n.17, p.1-13, 2018. DOI:10.1186/s40580-018-0149-y.

LANÇAS, F. M O renascimento das partículas superficialmente porosas ("*core shell particles*") em HPLC. *Scientia Chromatographica*, v. 2, n. 2, p. 47-54, 2010.

LARSSON, R; KARLBERG, B. E; GELIN, A; ABERG, J; REGÅRDH, C. G. Acute and steady-state pharmacokinetics and antihypertensive effects of felodipine in patients with normal and impaired renal function. *The Journal of Clinical Pharmacology*, v. 30, n. 11, p. 1020-1030, 1990. DOI: 10.1002/j.1552-4604.1990.tb03589.x.

LEE, C. H; WANG, J; KAYATSHA, V. K; HUANG, J. Y; YAP, Y. K. Effective growth of boron nitride nanotubes by thermal chemical vapor deposition. *Nanotechnology*, v. 19, n. 45, p. 1-5, 2008. DOI: 10.1088/0957-4484/19/45/455605.

LEIDIG, M. F; DELLES, C; KUCHENBECKER, C; LEDERLE, R; WEIDINGER, G; SCHMIEDER, R. Pharmacokinetics of valsartan in hypertensive patients on long-term haemodialysis. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 21, n. 1, p. 59-66, 2001. DOI: 10.2215/CJN.00870116.

LOURIE, O. R; JONES, C. R; BARTLETT, B. M; GIBBONS, P. C; RUOFF, R. S; BUHRO, W. E. CVD growth of boron nitride nanotubes. *Chemistry of Materials*, v. 12, n. 7, p. 1808-1810, 2000. DOI:10.1021/cm000157q.

MACEDO, A. N. Desenvolvimento de métodos analíticos visando atender aos princípios da química verde na análise de resíduos de medicamentos veterinários em leite bovino. Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

MACIEL, E. V. S. Síntese de novos materiais à base de grafeno para aplicação em microextração por sorvente empacotado (MEPS) na extração de tetraciclinas presentes no leite com posterior análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (HPLC-MS/MS). Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

MALDANER, L; COLLINS, C. H; JARDIM, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. *Química Nova*, v. 33, n. 7, p.1559-1568, 2010. DOI:10.1590/s0100-40422010000700024.

NAGEL, B. C. H. V. D; VERSMISSEN, J; BAHMANY, S; GELDER, T. V; KOCH, B. C. P. High-throughput quantification of 8 antihypertensive drugs and active metabolites in human plasma using UPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography*, v. 1060, n. 1, p. 367-373, 2017. DOI:10.1016/j.jchromb.2017.06.029.

NETO, B. B; SCARMINIO, I. S; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 1ª ed. Editora da Universidade Estadual de Campinas, 2001. p. 1-414.

NIU, Z; ZHANG, W; YU, C; ZHANG, J; WEN, Y. Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 102, n.1, p.123-146, 2018. DOI: 10.1016/j.trac.2018.02.005.

NOWATZKE, W; WOOLF, E. Characterization of assay reagents and the evaluation of analyte stability in assay standards, quality controls, and study samples. *The AAPS Journal*, v. 9, n. 2, p. 117-122, 2007. DOI: 10.1208/aapsj0902013.

ORLANDO, R. M; RATH, S; ROHWEDDER, J. J. R. Dispositivo para extração em fase sólida tipo “manifold” com câmara de vácuo, válvulas para controle por vácuo e válvulas adaptadas para controle por bomba peristáltica. Patente. Depositante: Universidade Estadual de Campinas. Registro: MU 9101903-6 U2. Publicação em: Agosto de 2013. Depósito em: setembro de 2011.

PARK, J. W; KIM, K; KIM, Y; PARK, J. Pharmacokinetic and haemodynamic interactions between amlodipine and losartan in human beings. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v. 125, n. 1, p. 345–352, 2019. DOI: 10.1111/bcpt.13244.

PAVIA, D; LAMPMAN, G; KRIZ, G; WYVYAN, J. Introdução à espectroscopia. 2ª ed. Editora Cengage Learning, 2015. p. 1-733.

PORTO, A. B; SILVA, A. G. G; SANTOS, H. F; OLIVEIRA, L. F. C. Oxidation of single-walled carbon nanotubes under controlled chemical conditions. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 29, n. 11, p. 2387-2396, 2018. DOI: 10.21577/0103-5053.20180116.

QUEIROZ, S. C. N; COLLINS, C. H; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001. DOI: 10.1590/S0100-40422001000100013.

RAMOS, D. C; CASALI, A. C. G. Antagonistas dos receptores da angiotensina II: uma revisão de classe. *Revista Saúde e Desenvolvimento*, v. 1, n.2, p. 80-94, 2012.

RAYNIE, D. E; WATSON, D. W. Understanding and improving solid-phase extraction. *LCGC North America*, v. 32, n. 12, p. 908–915, 2014.

RIBEIRO, H; VILELA, D. N. Perspectives on chemical modification on carbon nanomaterials assisted by microwave radiation. *Research e Development in Material Science*, v. 4, n. 3, p. 1-5, 2018. DOI: 10.31031/RDMS.2018.04.000590.

SANTOS, M. T. C. Síntese e caracterização de nanotubos de nitreto de boro decorados com SPION's. Dissertação (Mestrado em Materiais para Engenharia) – Instituto de Física e Química, Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2017.

SASAKI, M; FUJIMURA, A; HARADA, K; SUNAGA, K; EBIHARA, A. Clinical pharmacology of multiple-dose losartan, an angiotensin II receptor antagonist, in patients with essential hypertension. *Journal of Clinical Pharmacology*, v. 36, n. 5, p. 403-408, 1996. DOI: 10.1002/j.1552-4604.1996.tb05026.x.

SILVA, W. M; FERREIRA, T. H; MORAIS, C. A; LEAL, A. S; SOUZA, E. M. B. Samarium doped boron nitride nanotubes. *Applied Radiation and Isotopes*, v. 131, n.1, p. 30-35, 2018b. DOI: 10.1016/j.apradiso.2017.10.045.

SILVA, W. M; MONTEIRO, G. A. A; GASTELOIS, P. L; SOUSA, R. G; MACEDO, W. A. A; SOUSA, E. M. B. Efficient sensitive polymer-grafted boron nitride nanotubes by microwave-assisted process. *Nano-Structures e Nano-objects*, v. 15, n. 1, p. 186-196, 2018a. DOI: 10.1016/j.nanoso.2017.09.014.

SNYDER, L. R; KIRKLAND, J. J; GLAJCH, J. L. Practical HPLC method development. 2nd ed. Publisher John Wiley e Sons, 1997. p. 1-800.

SONG, X; CHEN, J; SHI, Y. Different configurations of carbon nanotubes reinforced solid-phase microextraction techniques and their applications in the environmental analysis. *Trends in analytical Chemistry*, v. 86, n. 1, p. 263-275, 2017. DOI: 10.1016/j.trac.2016.11.006.

SOUZA, M. A. C. Desenvolvimento de métodos cromatográficos para a determinação simultânea, em plasma humano, de fármacos usados no tratamento de doenças cardiovasculares. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2021.

SOUZA, M. A. C; REIS, N. F. A; LEITE, I. M. S; GLÓRIA, M. B; 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, n. 1, p. 1-8, 2020. DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113403.

SOUZA, S. V. C; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analytica Chimica Acta*, v. 552, n. 1-2, p. 25-35, 2005. DOI: 10.1016/j.aca.2005.07.043.

TANG, C; BANDO, Y; SATO, T; KURASHIMA, K. A novel precursor for synthesis of pure boron nitride nanotubes. *Chemical Communications*, v. 12, n. 1, p. 1290–1291, 2002. DOI: 10.1039/b202177c.

TEÓFILO, R. F; FERREIRA, M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Química Nova*, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006. DOI:10.1590/s0100-40422006000200026.

TOFFOLI, A. L; LANÇAS, F. M. Recentes avanços da microextração em fase sólida no tubo (*in-tube* SPME) e sua aplicação em análises ambientais e alimentícias. *Scientia Chromatographica*, v. 7, n. 4, p. 297-315, 2015. DOI: 10.4322/sc.2016.011.

UNICAMP. Planilhas automáticas do Laboratório de Quimiometria Teórica e Aplicada para planejamentos fatoriais. Disponível em: <https://lqta.iqm.unicamp.br/>. Acesso em: Janeiro, 2021.

WATERS. Bioanalytical sample preparation and method development for therapeutic and endogenous peptides. *Oasis Peptide Bioanalysis Reference Card*, 2018. p. 1-20.

WICKHAM, K. A; SPRIET, L. L. Administration of caffeine in alternate forms. *Sports Med*, v. 48, n. 1, p. S79–S91, 2018. DOI:10.1007/s40279-017-0848-2

YANG, C; WANG, J; LI, D. Microextraction techniques for the determination of volatile and semivolatile organic compounds from plants: a review. *Analytica Chimica Acta*, v. 799, n. 17, p. 8-22, 2013. DOI: 10.1016/j.aca.2013.07.069.

ZHI, C; BANDO, Y; TANG, C; HONDA, S; SATO, K; KUWAHARA, H; GOLBERG, D. Covalent functionalization: towards soluble multiwalled boron nitride nanotubes. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 44, n. 48, p. 7932-7935, 2005. DOI: 10.1002/anie.200502846.

ZHI, C. Y; BANDO, Y; TERAOKA, T; TANG, C. C; KUWAHARA, H; GOLBERG, D. Chemically activated boron nitride nanotubes. *Chemistry: An Asian Journal*, v. 4, n. 10, p. 1536–1540, 2009. DOI:10.1002/asia.200900158.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”

(Isaac Newton)