

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

Lilian Costa Drigo

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO
ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE ANTI-HIPERTENSIVOS EM
AMOSTRAS DE ESTUDOS DE PERMEAÇÃO EM CÉLULAS CACO-2
UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À
ESPECTROMETRIA DE MASSAS.**

**Belo Horizonte
2013**

UFMG/ICEx/DQ 978^a
D 537^a

Lilian Costa Drigo

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO
ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE ANTI-HIPERTENSIVOS EM
AMOSTRAS DE ESTUDOS DE PERMEAÇÃO EM CÉLULAS CACO-2
UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À
ESPECTROMETRIA DE MASSAS.**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Química do Instituto de Ciências Exatas da
Universidade Federal de Minas Gerais como
requisito parcial para obtenção do grau de Mestre
em Química – Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Evandro Piccin

**Belo Horizonte
2013**

D779d
2013
D

Drigo, Lilian Costa

Desenvolvimento e validação de um método analítico para determinação de anti-hipertensivos em amostras de estudos de permeação em células caco-2 utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas [manuscrito] / Lilian Costa Drigo. 2013.

xv, 68 f. : il.

Orientador: Evandro Piccin.

Coorientador: Ruben Dario Sinisterra Millán.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química.

Inclui bibliografia.

1. Química analítica - Teses 2. Fármacos - Teses 3. Agentes hipotensores - Teses 4. Ciclodextrinas - Teses 5. Cromatografia líquida - Teses 6. Espectrometria de massa - Teses I. Piccin, Evandro, Orientador II. Millán, Ruben Dario Sinisterra, Coorientador III. Título.

CDU 043

UFMG

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEX
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3409-5732
FAX: 031 - 3409-5711
E-MAIL: pgquimic@qui.ufmg.br



"Desenvolvimento e Validação de um Método Analítico para Determinação de Anti-hipertensivos em Amostras de Estudos de Permeação em Células CACO-2 Utilizando Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas"

Lilian Costa Drigo

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Evandro Piccin - Orientador
UFMG

Profa. Elisângela Jaqueline Magalhães
UFMG

Prof. Rodinei Augusti
UFMG

Belo Horizonte, 02 de agosto de 2013.

Aos meus pais e irmãos.

Agradeço,

Aos meus pais que amo tanto.

Aos meus irmãos, Leo e Laura. Os melhores.

Aos meus avós queridos, que são lições de vida.

Ao Pedro, pelo amor e companheirismo.

À Keila, Karina, Roberta e Luiza. Amizades muito importantes durante este período.

Ao Prof. Evandro Piccin pelos ensinamentos, paciência e orientação neste trabalho.

Ao Prof. Rubén Sinisterra, pelo apoio.

Ao Prof. Rodinei Augusti por disponibilizar o equipamento de LC-MS para realização dos experimentos.

Ao Júlio, por toda a colaboração nos experimentos de LC-MS.

À Alinne, por ceder as amostras utilizadas neste trabalho.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro.

RESUMO

As doenças cardiovasculares são a principal causa de mortes no Brasil e no mundo. A taxa de mortalidade associada a essas doenças se eleva progressivamente com o aumento da pressão arterial. Uma das formas de abordagem terapêutica da hipertensão arterial é o tratamento medicamentoso, onde se utilizam fármacos anti-hipertensivos, isoladamente ou em associações. Além disso, existem estudos relacionados à administração de fármacos anti-hipertensivos na forma de complexos de inclusão formados com as ciclodextrinas, a fim de se modelar a cinética de liberação, melhorar a absorção ou aumentar a estabilidade do fármaco. Uma vez utilizados os sistemas de liberação controlada, a absorção do medicamento pode ser avaliada por testes *in vitro*, que permitem a monitoração por meio da quantificação da fração do fármaco dissolvido. Logo, são necessárias técnicas que permitam a determinação simultânea desses compostos.

Essa dissertação teve como objetivo desenvolver um método para determinação simultânea de diferentes anti-hipertensivos, hidroclorotiazida, losartan, telmisartan e valsartan, e alguns de seus metabólitos losartan ácido-5-carboxílico, valeril-hidroxi-valsartan e telmisartan 1-O-acilglucoronídeo, utilizando LC-MS e validá-lo em amostras resultantes de estudos de permeação em células Caco-2. Essas células servem como modelo que pode ser utilizado para predição da absorção *in vivo* em estudos de permeabilidade e biodisponibilidade. O método obteve alta seletividade e sensibilidade, confirmadas através da análise dos cromatogramas de íon extraído do telmisartan e da matriz branca, e também possibilitada pelo uso de um analisador tipo TOF de alta resolução. A faixa linear de trabalho não variou entre os analitos estudados e não foi detectado efeito de matriz. Os valores de precisão obtidos para todos os fármacos foram menores que 5.5% e os valores obtidos para a exatidão, em termos da recuperação, variou entre 77,4 a 127,2%. Os limites de detecção e de quantificação foram determinados por diluições sucessivas e apresentaram valores de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. A metodologia foi aplicada em amostras de telmisartan puro e de complexos de inclusão do telmisartan com a β -ciclodextrina, provenientes de estudos de permeação em células Caco-2, em proporções TLM: β CD de 1:1, 1:2 e 1:3. Os resultados da aplicação do método mostram que a inclusão do fármaco aumenta sua solubilidade com consequente aumento da biodisponibilidade.

Palavras-chave: fármacos anti-hipertensivos, ciclodextrinas, células Caco-2, validação, cromatografia líquida, espectrometria de massas.

ABSTRACT

The cardiovascular diseases are the main cause of death around the world, and Brazil follows this same trend. The mortality associated to these diseases rises progressively with the increasing of blood pressure. One of the therapeutic approaches for arterial hypertension is the treatment with drugs, which uses antihypertensive drugs alone or a combination of different classes of these drugs. There are some studies related to the administration of antihypertensive drugs in the form of inclusion complexes with cyclodextrins, in order to model the release kinetics and improve the absorption or increase the stability of the drug. Once used these systems, the drug absorption can be evaluated using *in vitro* assays by monitoring the value of the fraction of drug dissolved. Therefore, techniques that allow the simultaneous determination of these compounds are required.

In this work, a method for the simultaneous determination of different antihypertensive drugs, hydrochlorothiazide, losartan, valsartan and telmisartan, and some metabolites losartan carboxylic acid, valeryl 4-hydroxy valsartan and telmisartan 1-O-acylglucuronide, using LC-MS was developed and then validated in samples resulted from Caco-2 permeability assays. These Caco-2 cells were used as models to predict the *in vivo* absorption in permeability and bioavailability studies. The method has shown high selectivity and sensibility, as confirmed by analysis of the extracted ion chromatograms of telmisartan and the sample matrix, and also by using a high-resolution TOF analyzer. The linear range was the same for all analytes and there was no matrix effect. Precision was smaller than 5.5% for all analytes and the values obtained for accuracy in terms of recovery ranged from 77.4 to 127.2%. The detection and quantification limits were empirically determined, and the values were 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. The methodology was applied to the analysis of telmisartan off and in inclusion complexes formed by telmisartan and β -cyclodextrin at different proportions TLM: β CD: 1:1, 1:2 and 1:3. The results show that the inclusion of the drug increases their solubility with consequent increased bioavailability.

Key words: antihypertensive drugs, cyclodextrins, Caco-2 cells, validation, liquid chromatography, mass spectrometry.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Doenças cardiovasculares e pressão arterial.....	1
1.2. Fármacos utilizados no tratamento da hipertensão.....	3
1.2.1. Sistema renina-angiotensina e os anti-hipertensivos antagonistas dos receptores de angiotensina II.....	3
1.2.2. Diuréticos tiazídicos.....	8
1.3. Determinação de anti-hipertensivos antagonistas do receptor da angiotensina II.....	9
1.4. Dispositivos de liberação controlada de fármacos e as ciclodextrinas.....	13
1.5. Células Caco-2 como modelo de determinação da absorção de fármacos.....	15
1.6. Espectrometria de massas.....	18
1.7. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS).....	20
1.8. Processos de validação para métodos analíticos.....	22
1.8.1. Relevância.....	22
1.8.2. Parâmetros de validação.....	23
1.8.2.1. Seletividade.....	23
1.8.2.2. Linearidade.....	23
1.8.2.3. Faixa de trabalho e faixa linear.....	24
1.8.2.4. Efeito de matriz.....	24
1.8.2.5. Precisão.....	26
1.8.2.6. Exatidão (Veracidade).....	27
1.8.2.7. Limite de detecção e limite de quantificação.....	27
1.8.2.8. Robustez.....	28
2. OBJETIVOS	29
3. PARTE EXPERIMENTAL	30
3.1. Reagentes e solventes.....	30
3.2. Soluções.....	30
3.3. Amostras.....	30

3.4. Instrumentação	31
3.5. Condições de análise no sistema LC-ESI/IT/TOF/MS	32
3.6. Validação do método	32
3.6.1. Seletividade	32
3.6.2. Linearidade	33
3.6.3. Efeito de matriz	33
3.6.4. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	33
3.6.5. Precisão e Exatidão	34
3.7. Aplicação do método	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
4.1. Otimização das condições cromatográficas	35
4.2. Análise por LC-ESI/IT/TOF/MS	36
4.3. Validação do método	42
4.3.1. Seletividade	42
4.3.2. Efeito de matriz	43
4.3.3. Linearidade	45
4.3.4. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	51
4.3.5. Precisão e exatidão (veracidade)	52
4.4. Aplicação do método	57
5. CONCLUSÕES	59
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Mapa mundial representando o valor da pressão arterial sistólica em mulheres acima de 25 anos, no ano de 2008. (Fonte: World Health Organization, 2011).....	2
Figura 1.2. Mapa mundial representando o valor da pressão arterial sistólica em homens acima de 25 anos, no ano de 2008. (Fonte: World Health Organization, 2011).....	2
Figura 1.3. Esquema representativo do sistema renina-angiotensina (SRA): Ang I = angiotensina I; Ang II = angiotensina II; ECA = enzima conversora de angiotensina; AT1 = receptor de angiotensina tipo1; AT2 = receptor de angiotensina tipo 2. (Fonte: Unger, 2002. Adaptado.).....	5
Figura 1.4. Estrutura química dos compostos: (a) losartan, (b) losartan ácido-5-carboxílico (Fonte: Kolocouri et al., 2007. Adaptado), (c) valsartan, (d) valeril-hidroxi-valsartan (Fonte: Serebruany et al., 2004. Adaptado), (e) telmisartan (Fonte: Chen et al., 2005), (f) telmisartan 1-O-acilglucoronídeo (Fonte: Ebgner et al., 1999).....	7
Figura 1.5. Estrutura química da hidroclorotiazida (Fonte: Kolocouri et al., 2007. Adaptada.).....	8
Figura 1.6. Fórmula estrutural da unidade glicosídica da ciclodextrina na conformação cadeira. (Fonte: Sousa, 2007. Adaptado.).....	13
Figura 1.7. Representação estrutural da: (a) α -ciclodextrina, (b) β -ciclodextrina e (c) γ -ciclodextrina. (Fonte: Sousa, 2010. Adaptado.).....	14
Figura 1.8. Representação esquemática da β -ciclodextrina. (Fonte: Hirayama & Uekama, 1999. Adaptado.).....	15
Figura 1.9. Representação esquemática do experimento de permeabilidade utilizando o modelo de células Caco-2 (Fonte: Bohets et al., 2001. Adaptado.).....	17
Figura 1.10. Representação esquemática da técnica ESI (Magalhães, 2012).....	19
Figura 1.11. Representação esquemática do funcionamento do espectrômetro de massas ion-trap – time-of-fligth (Fonte: Shimadzu, 2007).....	20
Figura 4.1. Cromatograma de uma mistura de anti-hipertensivos (5000 μ g L ⁻¹). Picos: (1) hidroclorotiazida; (2) telmisartan 1-O-acilglucoronídeo; (3) telmisartan; (4) valeril-hidroxi-valsartan; (5) losartan; (6) losartan ácido-5-carboxílico e (7) valsartan.....	36
Figura 4.2.a. Cromatograma de ion extraído do cromatograma de íons totais para (a) hidroclorotiazida, (b) valsartan, (c) valeril-hidroxi-valsartan e (d) telmisartan.....	38

Figura 4.2.b. Cromatograma de íon extraído do cromatograma de íons totais para: (e) telmisartan 1-O-acilglucoronídeo, (f) losartan e (g) losartan ácido-5-carboxílico.....	39
Figura 4.3.a. Espectros de massas característicos do pico de cada composto: (a) hidroclorotiazida, (b) valsartan, (c) valeril-hidroxi-valsartan e (d) telmisartan.....	40
Figura 4.3.b. Espectros de massas característicos do pico de cada composto: (e) telmisartan 1-O-acilglucoronídeo, (f) losartan e (h) losartan ácido-5-carboxílico.....	41
Figura 4.4. Cromatograma de íon extraído do cromatograma de íons totais para o (a) telmisartan e (b) matriz branca da amostra.....	43
Figura 4.5. Curvas analíticas do telmisartan, preparadas em solvente puro (MeOH) e na matriz branca da amostra.....	44
Figura 4.6.a. Curvas analíticas preparadas em metanol, para cada um dos analitos: (a) hidroclorotiazida, (b) valsartan, (c) valeril-hidroxi-valsartan, e (d) telmisartan.....	47
Figura 4.6.b. Curvas analíticas preparadas em metanol, para cada um dos analitos: (e) telmisartan 1-O-acilglucoronídeo, (f) losartan e (g) losartan ácido-5-carboxílico.....	48
Figura 4.7.a. Curvas analíticas preparadas na matriz branca da amostra, para cada um dos analitos: (a) hidroclorotiazida, (b) valsartan, (c) valeril-hidroxi-valsartan, (d) telmisartan.....	49
Figura 4.7.b. Curvas analíticas preparadas na matriz branca da amostra, para cada um dos analitos: (e) telmisartan 1-O-acilglucoronídeo, (f) losartan e (g) losartan ácido-5-carboxílico.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Compilação de trabalhos utilizando a técnica LC-MS para determinação de anti-hipertensivos em diferentes matrizes.	10
Tabela 4.1. Tempo de retenção, razão m/z da forma deesprotonada da molécula e fórmula molecular de cada composto em estudo.	37
Tabela 4.2. Erro entre massa mensurada e massa predita pelo software do equipamento.	42
Tabela 4.3. Valores de F e t obtidos na comparação entre a curva preparada em metanol e a curva preparada na matriz branca da amostra.	45
Tabela 4.4. Faixa linear, equação linear e coeficiente de correlação (R^2) dos anti-hipertensivos para as curvas em metanol.	46
Tabela 4.5. Faixa linear, equação linear e coeficiente de determinação dos anti-hipertensivos para as curvas preparadas na matriz branca da amostra.	51
Tabela 4.6. Valores do limite de detecção e limite de quantificação dos anti-hipertensivos estudados pelo método proposto.	52
Tabela 4.7. Precisão de cada analito, em termos do RSD%, obtida da matriz fortificada em três níveis de concentração: 5, 50 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$	53
Tabela 4.8. Exatidão de cada analito (recuperação) obtidas da matriz fortificada em três níveis de concentração: 5, 50 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$	53
Tabela 4.9. Comparação de parâmetros em estudos de validação em trabalhos encontrados na literatura.	55
Tabela 4.10. Concentrações de telmisartan obtidas nas análises das soluções contidas na câmara basolateral de experimentos de permeação em células de Caco-2.	57

LISTA DE ABREVIATURAS

Ang I – Angiotensina I.

Ang II – Angiotensina II.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

APCI – Ionização Química à Pressão Atmosférica, do inglês, *Atmospheric-Pressure Chemical Ionization*.

APPI - Fotoionização à Pressão Atmosférica, do inglês, *Atmospheric Pressure Photoionization*.

ARA II – Antagonista do Receptor de Angiotensina II.

AT₁ – Receptor de angiotensina II, do tipo 1.

AT₂ – Receptor de angiotensina II, do tipo 2.

AVC – Acidente Vascular Cerebral.

AVE – Acidente Vascular Encefálico.

CD – Ciclodextrinas.

CE – Eletroforese Capilar, do inglês *Capillary Electrophoresis*.

CV – Coeficiente de Variação.

DCV – Doenças Cardiovasculares.

DPR – Desvio Padrão Relativo.

ECA – Enzima Conversora de Angiotensina.

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético, do inglês, *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*.

ESI – Ionização por Electrospray, do inglês, *Electrospray Ionization*.

FAB – Ionização por bombardeamento de átomos rápidos, do inglês, *Fast Atom Bombardment*.

HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica.

HBBS – Solução Salina Tamponada de Hank, do inglês, *Hank's Buffered Salt Solution*.

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*.

IC₅₀ – Concentração necessária para inibir 50% da atividade do fármaco.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia.

IT – Analisador de Massas Aprisionador de Íons, do inglês, *Ion-Trap*.

LC-APPI-MS/MS - Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas com Ionização à Pressão Atmosférica, do inglês, *High-Performance Liquid Chromatography and Atmospheric Pressure Photoionization Tandem Mass Spectrometry*.

LC-ESI-MS/MS ou HPLC-ESI-MS/MS - Cromatografia Líquida de Alta eficiência acoplada à Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray, do inglês, *High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry*.

LC-MS - Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês, *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*.

LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial, do inglês, *High-Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry*.

LC-UV – Cromatografia Líquida com Detecção por Ultravioleta, do inglês, *Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection*.

LD – Limite de Detecção.

LQ – Limite de Quantificação.

m/z – Razão massa/carga.

MALDI – Ionização da Matriz Assistida por Dessorção a Laser, do inglês, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

MRC – Material de Referência Certificado

MS – Espectrometria de Massas, do inglês, *Mass Spectrometry*.

PA – Pressão Arterial.

PBS - Tampão Fosfato-Salino, do inglês, *Phosphate Buffered Saline*.

PEPT1 – Transportador peptídico 1.

PEPT2 – Transportador peptídico 2.

PPM – Parte por milhão.

RSD – desvio padrão relativo, do inglês, *Relative Standard Deviation*.

SFC – Cromatografia de Fluido Supercrítico, do inglês, *Super Fluid Chromatography*.

SIM – Monitoramento seletivo do íons, do inglês, *Selected-Ion Monitoring*.

SRA – Sistema Renina-Angiotensina.

TLM – Telmisartan.

TOF – Analisador de Massas por Tempo de Voo, do inglês, *Time-of-Flight*.

WHO – World Health Organization.

β CD – β -Ciclodextrina.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças cardiovasculares e pressão arterial

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de mortes ao redor do mundo e o Brasil segue essa mesma tendência, correspondendo a mais de 30% dos óbitos no país. (Mendes *et. al.* 2006; Trialists' Collaboration, 2003; Filho, 2007). Entre elas estão compreendidas a doença arterial coronariana, o acidente vascular encefálico, a doença arterial periférica, as doenças renais e a insuficiência cardíaca congestiva. (Filho, 2007).

A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) é a mais frequente das doenças cardiovasculares e, também, o principal fator de risco para complicações mais comuns, como o infarto agudo do miocárdio e o acidente vascular cerebral. A HAS caracteriza-se por ser uma condição clínica multifatorial, qualificada por níveis altos e sustentados de pressão arterial (PA). É definida como pressão arterial sistólica maior ou igual a 140 mmHg e uma pressão arterial diastólica maior ou igual a 90 mmHg. A mortalidade por DCV eleva progressivamente com o aumento da PA, sendo que, em 2007, foram constatadas 308.466 mortes por doenças do aparelho circulatório no Brasil. (Brasil, 2006; Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2010).

Em nível mundial, aproximadamente 51% das mortes por acidente vascular cerebral (AVC) e 45% por doença cardíaca coronária são ocasionadas pela elevação da PA. Essa condição foi responsável por cerca de 7,5 milhões de óbitos em 2004, representando 12,8% do total de mortes no mundo todo (World Health Organization – WHO, 2012). A Figura 1.1 e a Figura 1.2 apresentam os valores da pressão arterial sistólica para homens e mulheres em nível mundial.

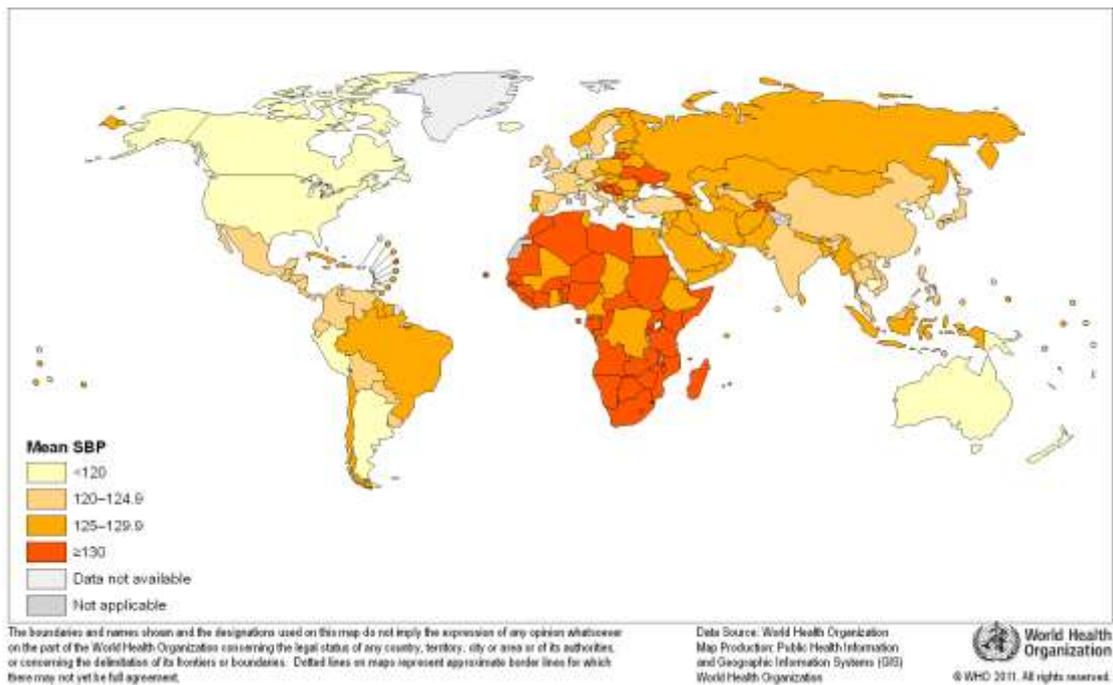


Figura 1.1. Mapa mundial representando o valor da pressão arterial sistólica em mulheres acima de 25 anos, no ano de 2008. (Fonte: World Health Organization, 2011).

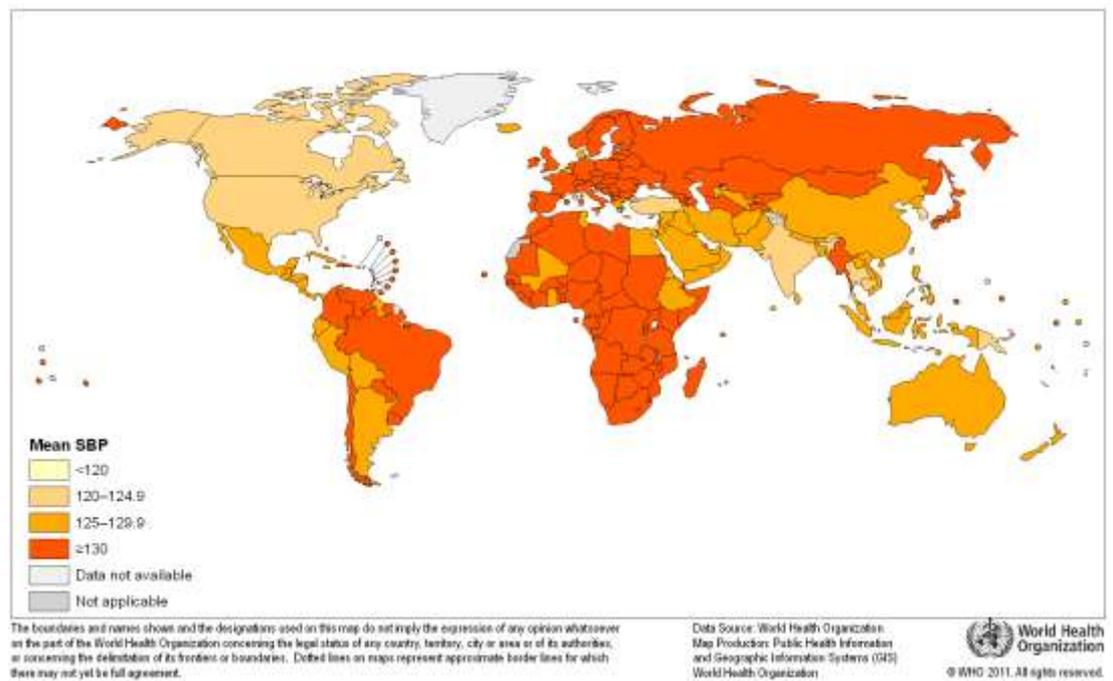


Figura 1.2. Mapa mundial representando o valor da pressão arterial sistólica em homens acima de 25 anos, no ano de 2008. (Fonte: World Health Organization, 2011).

Por apresentar uma grande carga de doenças decorrentes dela, a pressão arterial pode ser caracterizada como uma das causas de maior redução da qualidade e expectativa de vida dos seres humanos. Além disso, a HAS associa-se a altos custos socioeconômicos, uma vez que as doenças cardiovasculares corresponderam à primeira causa de hospitalização no setor público entre 1996 e 1999, sendo assim, um problema grave de saúde pública no Brasil e no mundo (Passos, 2006; Ferreira, 2009; Brasil, 2006).

Desse modo, são necessários uma eficaz identificação e tratamento da pressão arterial, objetivando a redução da morbidade e da mortalidade do paciente hipertenso. Os efeitos benéficos dos tratamentos que compreendem a diminuição da PA sobre os riscos de eventos cardiovasculares graves são bem estabelecidos e, basicamente, existem duas abordagens terapêuticas para a HAS. Essas abordagens devem ser escolhidas baseando-se no risco cardiovascular considerando a presença de fatores de risco, lesão em órgão-alvo e/ou doença cardiovascular estabelecida, e não apenas no nível da PA. O primeiro tratamento se baseia na modificação do estilo de vida, que inclui a perda de peso, incentivo às atividades físicas, alimentação saudável e outros. O segundo faz menção ao tratamento medicamentoso, utilizando agentes anti-hipertensivos que exercem sua ação terapêutica por diferentes mecanismos que interferem na fisiopatologia da hipertensão arterial. São eles: os diuréticos, inibidores adrenérgicos, vasodilatadores diretos, antagonistas do sistema renina-angiotensina e os bloqueadores dos canais de cálcio (Trialists' Collaboration, 2003; Brasil, 2006; Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2010).

1.2. Fármacos utilizados no tratamento da hipertensão

1.2.1. Sistema renina-angiotensina e os anti-hipertensivos antagonistas dos receptores de angiotensina II

O sistema renina-angiotensina (SRA) é um complexo sistema hormonal bem conhecido por seu papel fundamental no controle da pressão arterial e na homeostase dos líquidos corporais. Quando desregulado, é frequentemente associado a doenças cardiovasculares, tais como aterosclerose e hipertensão (Raposo-Costa & Reis, 2000; de Oliveira *et. al.*, 2003; Zhang *et.al.*, 2013)

Classicamente, o sistema renina-angiotensina pode ser visto como um sistema endócrino cuja substância ativa, a angiotensina II (Ang II) é a responsável pela maioria

dos efeitos fisiológicos, podendo agir tanto como um hormônio sistêmico (endócrino) ou ter sua ação localizada (parácrino, autócrino) (de Oliveira *et. al.*, 2003, Unger, 2002). Os componentes essenciais do SRA são: (i) a renina, uma enzima proteolítica sintetizada como pré-pró-renina, que é clivada em pró-renina, e posteriormente em renina ativa, responsável por catalisar a conversão proteolítica do angiotensinogênio em angiotensina I (Ang I); (ii) angiotensinogênio, é o principal substrato da renina e precursor da AngII; (iii) a enzima conversora de angiotensina (ECA), que converte AngI, um decapeptídeo, em AngII, um octapeptídeo, por clivagem dos dois aminoácidos carboxi-terminais; (iv) angiotensina II, é o peptídeo biologicamente ativo mais importante do sistema que pode, também, ser formada de outras maneiras. Independentemente da via pela qual foi formada, a Ang II medeia seus efeitos biológicos a fim de se ligar a receptores altamente específicos localizados na membrana celular e (v) receptores AT₁ e AT₂, responsáveis pelo início dos efeitos celulares da Ang II. A Figura 1.3 apresenta um esquema do funcionamento do sistema renina-angiotensina. No SRA, os receptores AT₁ são responsáveis por efeitos como a vasoconstrição, a retenção renal de sal e água, o controle osmolar central e a estimulação do crescimento celular. Já os receptores AT₂ são importantes para o desenvolvimento fetal, a inibição do crescimento celular e processos de diferenciação (Raposo-C & Reis, 2000; Rigatto *et. al.*, 2004; Griendling *et. al.*, 1993; Unger, 2002; Quiroz, 2006)

A inibição do receptor AT₁ se constitui em uma poderosa ferramenta para o controle da pressão arterial e processos adaptativos vasculares, prevenindo, assim, doenças cardiovasculares. Os fármacos antagonistas dos receptores de angiotensinas têm uma afinidade muito maior para receptores AT₁ que para AT₂ (da ordem de magnitude de 4 a 5 vezes) e, dessa forma, sua principal ação é o bloqueio dos AT₁, resultando em inibição da vasoconstrição e diminuição da síntese de aldosterona, que é um hormônio regulador de sódio e potássio no sangue (Quiroz, 2006; Ribeiro & Muscará, 2001). Dentro desses fármacos incluem o losartan, o valsartan e o telmisartan.

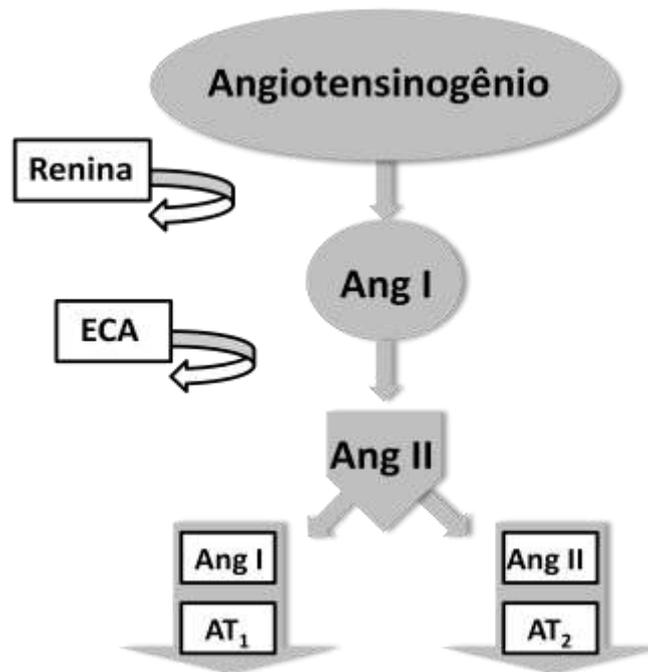


Figura 1.3. Esquema representativo do sistema renina-angiotensina (SRA): Ang I = angiotensina I; Ang II = angiotensina II; ECA = enzima conversora de angiotensina; AT₁ = receptor de angiotensina tipo1; AT₂ = receptor de angiotensina tipo 2. (Fonte: Unger, 2002. Adaptado.)

O losartan, 2-butil-4-cloro-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)[1,1'bifenil]-4-il]metil]-1H-imidazol-5-metanol, $C_{22}H_{23}ClN_6O$, apresentado na Figura 1.4(a), foi o primeiro antagonista do receptor de angiotensina II (ARA II) a ser utilizado como agente anti-hipertensivo (Prasaja *et al.*, 2009;). *In vitro*, compete com a Ang II pela ligação ao receptor AT₁ e a concentração que inibe 50% da ligação da Ang II (IC₅₀) é $8,4 \mu g L^{-1}$. A biodisponibilidade oral do losartan é de cerca de 33% e sua biotransformação resulta em um metabólito ativo, o losartan ácido-5-carboxílico, 2-Butil-4-cloro-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)[1,1'-bifenil]-4-il]metil]-1H-imidazole-5-ácido carboxílico, $C_{22}H_{21}ClN_6O_2$. Também conhecido como EX 3174, este é de 10 a 40 vezes mais potente que seu precursor, sendo responsável pela maior parte de sua atividade farmacológica, porém apresenta muito baixa biodisponibilidade oral. Ambos, losartan e metabólito, são excretados pelo rim e bile (Quiroz, 2006; Ribeiro & Muscará, 2001; Kolocouri et al., 2007). A Figura 1.4(b) mostra estrutura química do EX 3174.

O valsartan, ((S)-N-valeril-N-[29-(1H-tetrazol-5-il) bifenil-4-il)-metil]-valina), $C_{24}H_{29}N_5O_3$, cuja estrutura está representada na Figura 1.4(c), é um ARA II utilizado no

tratamento da hipertensão ao inibir a angiotensina II. Possui afinidade por receptores AT₁ maior que o losartan, reduzindo, então, significativamente a pressão sanguínea sistólica e diastólica e pode ser administrado isolado ou em combinação com outros anti-hipertensivos ou diuréticos. É rapidamente absorvido após administração oral, atingindo o pico de concentração plasmática entre 2-3 horas. Sua biodisponibilidade oral é de 25% com meia vida de eliminação igual a 6 horas, sendo minimamente metabolizado pelo fígado (~20%) e excretado, principalmente, como o fármaco original. O valsartan é convertido, por metabolismo de primeira passagem, em seu metabólito principal, valeril-hidroxi-valsartan, N-(1-oxo-4-hidroxipentil)-N-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)[1,1'-bifenil]-4-il]metil]-L-valina, C₂₄H₃₀N₅O₄, como mostra a Figura 1.4(d), via oxidação do C4 da função pentamida. Sua afinidade pelos receptores AT₁ é muito baixa, aproximadamente de 0,5% do valor do valsartan, fazendo com que o metabólito seja, essencialmente, inativo (Iriarte *et al.*, 2006; Blumer *et al.*, 2009; Ribeiro & Muscará, 2001; Croom & Keating, 2004; Black *et al.*, 2009; Deeks, 2004; Serebruany *et al.*, 2004).

Telmisartan, 4-((2-n-propil-4-metil-6-(1-metilbenzimidazol-2-il)-benzimidazol-1-il)metil)-bifenil-2-ácido carboxílico, C₃₃H₃₀N₄O₂, apresentado na Figura 1.4(e), é um ARA II, não peptídico, altamente seletivo para receptores AT₁, os quais são responsáveis pela vasoconstrição e retenção de sal e água no organismo. Este fármaco é oito vezes mais potente que o losartan (Chen *et al.*, 2005) e possui baixa solubilidade em água, dependente do pH, e permeabilidade alta após administração oral. Devido a sua natureza hidrofóbica, o telmisartan apresenta baixo perfil de dissolução nos fluidos gastrointestinais resultando em uma pequena absorção, distribuição e baixa biodisponibilidade (variando entre 42-58%). Porém, por ser um composto lipofílico, exibe uma vantagem de penetrar com maior facilidade nos tecidos (Kane & Kuschekar, 2010; Kausalya *et al.*, 2001; Dhole & Kuchekar, 2001). Menos de 2% do telmisartan, é metabolizado em telmisartan 1-O-acilglucoronídeo, 1-[4'-[(1',4-dimetil-2-propil[2',6-bi-1H-benzimidazol]-1-il)Metil][1,1'-bifenil]-2- carboxilato], C₃₉H₃₈N₄O₈, apresentado na Figura 1.4(f), seu principal metabólito, que representa 16% do fármaco circulante. Essa biotransformação acontece no fígado e a principal via de eliminação de ambos é a excreção biliar-fecal (Schupp & Unger, 2005; Seelam *et al.*, 2010; Sharpe *et al.*, 2001). Em camundongos, o telmisartan 1-O-acilglucoronídeo não apresenta atividade antagonista de angiotensina II significativa em comparação com o fármaco de origem. Além disso, também não possui efeitos na hemodinâmica ou no aumento da pressão

arterial induzida e, sendo assim, é desprovido de qualquer efeito sobre o sistema vascular (Sharpe *et al.*, 2001; Wienen *et al.*, 2000).

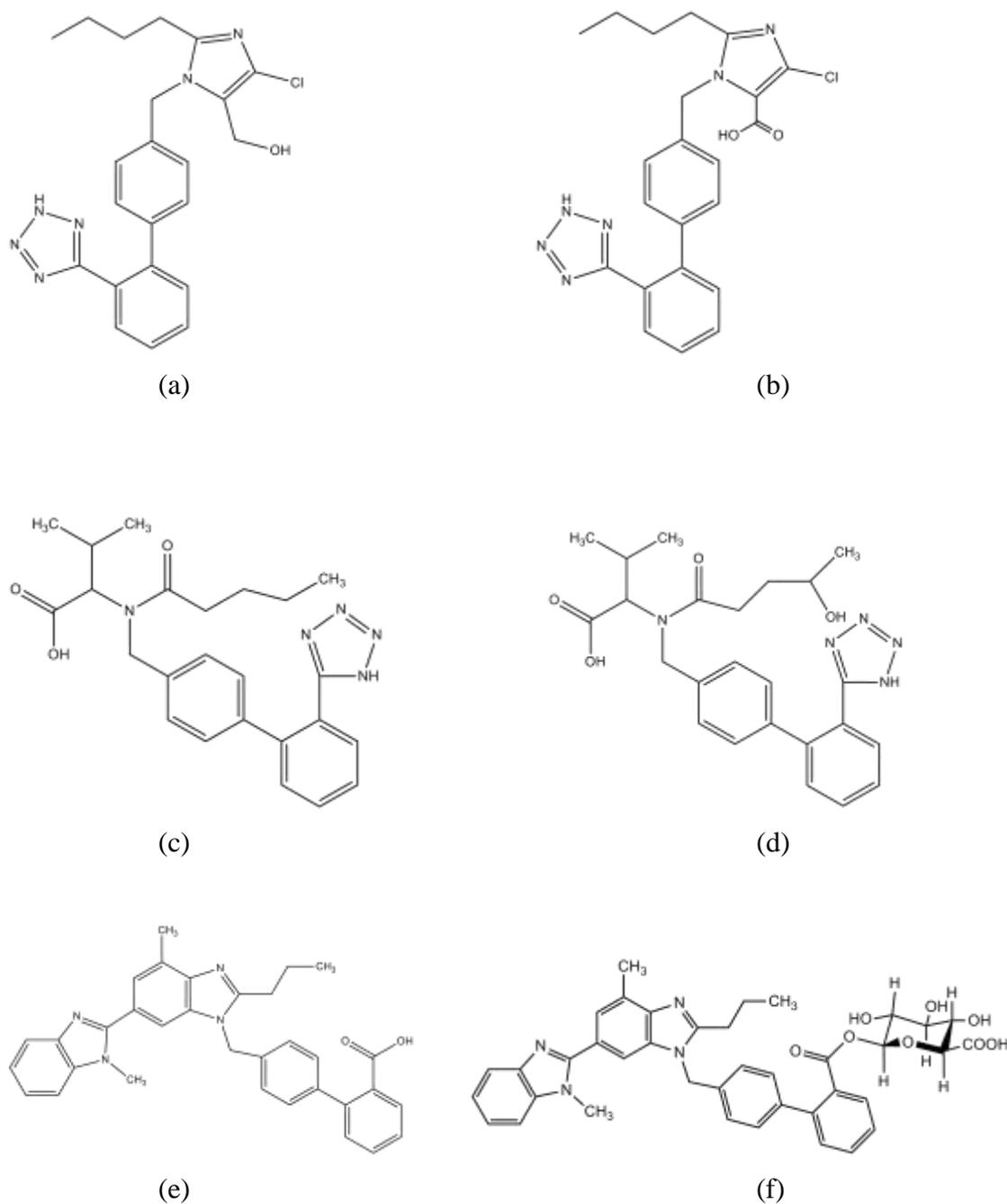


Figura 1.4. Estrutura química dos compostos: (a) losartan, (b) losartan ácido-5-carboxílico (Fonte: Kolocouri *et al.*, 2007. Adaptado), (c) valsartan, (d) valeril-hidroxi-valsartan (Fonte: Serebruany *et al.*, 2004. Adaptado), (e) telmisartan (Fonte: Chen *et al.*, 2005), (f) telmisartan 1-O-acilglucoronídeo (Fonte: Ebgner *et al.*, 1999).

1.2.2. Diuréticos tiazídicos

Os diuréticos são a classe de fármacos anti-hipertensivos mais utilizada em decorrência da sua atividade terapêutica e de seu custo baixo. Esses compostos agem, preferencialmente, inibindo o transporte de sódio e cloro nos rins, com consequente redução do volume plasmático e extracelular, porém o mecanismo exato de ação desses compostos ainda não é completamente compreendido. A hidroclorotiazida, 6-cloro-1,1-dioxo-3,4-diidro-2H-1,2,4-benzotiadiazina-7-sulfonamida, de fórmula molecular $C_7H_8ClN_3O_4S_2$, é um dos diuréticos mais comumente utilizados na prática clínica, seja em monoterapia ou em associação com outros anti-hipertensivos (Pimenta, 2008; Deeks, 2009). Sua estrutura está representada na Figura 1.5. A ação diurética desse fármaco começa duas horas após administração oral, chegando ao máximo em 4 horas e podendo continuar até um total de 6 a 12 horas, sendo que a eliminação é feita por via renal (Deeks, 2009, Maillard, 2005). A terapia utilizando hidroclorotiazida é associada com o aumento da atividade da renina no plasma, secreção da aldosterona, perda de potássio na urina e redução do nível de potássio no soro sanguíneo, sendo que essas duas últimas condições podem ser revertidas com o uso concomitante de um antagonista do receptor de angiotensina II (Deeks, 2009).

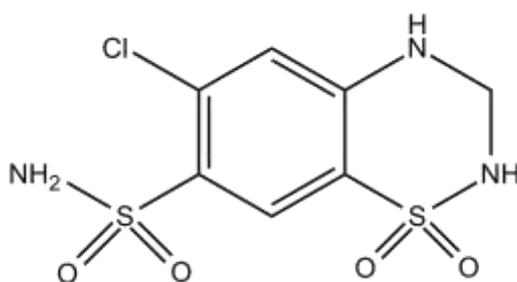


Figura 1.5. Estrutura química da hidroclorotiazida (Fonte: Kolocouri *et al.*, 2007. Adaptada.).

A combinação de agentes anti-hipertensivos, principalmente quando estes agem por dois mecanismos diferentes, é comum para se atingir o objetivo de diminuição da pressão arterial. Assim, a adição de doses pequenas de diuréticos tem se mostrado eficiente no tratamento de pacientes onde a monoterapia é falha (Kolocouri *et al.*, 2007).

1.3. Determinação de anti-hipertensivos antagonistas do receptor da angiotensina II

O desenvolvimento e otimização de metodologias analíticas que são capazes de realizar a identificação e quantificação de compostos anti-hipertensivos antagonistas do receptor da angiotensina II é bastante relevante no controle de qualidade e estudos farmacocinéticos. Vários métodos tem sido propostos e apresentados na literatura para a determinação desses fármacos e seus metabólitos, incluindo a cromatografia de fluido supercrítico (SFC, do inglês, *Super Fluid Chromatography*), a eletroforese capilar (CE, do inglês, *Capillary Electrophoresis*), entre outros. Entre estes métodos, está incluída a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*) acoplada à espectrometria de massas, que proporciona alta sensibilidade, seletividade e exatidão (CHOI *et al.*, 2008).

A Tabela 1.1 apresenta uma compilação de trabalhos encontrados na literatura que utilizaram a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS, do inglês, *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*) para determinação, simultânea ou não, de anti-hipertensivos. As matrizes consistiram, principalmente, em amostras de plasma humano ou de ratos, bem como amostras resultantes de estudos de permeação em células Caco-2, para estudo de absorção e permeabilidade de fármacos.

Tabela 1.1. Compilação de trabalhos utilizando a técnica LC-MS para determinação de anti-hipertensivos em diferentes matrizes.

Referência	Matriz	Técnica	Objetivo
Soldner et al., 2000	Solução salina tamponada de Hank (do inglês, <i>Hank's Buffered Salt Solution</i>)	LC-MS/MS	Utilização de células Caco-2 para caracterização do transporte transcelular do losartan e seu metabólito.
Hakala et al., 2003	Solução salina tamponada de Hank (do inglês, <i>Hank's Buffered Salt Solution</i>)	LC-ESI-MS/MS e LC-APPI-MS/MS	Comparar as duas técnicas de ionização para análise simultânea de compostos de referência (incluindo a hidroclorotiazida) em estudos de permeabilidade em células Caco-2
Chen et al., 2005	Plasma humano	LC-ESI-MS	Desenvolvimento e validação um método para determinação do telmisartan.
Young et al., 2006	Solução salina tamponada de Hank (do inglês, <i>Hank's Buffered Salt Solution</i>)	LC-UV LC-MS	Avaliação da permeabilidade, em células Caco-2, de diferentes fármacos (incluindo losartan e valsartan) que contém uma porção tetrazólica, para avaliação do efeito da estrutura e da carga dos compostos.

Kristoffersen <i>et al.</i> , 2007	Amostras de sangue oriundas de autópsia forense	HPLC-ESI-MS	Determinação simultânea de fármacos beta bloqueadores, antagonistas de cálcio, antagonistas de angiotensina II e antiarrítmicos.
Kolocouri <i>et al.</i> , 2007	Plasma humano	LC-ESI-MS/MS	Determinação simultânea do losartan, seu metabólito e hidroclorotiazida.
Ferreirós <i>et al.</i> , 2007	Plasma humano	LC-ESI-MS/MS	Quantificação simultânea de antagonistas do receptor de angiotensina II (valsartan, irbesatan, losartan e seu metabólito, eprosartan, candesartan e telmisartan)
Zhu <i>et al.</i> , 2008	Plasma de ratos	HPLC-ESI-MS/MS	Determinação simultânea de vários antagonistas do receptor de angiotensina II.
Choi <i>et al.</i> , 2008	Plasma humano	LC-ESI-MS	Determinação de losartan
Shah <i>et al.</i> , 2009	Plasma humano	LC-MS/MS	Análise simultânea de telmisartan e hidroclorotiazida

Salvadori et al., 2009	Plasma humano	HPLC-ESI-MS/MS	Determinação simultânea de losartan e hidroclorotiazida, utilizando valsartan e clortalidona como padrão interno, respectivamente.
Prasaja <i>et al.</i> , 2009	Plasma humano	LC-ESI-MS/MS	Desenvolvimento e validação de um método para quantificação do losartan e seu metabólito, utilizando irbersatan como padrão interno.
Gonzales et al., 2010	Plasma humano	LC-ESI-MS/MS	Análise simultânea de anti-hipertensivos utilizados em combinação (atenolol, bisoprolol, hidroclorotiazida, clortalidona, ácido salicílico, enalapril e seu metabólito enalaprilato, valsartan e fluvastatina).

1.4. Dispositivos de liberação controlada de fármacos e as ciclodextrinas

Do ponto de vista da otimização da farmacoterapia, a liberação de um composto farmacêutico deveria ser controlada de acordo com a proposta terapêutica e as propriedades farmacológicas das substâncias ativas. A eficácia terapêutica é substancialmente influenciada pela liberação apropriada do fármaco e então, com o objetivo de se projetar maiores avanços na forma de dosagem, vários tipos de materiais carreadores estão sendo desenvolvidos para distribuir, de maneira eficiente e precisa, a quantidade necessária do fármaco ao sítio alvo e pelo período de tempo necessário (Hirayama & Uekama, 1999; Quiroz, 2006).

Nos últimos anos, tem sido utilizados diversos sistemas de administração de fármacos com o objetivo de modelar a cinética de liberação, melhorar a absorção ou aumentar a estabilidade do fármaco. O termo “liberação controlada de fármacos” se relaciona a esta tecnologia utilizada quando é necessário o aperfeiçoamento da liberação de um fármaco, sendo que o controle da taxa de liberação e o perfil de liberação com o tempo são as duas características mais desejadas em um carreador (Sousa, 2009; VYAS *et al.*, 2008; Sinisterra *et al.*, 2002).

Como carreadores dos princípios ativos existem as composições poliméricas, os lipossomas, as emulsões e as múltiplas emulsões (Sinisterra *et al.*, 2002). Neste contexto, inserem-se também as ciclodextrinas (CD) que são compostos pertencentes à classe dos oligossacarídeos cíclicos constituídos por unidades glicosídicas. Cada monômero possui conformação na forma de cadeira, como mostra a Figura 1.6, e suas unidades são unidas por ligações do tipo α (1-4). As três principais ciclodextrinas (α -, β - e γ -ciclodextrina) se diferenciam pela quantidade de monômeros em sua estrutura, tendo, respectivamente, 6, 7 e 8 unidades glicosídicas, como apresentado na Figura 1.7 (Sousa, 2010).

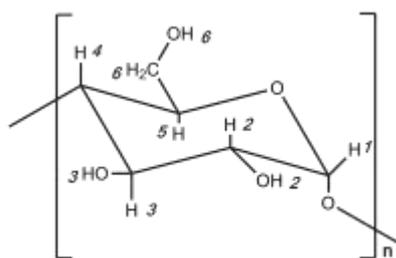


Figura 1.6. Fórmula estrutural da unidade glicosídica da ciclodextrina na conformação cadeira. (Fonte: Sousa, 2007. Adaptado.)

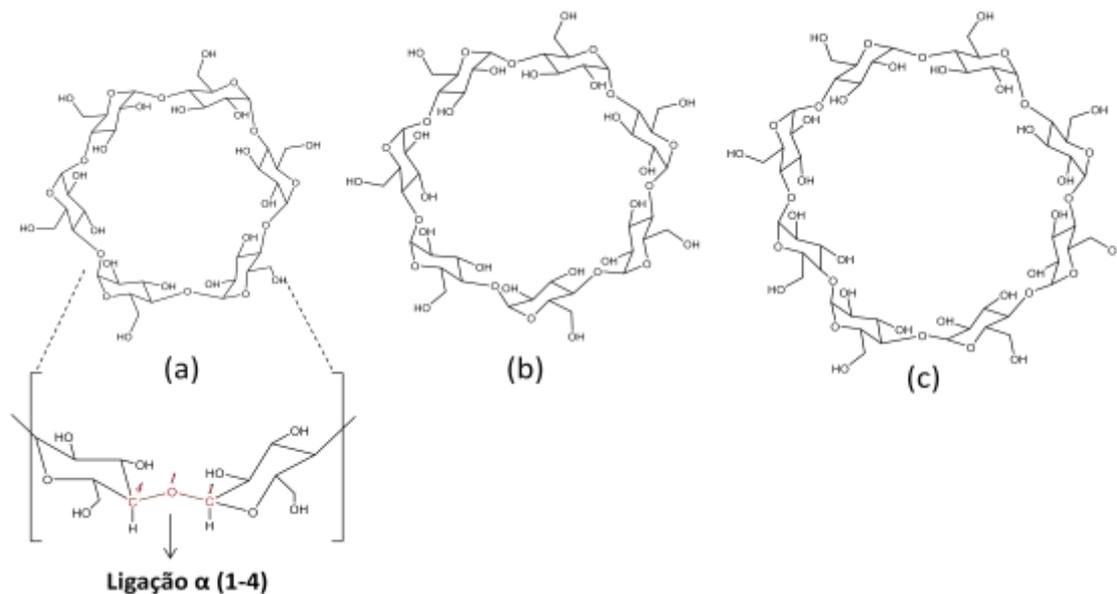


Figura 1.7. Representação estrutural da: (a) α -ciclodextrina, (b) β -ciclodextrina e (c) γ -ciclodextrina. (Fonte: Sousa, 2010. Adaptado.)

As ligações glicosídicas (C1-O1-C4), ressaltada em vermelho na Figura 1.7(a), fazem com que as ciclodextrinas possuam uma estrutura relativamente rígida, que não é perfeitamente simétrica. A geometria das ciclodextrinas é comumente descrita como sendo a de um cone truncado. Como consequência desta conformação, as hidroxilas primárias (OH6) estão situadas na borda de menor diâmetro enquanto que as hidroxilas secundárias (OH2 e OH3) estão localizadas na borda de maior diâmetro do cone, como esquematizado na Figura 1.8. Embora estas hidroxilas localizadas na parte externa da CD estejam comprometidas efetuando ligações de hidrogênio, as CDs possuem um alto poder de solvatação, conferindo um caráter hidrofílico à região externa da molécula. Na parte interior da CD estão presentes os hidrogênios (CH3 e CH5) e ainda os grupos (C1-O1-C4) (Sousa, 2010).

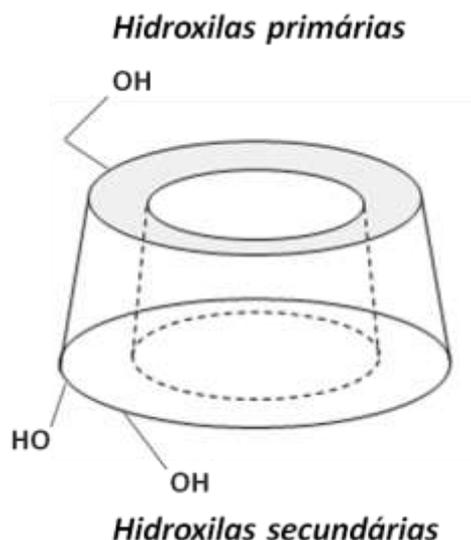


Figura 1.8. Representação esquemática da β-ciclodextrina. (Fonte: Hirayama & Uekama, 1999. Adaptado.)

Devido à capacidade de formar complexos de inclusão em sua cavidade interior e muitas outras propriedades favoráveis, as CDs tem sido amplamente aplicadas em estudos de sistemas de liberação de fármacos. Entre essas propriedades, podemos citar o aumento da solubilização, a estabilização dos fármacos, mudança na sua taxa de liberação e absorção através de barreiras biológicas (Li & Loh, 2008; Vyas *et al.*, 2008). Além disso, as ciclodextrinas podem formar complexos no estado líquido ou sólido (Hirayama & Uekama, 1999), podem ser utilizadas para diminuir a irritação causada pelo fármaco, uma vez que são requeridas doses terapêuticas menores como consequência do aumento da solubilidade (Vyas *et al.*, 2008) e seus efeitos tóxicos são de caráter secundário, podendo ser eliminados na escolha apropriada da CD ou seus derivados (Szetjli, 1998). Assim, o uso das CD é uma maneira prática e econômica de melhorar as propriedades físico-químicas e farmacológicas das moléculas administradas. (Vyas *et al.*, 2008).

1.5. Células Caco-2 como modelo de determinação da absorção de fármacos

A maioria das drogas ministradas oralmente é absorvida através da mucosa intestinal por difusão passiva, tendo que atravessar várias barreiras, sendo a mais significativa, a camada de células epiteliais do intestino. Esses compostos, para poderem ter este tipo de administração, devem possuir adequada solubilidade aquosa e

permeabilidade intestinal, de forma a atingir sua concentração terapêutica na circulação sistêmica. Assim, para investigar essas propriedades, são feitos estudos de biodisponibilidade para tais compostos (Artusson & Karlsson, 1991; Souza et al., 2007).

Para a determinação da biodisponibilidade e permeabilidade de produtos farmacêuticos, utilizam-se modelos *in vitro*, que permitem a monitoração por meio da quantificação da fração do fármaco dissolvido ou *in vivo*, pela concentração plasmática, ambos em função do tempo. Muitos dos estudos realizados *in vitro* para o exame do transporte através do epitélio intestinal utilizam modelos como intestino invertido, tecidos animais, células isoladas e segmentos intestinais. No geral, esses sistemas podem apresentar problemas como viabilidade e polaridade do tecido utilizado e, no caso da utilização de segmentos e tecidos de diferentes animais, foi observada significativa diferença morfológica e funcional entre os modelos animais e os enterócitos (célula epitelial da camada superficial do intestino delgado e intestino grosso) humanos. Logo, de modo alternativo, vem sendo estudadas metodologias que empregam uma monocamada de células epiteliais do intestino como modelo de absorção do fármaco, como as células Caco-2, por exemplo (Souza *et al.*, 2007; Hilgers *et al.*, 1990).

As células Caco-2 são extraídas de adenocarcinoma de cólon humano. Durante sua cultura em filtros permeáveis e porosos, elas se diferenciam espontaneamente em enterócitos, formando uma membrana composta de células em monocamada aderidas por junções e apresentam como vantagem a rápida multiplicação celular (Souza *et al.*, 2007).

No intestino, a parede interna é recoberta por uma única camada de células epiteliais, formando uma barreira seletiva para a absorção dos nutrientes, fármacos e demais xenobióticos dissolvidos no líquido gastrointestinal. Assim, através da reconstituição adequada de uma monocamada diferenciada *in vitro*, este modelo celular pode ser utilizado para prever a absorção oral de fármacos por transporte passivo (transcelular e paracelular) em humanos. Eles auxiliam na pesquisa de moléculas que apresentem potencial terapêutico, pois possibilitam prever sua absorção *in vivo* contribuindo para triagem de moléculas previamente aos estudos pré-clínicos. Porém existem algumas limitações na aplicação de células Caco-2 para avaliar a absorção. Por exemplo, o número reduzido de transportadores (como peptídeos: PEPT 1 e PEPT 2); a baixa permeabilidade de compostos hidrofílicos; os danos causados à membrana devido à presença de co-solventes no sistema; a aderência física do fármaco ao filtro de

policarbonato, apresentando reduzida permeação e o elevado tempo de crescimento das células Caco-2 (Kratz, 2001; Souza *et al.*, 2007).

Para tal aplicação experimental, as células são cultivadas por pelo menos 20 dias a fim de se formar uma monocamada de células diferenciadas sobre um filtro poroso permeável. A Figura 1.9 apresenta um esquema do sistema utilizado em estudos de permeação. O filtro, que consiste em material inerte, como o policarbonato, deve possuir poros com diâmetro de até 0,4 mm para evitar a migração celular do lado apical para o basolateral. Este tempo de cultivo é necessário para garantir a formação de junções oclusivas, obtenção da polaridade celular e alta expressão de transportadores da membrana. (Bohets *et al.*, 2001; Kratz, 2001).

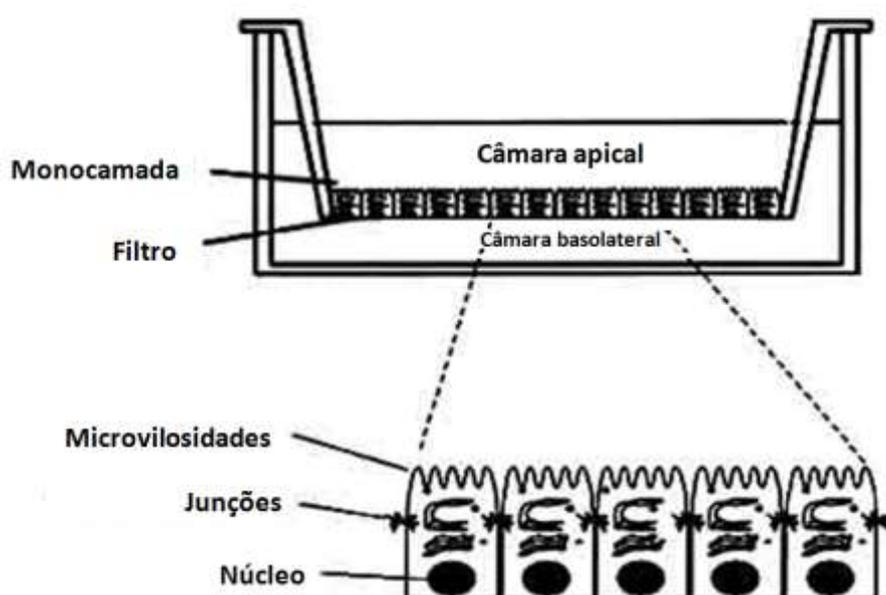


Figura 1.9. Representação esquemática do experimento de permeabilidade utilizando o modelo de células Caco-2 (Fonte: Bohets *et al.*, 2001. Adaptado.).

Para experimentos de transporte, os compostos em teste são adicionados no lado apical da monocamada e recolhidos no lado basolateral, e sua taxa de passagem para a outra câmara pode ser medida por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a diferentes detectores, como o espectrômetro de massas (Kratz, 2001).

Assim, a utilização de células Caco-2 como modelo *in vitro* de permeabilidade, quando corretamente empregado e monitorado, é capaz de fornecer informações valiosas sobre a permeabilidade de fármacos, sendo aceito pela indústria farmacêutica e

agências regulatórias internacionais como ensaio padrão para predição da absorção oral (Kratz, 2001).

1.6. Espectrometria de massas

A Espectrometria de Massas (MS, do inglês, *Mass Spectrometry*) é uma das técnicas com maior importância na análise molecular devido ao seu potencial em fornecer informações de massa molar, assim como sobre a estrutura do analito (Collins, 2006). Essa técnica consiste na formação de íons na fase gasosa que, posteriormente, são selecionados através de sua razão massa/carga. O processo de formação dos íons na fase gasosa pode ser considerado o mais importante da espectrometria de massas e, geralmente, requer duas etapas: a vaporização e a ionização, que podem ocorrer sequencialmente ou de forma simultânea. Essas duas etapas acontecem somente com o suprimento de energia e, em análises de compostos orgânicos, a energia da fonte deve ser suficientemente baixa para não promover quebras intramoleculares e assim gerar íons gasosos a partir da estrutura intacta da molécula (Dulcks & Juraschek, 1999; Magalhães, 2012).

Antes do desenvolvimento da técnica de ionização por *electrospray* (ESI, do inglês, *Electrospray Ionization*), as tentativas de aumentar a sensibilidade e precisão de métodos de espectrometria de massas para a análise de moléculas orgânicas grandes de interesse na biologia e na medicina foram frustradas, pois é grande a dificuldade de transformar essas moléculas em íons na fase gasosa sem que sofram fragmentação. Não se pode aplicar os métodos clássicos que são baseados no encontro das moléculas (na fase gasosa) a serem ionizadas com elétrons, na ionização por elétrons; com fótons, na fotoionização ou com íons, como na ionização química (Fenn *et al.*, 1989).

A técnica de ionização por *electrospray* (ESI) se mostra aplicável, como demonstraram Yamashita e Fenn em 1984, como um método de ionização branda para a espectrometria de massas (Yamashita & Fenn, 1984), pois supre a limitação dos outros métodos nos estudos de biomoléculas com alto peso molecular e outros compostos lábeis e não voláteis (Pavia *et al.*, 2010)

Na ESI, uma solução contendo as moléculas da amostra é borrifada na ponta de um tubo capilar fino para dentro de uma câmara aquecida, em pressão quase atmosférica. O campo elétrico na ponta do capilar age sobre os íons em solução, criando uma separação de cargas entre ânions e cátions. Forças eletrostáticas agindo sobre os

íons positivos levam à formação do cone de Taylor e, quando esta excede a tensão superficial, um jato de gotículas com alta densidade de carga é ejetado da ponta do cone para o contra eletrodo. As gotículas carregadas, então, enfrentam um contrafluxo de um gás de secagem (em geral, nitrogênio) que evapora as moléculas do solvente. Assim a densidade de carga de cada gotícula aumenta até que as forças repulsivas eletrostáticas excedam a tensão superficial (o limite de Rayleigh), quando então a gota inicial se divide em gotículas menores. O processo continua até que íons da amostra, livres de solvente, sejam deixados na fase gasosa (Maxwell & Chen, 2008; Pavia *et al.*, 2010). A Figura 1.10 mostra o esquema da ionização por *electrospray*.

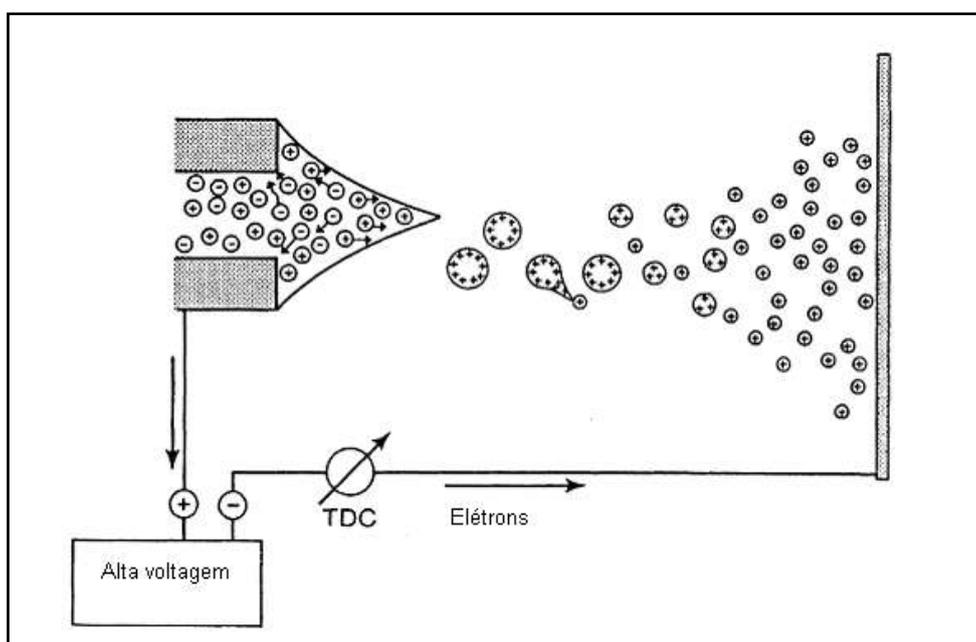


Figura 1.10. Representação esquemática da técnica ESI (Magalhães, 2012).

Uma vez ionizada a amostra, o feixe de íons é acelerado por um campo elétrico e direcionado para o analisador de massas, onde acontece a separação com base em sua razão carga/massa (m/z) e subsequente detecção.

O analisador de massas por tempo de voo (TOF, do inglês *time-of-flight*), baseia-se no princípio de que as velocidades de dois íons gerados no mesmo instante, com a mesma energia cinética, irão variar de acordo com a massa dos íons, ou seja, o íon mais leve será mais rápido (Pavia *et al.*, 2010). Estes analisadores consistem basicamente de tubos metálicos sob vácuo e isolados do campo externo. Íons são inicialmente acelerados em direção ao detector por meio de um potencial repulsivo aplicado em um

dispositivo localizado no início do TOF. O tempo que um íon demora a alcançar o detector é proporcional à raiz quadrada da m/z , ou seja, quanto maior o íon, mais tempo ele leva para percorrer o comprimento do tubo (Iglesias, 2012).

A Figura 1.11 mostra a representação esquemática do funcionamento de um espectrômetro de massas com analisador do tipo TOF. Esta representação faz parte do sistema usado neste trabalho e consiste em um analisador do tipo *tandem ion-trap – time-of-flight*. Este sistema contém uma fonte de ionização electrospray e dois analisadores de massas: aprisionador de íons (IT, do inglês, *ion-trap*) e TOF. O acoplamento da ionização a pressão atmosférica com os analisadores de massas sequenciais *ion trap* (IT) e tempo de voo (TOF) permitem a obtenção de alta exatidão de massa e alta resolução (10.000 a 1000 m/z). O equipamento disponibiliza ainda a capacidade de fragmentações sequenciais do tipo MS^n (MS/MS, MS/MS/MS, etc.) utilizando o método de dissociação por colisão induzida por argônio no *ion-trap* e também a capacidade de realizar medições de massas com alta resolução e alta precisão no TOF, proporcionando uma grande seletividade e especificidade dos íons (Silva, 2010).

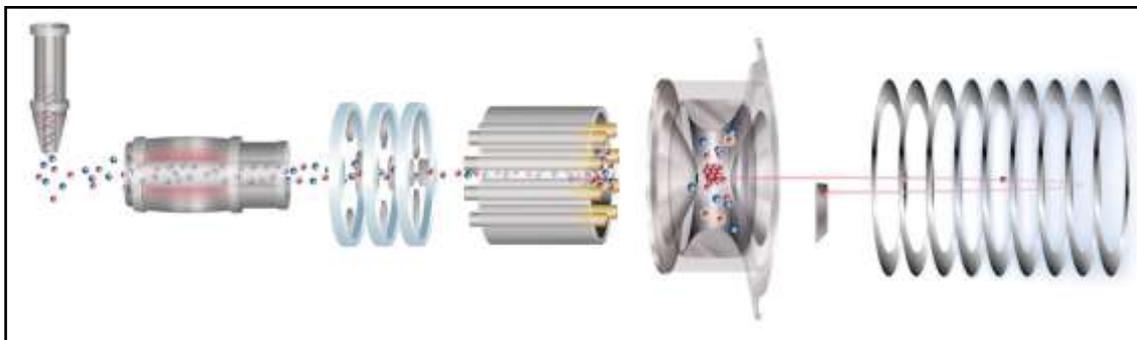


Figura 1.11. Representação esquemática do funcionamento do espectrômetro de massas *ion-trap – time-of-flight* (Fonte: Shimadzu, 2007).

1.7. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS)

A cromatografia pode ser combinada com diferentes sistemas de detecção e assim se tornar uma das técnicas analíticas com maior utilização e melhor desempenho. O acoplamento da cromatografia líquida – que é normalmente utilizada para compostos não voláteis ou incompatíveis com a cromatografia gasosa – com a espectrometria de massas combina as vantagens de ambas as técnicas. Porém, esse acoplamento é

delicado, uma vez que é necessária a geração de íons na fase gasosa para serem analisados pela EM (Hoffmann & Stroobant, 2007).

Algumas incompatibilidades são encontradas quando se utiliza a LC-MS (Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês, *Liquid Chromatography–Mass Epectrometry*) e assim foi necessário o desenvolvimento de interfaces e formas de ionização alternativas. As interfaces surgiram pela necessidade de se eliminar toda ou, pelo menos, uma quantidade significativa da fase móvel, pois as vazões utilizadas na cromatografia líquida de alta eficiência são relativamente grandes (próximas a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$), de maneira que não é possível bombear o eluente de um cromatógrafo líquido diretamente para o interior da fonte do espectrômetro, que opera a pressões de cerca de $1,3 \times 10^{-4} \text{ Pa}$. Além disso, os compostos que são separados por cromatografia líquida são, muitas vezes, pouco voláteis e/ou sensíveis à temperatura, impossibilitando o uso das técnicas de ionização comumente aplicadas (Chiaradia et al., 2008). Diferentes formas de ionização foram utilizadas ao longo do tempo, sendo que as mais empregadas são a ESI, fotoionização à pressão atmosférica (APPI) e a ionização química à pressão atmosférica (APCI), com maior destaque à ESI (Hoffmann & Stroobant, 2007; Chiaradia et al., 2008).

Para a aquisição de dados, o espectrômetro de massas é geralmente utilizado de dois modos: varredura completa (do inglês, *full scan*) e monitoramento seletivo de íons (SIM, do inglês *selected-ion monitoring*). No modo de varredura completa, o espectro completo é medido repetidamente entre dois valores extremos de massa e, durante um intervalo de tempo, todos os íons que atingem o detector são contabilizados. Para aumentar a sensibilidade pode-se reduzir faixa de massas analisadas ou aumentar intervalo de tempo de aquisição. No primeiro caso, pode-se perder alguma informação analítica e, no segundo, é possível que não se obtenha um bom espectro de massas ou mesmo, dois compostos eluídos no mesmo pico podem não ser deconvoluídos. No modo SIM, o detector de massas é ajustado para que sejam observados apenas os íons de razão m/z de interesse, ou seja, a análise visa detectar compostos alvo, com características espectrais conhecidas. Este modo de aquisição proporciona uma máxima seletividade (Hoffmann & Stroobant, 2007; Chiaradia et al., 2008).

Como principais vantagens, o acoplamento LC-MS apresenta a alta seletividade, quando opera no modo de monitoramento de íon selecionado, o qual permite a quantificação de picos sobrepostos; ter boa detectabilidade; avaliar a pureza do pico;

confirmar a presença do analito mediante a informação da massa molar e estrutural, sendo essa a característica mais relevante.

1.8. Processos de validação para métodos analíticos

1.8.1. Relevância

Atualmente, é grande a necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade. Dados analíticos que não são confiáveis podem, por exemplo, induzir decisões precipitadas e acarretar prejuízos financeiros. Como garantia de que um método analítico a ser desenvolvido forneça informações confiáveis e passíveis de interpretação, ele deve se submeter a uma avaliação denominada validação (Ribani *et al.*, 2004). A validação de um método analítico tem como objetivo demonstrar que o mesmo é adequado aos objetivos propostos, ou seja, que os parâmetros de desempenho analisados atendem aos critérios de aceitação preconizados, garantindo a qualidade metrológica dos resultados analíticos (Brasil - MAPA, 2011).

Algumas considerações devem ser feitas ao iniciar o processo de validação. É essencial que os estudos de validação sejam representativos e conduzidos de modo que a variação da faixa de concentrações seja adequada às amostras analisadas. Além disso, os parâmetros analíticos devem ser baseados na intenção do uso do método, podendo incluir diferentes tipos de equipamentos e laboratórios em que o método será utilizado. Existem várias instituições que possuem guias e resoluções acerca do processo de validação, como: EURACHEM, MAPA, INMETRO entre outras. Assim, os experimentos de validação podem ser limitados ao que realmente é necessário (Ribani *et al.*, 2004)

Para a realização da validação, os parâmetros analíticos normalmente avaliados são: seletividade, efeito de matriz, linearidade, faixa de trabalho e faixa linear, precisão, veracidade/tendência, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

1.8.2. Parâmetros de validação

1.8.2.1. Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (Brasil - ANVISA, 2005). A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição aumentando ou reduzindo o sinal analítico, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração. Desse modo, a seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do analito de interesse. Além disso, se a seletividade não for verificada, outros parâmetros, como a linearidade, a exatidão e a precisão, podem ser comprometidos (Brasil - INMETRO, 2011; Ribani *et al.*, 2004).

Para a avaliação da seletividade são descritos experimentos que envolvem ensaios com padrões ou materiais de referência, amostras com e sem o analito e, também, a capacidade de identificação do composto de interesse na presença de interferentes. Na ausência da disponibilidade de interferentes, sugere-se a avaliação da habilidade de medição do analito por diferentes métodos, técnicas ou por meio de variações nas condições experimentais (Brasil - INMETRO, 2011).

1.8.2.2. Linearidade

A linearidade é a capacidade do método em gerar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo específico (Brasil - MAPA, 2011). Na maioria dos casos, a relação matemática entre o sinal analítico e a concentração do composto de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para concentrações conhecidas deste composto. Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada curva analítica (Ribani *et al.*, 2004).

A equação da reta que relaciona as duas variáveis, concentração conhecida do composto e sinal analítico medido, é:

$$y = ax + b \text{ (Equação 1.1)}$$

onde:

y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

x = concentração;

a = interseção com o eixo y, quando $x = 0$;

b = inclinação da curva analítica = sensibilidade.

Para a determinação da linearidade, são necessários, geralmente, no mínimo cinco níveis de concentrações, preparados em três replicatas independentes ou no número mais próximo possível daquele empregado na rotina do laboratório. A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito e verificada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados (Brasil - INMETRO, 2011).

1.8.2.3. Faixa de trabalho e faixa linear

A faixa de trabalho corresponde ao intervalo entre o valor superior e inferior da substância em estudo, que atenda aos requisitos de precisão e exatidão, ou seja, intervalo no qual o método pode ser aplicado. Geralmente, seu limite inferior corresponde ao limite de quantificação e o limite superior se baseia nas restrições impostas por efeitos dependentes do sistema de detecção do aparelho (Ribani *et al.*, 2004; Souza (b), 2007; Brasil - MAPA, 2011).

Já a faixa linear, é o intervalo de concentração onde o método produz respostas da medição proporcionais à concentração e ela, normalmente, está contida dentro da faixa de trabalho (Souza (b), 2007).

1.8.2.4. Efeito de matriz

O efeito de matriz é um estudo que tem como objetivo investigar possíveis interferências causadas por substâncias que estão presentes na matriz amostral. Esses interferentes podem causar uma diminuição ou aumento do sinal analítico. Esse tipo de estudo é necessário quando se deseja utilizar uma curva de calibração do analito em solvente, ou seja, em uma curva de calibração não matrizada (Brasil - MAPA, 2011). Caso este efeito seja detectado, curvas analíticas matrizadas devem ser adotadas no experimento.

Segundo o Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica do MAPA (2011), para o cálculo do efeito de matriz, pode-se aplicar o teste F (Fischer-Snedecor), que compara as variâncias das replicatas em cada nível de concentração, verificando se as variâncias das amostras não matrizadas e aquelas construídas na matriz, podem ser consideradas estatisticamente iguais. Assim, aplica-se o seguinte cálculo para cada nível de concentração, comparando as amostras não matrizadas e as matrizadas:

$$F_{calc} = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad \text{(Equação 1.2)}$$

Onde s_1^2 e s_2^2 são as variâncias das replicatas das amostras não matrizadas e matrizadas, em cada nível de concentração, com a maior variância no numerador.

Se as variâncias forem estatisticamente iguais, é aplicado um determinado teste para comparação das médias, caso contrário, aplica-se um outro teste estatístico, como exposto a seguir.

Primeiramente, assumem-se duas hipóteses (H_0 e H_1):

- $H_0: s_1^2 = s_2^2$ ($F_{calculado} < F_{tabelado}$) → As variâncias são estatisticamente iguais.
- $H_1: s_1^2 \neq s_2^2$ ($F_{calculado} > F_{tabelado}$) → As variâncias são estatisticamente diferentes.

Quando obtém-se $F_{calculado} < F_{tabelado}$, as variâncias podem ser consideradas estatisticamente iguais e, então, procede-se com o seguinte teste t de Student:

$$t_{calc} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{s^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} \quad \text{(Equação 1.3)}$$

Sendo \bar{x}_1 e \bar{x}_2 as médias das concentrações do analito em amostras matrizadas (matriz fortificada) e analito em solvente puro, respectivamente, em cada nível de concentração.

Onde s^2 é calculado por:

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)} \quad \text{(Equação 1.4)}$$

Sendo: n_1 e n_2 os números de replicatas nas amostras 1 e 2 (não matrizada e matrizada ou vice-versa), com $(n_1 + n_2 - 2)$ graus de liberdade (v) de t .

Por outro lado, se $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$, considera-se as variâncias estatisticamente diferentes e verifica-se o efeito de matriz com a distribuição t de Student, utilizando a Equação 1.5.

$$t_{\text{calc}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad \text{(Equação 1.5)}$$

Neste caso, para obtenção do valor de t tabelado, o número de graus de liberdade é dado por:

$$\nu = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1 + 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2 + 1}} - 2 \quad \text{(Equação 1.6)}$$

Como critérios de aceitação do efeito de matriz, tem-se que:

- Se $t_{\text{calculado}}$ pelas equações 1.3 ou 1.5 for menor que t_{tabelado} , pode-se concluir que a matriz não afeta o ensaio.
- Se $t_{\text{calculado}}$ pelas equações 1.3 ou 1.5 for maior que t_{tabelado} , conclui-se que a matriz tem um efeito estatisticamente significativo sobre o resultado (Brasil - MAPA, 2011; Moreira, 2012).

Cabe ressaltar que, ao invés do cálculo para cada nível de concentração, os testes F e t podem também ser aplicados utilizando a inclinação das curvas de calibração feitas no solvente e na matriz da amostra.

1.8.2.5. Precisão

É a estimativa da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. Normalmente, as três formas mais comuns de expressá-la são: por meio da repetitividade, precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão e coeficiente de variação (Brasil - MAPA, 2011; Brasil - INMETRO, 2011).

O coeficiente de variação (CV, usualmente expresso em %), também conhecido como desvio padrão relativo (RSD, do inglês, *relative standard deviation*), é calculado da seguinte forma:

$$\text{C. V.} = \text{RSD} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100 \quad (\text{Equação 1.7})$$

Sendo:

DP = desvio-padrão;

CMD = concentração média determinada

1.8.2.6. Exatidão (Veracidade)

É a concordância entre a média de um número suficientemente grande de resultados de um ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro. A exatidão está inversamente relacionada ao erro sistemático ou à correção ou ao fator de correção (Brasil - MAPA, 2011).

Normalmente, os processos mais utilizados para a avaliação da exatidão são: uso de materiais de referência certificados (MRC), participações em ensaios interlaboratoriais e realização de ensaios de adição e recuperação (Brasil - INMETRO, 2010).

1.8.2.7. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, mas sem ser, necessariamente, quantificado. Para a validação de um método analítico, é normalmente suficiente fornecer uma indicação do nível em que a detecção do analito pode ser distinguida do sinal do branco/ruído. A determinação do LD pode ser feita pela análise repetida de uma porção de amostras do branco, calculando-se, então, o valor de sua média e somando três vezes o valor do desvio padrão (Brasil - ANVISA, 2005; Brasil - INMETRO, 2011).

Já o limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível de incerteza aceitável. Normalmente é o primeiro ponto da curva de calibração e não pode ser obtido por extrapolação (Brasil - ANVISA, 2005). Para seu cálculo é determinada a média dos valores do branco e soma-se, 5, 6 ou 10 vezes, a esse valor, o desvio padrão (Brasil - INMETRO, 2011).

1.8.2.8. Robustez

Um procedimento analítico mostra-se sensível quando submetido a algumas variações nas condições experimentais. O estudo da robustez permite avaliar o quanto significativa podem ser essas variações e, também, se são influentes ou não no desempenho do método. Devem-se considerar todas as possíveis variações de condições experimentais que podem ocorrer durante uma rotina no laboratório estimar seus efeitos (Brasil - ANVISA, 2005; Brasil - MAPA, 2011).

O método é considerado robusto quando se verifica, através do estudo da robustez, que a resposta do procedimento analítico não é influenciada ou é pouco influenciada por pequenas variações das condições experimentais. Do contrário, o método é não robusto e inadequado para as análises de rotina (Brasil - MAPA, 2011)

Para a determinação da robustez de um método, pode-se utilizar o teste de Youden, que permite avaliar também, além da robustez, a ordem da influência e o tipo de cada uma das variações no resultado final. É importante ressaltar que, quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse relacionamento à sua precisão (Brasil - INMETRO, 2010).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver um método para determinação simultânea dos anti-hipertensivos: hidroclorotiazida, losartan, telmisartan, valsartan e os metabólitos losartan ácido-5-carboxílico, valeril-hidroxi-valsartan e telmisartan 1-O-acilglucoronídeo utilizando LC-MS e validá-lo em amostras resultantes de estudos de permeação em células Caco-2.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes e solventes

Os anti-hipertensivos losartan, valsartan e telmisartan foram obtidos da USP Reference Standard (Rockville, MD). Os metabólitos losartan ácido-5-carboxílico, telmisartan 1-O-acilglucoronídeo e valeril-hidroxi-valsartan, foram comprados da JMC INC (Durham, NC, USA). Hidroclorotiazida foi adquirida do fornecedor Nutrifarm (lote CO1-20091103/F1 – São Paulo, SP). Para o preparo das soluções foi utilizado metanol (Merck, Darmstadt, Alemanha). Como constituintes da fase móvel na separação cromatográfica, foram utilizadas acetonitrila (Merck, Darmstadt, Alemanha) e água deionizada obtida de um sistema Milli Q (Millipore DirectQ 3, França).

3.2. Soluções

Preparou-se uma solução estoque de concentração igual a 1 mg mL^{-1} , em metanol, para cada um dos compostos analisados. Soluções intermediárias desses analitos foram preparadas por diluições sucessivas com metanol e, a partir destas, foi preparada uma solução de trabalho contendo os sete compostos na concentração de $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

Soluções de calibração contendo todos os analitos foram obtidas pela diluição da solução de trabalho, obtendo-se concentrações finais que variaram de 5 a $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

3.3. Amostras

O procedimento de cultivo e permeação em células de Caco-2 foi realizado pelo grupo do Prof. Ruben D. Sinisterra Millán. O procedimento geral para o cultivo das células de Caco-2 em testes de permeação apresenta a seguinte metodologia: inicialmente as células são cultivadas em meio mínimo essencial Eagle com L-glutamina, suplementado com 10% soro fetal bovino, 1% de aminoácido não-essencial e 1% de antibiótico-antimicótico à temperatura de $37 \pm 2^\circ\text{C}$ com 5% de CO_2 . As células são isoladas utilizando uma solução de tripsina-EDTA após atingirem uma confluência de 90% e colocadas em um frasco de cultura de tecidos (de 75 cm^2) em uma razão de 1:5.

O preparo das células Caco-2 para os experimentos de transporte, envolveu células de passagem 27 a 35 semeadas no lado apical da placa de cultura Transwell (12

mm de diâmetro e membrana de policarbonato de 0,4 μm), em uma concentração de 12×10^4 células mL^{-1} . O meio foi substituído após 24 h para remover células mortas ou não aderentes. Essa monocamada celular foi utilizada depois de um período de 21 dias após a semeadura.

No estudo de transporte, a monocamada foi pré-incubada em ambos os lados, apical (0,5 mL) e basolateral (1,5 mL), com o veículo de transporte que consiste em um tampão fosfato-salino (PBS, do inglês, *phosphate buffered saline*) a uma temperatura de $37 \pm 2^\circ\text{C}$, por no mínimo 30 minutos. Após essa etapa, no tempo zero, o tampão do lado apical é substituído por 0,4 mL do fármaco diluído no mesmo tampão. Em tempos determinados, a solução no lado basolateral, contendo o fármaco permeado, é recolhida (separando uma alíquota para análise) e o mesmo volume é colocado nessa mesma câmara, a fim de se manter suas condições. Estas placas foram mantidas à temperatura ambiente em toda a duração do experimento. Finalmente, procede-se a análise das alíquotas para determinação da concentração dos fármacos utilizando a técnica de LC-ESI/IT/TOF/MS (Mekjaruskul et al., 2013).

As amostras estudadas consistiram em alíquotas de quatro formulações: o telmisartan puro e em complexos de inclusão com a β -ciclodextrina na razão molar de 1:1, 1:2 e 1:3, todos com concentração inicial do fármaco igual a 1×10^{-3} mol.L^{-1} . Essas alíquotas (cerca de 100 μL), incluindo a matriz branca, foram recolhidas nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos, sendo todas em triplicata.

A matriz branca da amostra consiste em um tampão fosfato-salino, de pH 7,2, que foi submetido aos mesmos processos do experimento do estudo de transporte.

3.4. Instrumentação

A otimização da separação cromatográfica e as análises foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida de alto desempenho acoplado a um espectrômetro de massas híbrido contendo analisadores do tipo IT e TOF sequenciais (LC-ESI/IT/TOF/MS). O cromatógrafo líquido consiste de um sistema equipado com bombas binárias, modelo LC-20AD (Shimadzu Corp., Quioto, Japão) e um amostrador automático modelo SIL 20AC (Shimadzu Corp.). O espectrômetro de massas (Shimadzu IT-TOF) utilizado é equipado com fonte de ionização *electrospray* (modo negativo: -3,5 kV; modo positivo: +4,5 kV) e pode ser utilizado de forma simultânea ou escolhendo-se o modo negativo ou positivo. O aparelho possui dois analisadores de

massas em série, um *ion trap* seguido de um *time-of-flight*, conferindo alta sensibilidade e resolução na obtenção dos espectros.

3.5. Condições de análise no sistema LC-ESI/IT/TOF/MS

Essa etapa do trabalho foi realizada utilizando uma coluna C18 ACE (100 mm x 2,1 mm x 3 μm de diâmetro de partícula) mantida a temperatura ambiente. Nos experimentos de otimização, injetou-se 5 μL de uma solução contendo 5000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada um dos anti-hipertensivos e metabólitos no sistema cromatográfico.

Para otimização da separação cromatográfica foi feito um estudo para a escolha do solvente mais adequado a ser usado como fase móvel (B) em conjunto com a água pura (A). Os solventes estudados foram metanol e acetonitrila, ambos puros e também acidificados com 1% de ácido fórmico. Essa avaliação consistiu na comparação das áreas dos picos dos analitos obtidas para cada um dos solventes estudados. Após a escolha do solvente, foram avaliadas diferentes condições de eluição por gradiente, com variações na proporção entre os constituintes (solvente/água) da fase móvel.

Em condições ótimas, foi utilizado um fluxo de 0,2 mL min^{-1} para a fase móvel que consistiu de água pura (A) e acetonitrila acidificada com 1% de ácido fórmico (B). A separação cromatográfica conduzida no modo gradiente foi otimizada na programação: 20% da fase B por 2 min; variação constante de 20% até 95% da fase B em 5 min; manutenção da fase B em 95% por 3 min; redução a 20% B em 0,5 min, mantendo-se essa proporção por 3,5 min, totalizando 14 minutos de análise cromatográfica. As condições utilizadas no espectrômetro de massas foram: voltagem da fonte de ionização por *electrospray* no modo negativo igual a -3,5 kV e, no modo positivo, +4,5 kV, sendo que a análise se deu de forma simultânea; fluxo do gás de nebulização (N_2) a 1,5 L min^{-1} ; temperatura da interface de 200 $^{\circ}\text{C}$ e faixa de relação massa/carga analisada de 200 a 700 m/z .

3.6. Validação do método

A validação do método foi conduzida pela avaliação dos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade e efeito de matriz, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão.

3.6.1. Seletividade

A avaliação da seletividade se deu a partir da análise do branco da matriz sem fortificação. O cromatograma obtido da análise do branco da matriz foi comparado com

o cromatograma obtido da análise do branco fortificado com os anti-hipertensivos na concentração de 5000 $\mu\text{g L}^{-1}$.

3.6.2. Linearidade

Foram construídas curvas analíticas utilizando metanol como solvente e também o branco da amostra para avaliação da linearidade. As alíquotas de cada ponto foram fortificadas com diferentes volumes da solução de trabalho para obter concentrações finais de 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0 e 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito. As análises, nos diferentes níveis, foram realizadas em triplicata e as curvas analíticas foram construídas como gráficos da área do pico cromatográfico *versus* a concentração nominal do analito. Para avaliação da linearidade foi empregado o método dos mínimos quadrados.

3.6.3. Efeito de matriz

Para esse estudo foram construídas curvas de calibração para cada um dos anti-hipertensivos estudados, sendo uma curva no solvente (MeOH) e a outra na matriz branca. Ambas as curvas foram planejadas com seis níveis de concentrações (5, 10, 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) e, para cada um desses níveis, foram feitas três replicatas independentes.

Para a preparação das curvas no solvente (MeOH) foram feitas diluições da solução trabalho contendo todos os analitos (concentração igual a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$) obtendo-se concentrações finais que variaram de 5 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, correspondente aos níveis de concentrações estudados.

As curvas construídas na matriz da amostra foram preparadas de forma semelhante. Cada nível de concentração foi preparado utilizando-se 20 μL da matriz branca da amostra, um certo volume da solução trabalho e o volume completado até 100 μL para obtenção das concentrações desejadas.

A avaliação do efeito de matriz foi feita aplicando-se os testes F (Fischer-Snedecor) e *t* na inclinação das curvas de calibração preparadas em solvente e na matriz da amostra.

3.6.4. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os valores de LD e LQ do método foram determinados experimentalmente através da análise de diluições sucessivas da solução do analito em estudo. Para o limite de detecção, ao diminuir a concentração das soluções, foi observado a menor

concentração que produziu um pico cromatográfico detectável, considerando o sinal dos analitos de interesse três vezes maior do que o ruído da linha de base. No caso do LQ, seu valor foi estimado pela obtenção de uma razão sinal/ruído igual a dez vezes, onde a concentração determinada produziu um pico cuja área foi passível de ser quantificada.

3.6.5. Precisão e Exatidão

A precisão indica o grau de concordância (dispersão) entre uma série de medições. Geralmente é avaliada em três níveis de concentração e as três formas mais comuns de expressá-la são: por meio da repetitividade, precisão intermediária e da reprodutibilidade. A precisão do método foi realizada em termos da repetitividade e, para tanto, foram preparadas soluções, na matriz branca da amostra, em três níveis de concentração (5, 50 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) e posteriormente analisadas no sistema LC-ESI/IT/TOF/MS. Cada nível de concentração foi processado em sete replicatas de acordo com o procedimento descrito no item 1.8.2.5.. Após a análise desvio padrão relativo (RSD%) foi determinado para cada nível de concentração.

A exatidão de um método analítico é geralmente determinada pelo estudo de materiais de referência ou por estudos de adição e recuperação. Para os ensaios de recuperação foram utilizadas soluções com as mesmas concentrações empregadas no ensaio de repetibilidade. Cada nível de concentração foi analisado em 7 replicatas e os resultados expressos como porcentagem de recuperação e desvio padrão ($\% \pm s$).

3.7. Aplicação do método

Após a validação, o método foi aplicado em amostras de telmisartan e em compostos de inclusão formados por ciclodextrina e telmisartan, na proporção de 1:1, 2:1 e 3:1 resultantes de estudos de permeação em células Caco-2, como descrito no item 3.3. Para tanto, utilizou-se as condições otimizadas para a análise por LC-ESI/IT/TOF/MS.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Otimização das condições cromatográficas

No desenvolvimento de uma separação cromatográfica deve-se dar grande importância à obtenção de uma resolução satisfatória e um tempo de análise razoável. Além disso, em LC-MS com ionização ESI, a magnitude do sinal obtido também deve ser levada em consideração, quando da avaliação de diferentes fases móveis. Dessa forma, o processo de otimização foi realizado com o objetivo de atender esses quesitos.

Inicialmente, introduziu-se uma solução padrão contendo $5000 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada anti-hipertensivo e metabólitos no sistema LC-MS-IT-TOF, a fim de se investigar a influência da composição da fase móvel no sinal analítico dos compostos em estudo. Ou seja, o solvente que proporcionou a produção de picos com áreas maiores para a maior parte dos analitos, foi escolhido para compor a porção orgânica da fase móvel na separação cromatográfica. Para isso, como fase orgânica (B), foram avaliados os seguintes solventes: metanol, metanol acidificado com 1% de ácido fórmico, acetonitrila e acetonitrila acidificada com 1% de ácido fórmico. Como fase aquosa (A), utilizou-se sempre água ultrapura. Observou-se que a acetonitrila acidificada a 1% com ácido fórmico conduziu aos melhores resultados em termos de sinal analítico.

Uma vez estabelecida a fase orgânica a ser utilizada, procedeu-se a avaliação da influência da composição da fase móvel no tempo de retenção, resolução e simetria dos picos. Para isso, investigou-se variações na composição de seus constituintes (A) e (B).

Os melhores resultados para separação e quantificação simultânea dos anti-hipertensivos e metabólitos foram obtidos utilizando uma eluição por gradiente, consistindo em: 20% da fase B por 2 min; variação constante de 20% até 95% da fase B em 5 min; manutenção da fase B em 95% por 3 min; redução a 20% da fase B em 0,5 min, mantendo-se essa proporção por 3,5 min, totalizando 14 minutos de análise cromatográfica e fluxo total de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$. O perfil cromatográfico obtido após a otimização das condições é apresentado na Figura 4.1.

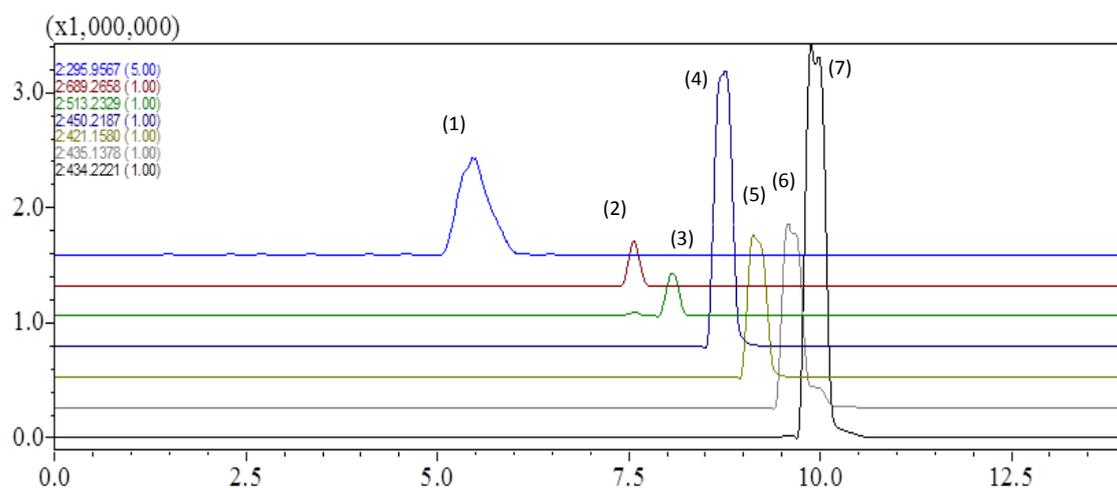


Figura 4.1. Cromatograma de uma mistura de anti-hipertensivos ($5000 \mu\text{g L}^{-1}$). Picos: (1) hidroclorotiazida; (2) telmisartan 1-O-acilglucuronídeo; (3) telmisartan; (4) valeril-hidroxi-valsartan; (5) losartan; (6) losartan ácido-5-carboxílico e (7) valsartan. Condições: (i) Separação cromatográfica: eluição por gradientes, consistindo em: 20% da fase B por 2 min; variação constante de 20% até 95% da fase B em 5 min; manutenção da fase B em 95% por 3 min; redução a 20% da fase B em 0,5 min, mantendo-se essa proporção por 3,5 min. Fluxo $0,2 \text{ mL min}^{-1}$. Tempo de análise igual a 14 minutos; (ii) Espectrometria de massas: voltagem da fonte de ionização por *electrospray* no modo negativo igual a $-3,5 \text{ kV}$ e, no modo positivo, $+4,5 \text{ kV}$; fluxo do gás de nebulização (N_2) a $1,5 \text{ L min}^{-1}$; temperatura da interface de $200 \text{ }^\circ\text{C}$ e faixa de relação massa/carga analisada de 200 a 700 m/z . A análise foi feita simultaneamente nos modos positivo e negativo.

Levando em conta o número de analitos, sete no total, pode-se considerar que o tempo de 14 minutos decorridos na separação cromatográfica foi relativamente baixo. Apesar de alguns compostos possuírem tempos de retenção próximos e, assim, os picos cromatográficos relativos a estes compostos apresentarem uma pequena sobreposição, esse fato não implica em um problema para o desenvolvimento do método. Isso porque a detecção por espectrometria de massas permite o monitoramento de cada analito individualmente, onde o detector é ajustado para que seja observado apenas o íon de razão m/z de interesse.

4.2. Análise por LC-ESI/IT/TOF/MS

Após a otimização das condições cromatográficas, foram obtidos os parâmetros cromatográficos e espectrométricos referentes a cada um dos analitos em estudo. A Tabela 4.1 apresenta o tempo de retenção (em minutos), a razão massa/carga (m/z) da forma desprotonada da molécula e a fórmula molecular de cada um dos analitos.

Tabela 4.1. Tempo de retenção, razão m/z da forma desprotonada da molécula e fórmula molecular de cada composto em estudo.

Analito	Tempo de retenção (min)	Razão m/z	Fórmula molecular
Hydrochlorothiazida	5,32	295,9567	$C_7H_8N_3S_2O_4Cl$
Valsartan	9,38	434,2221	$C_{24}H_{29}N_5O_3$
Valeril-hidroxi-valsartan	8,81	450,2187	$C_{24}H_{30}N_5O_4$
Telmisartan	7,84	513,2329	$C_{33}H_{30}N_4O_2$
Telmisartan 1-O-acilglucoronídeo	7,06	689,2658	$C_{39}H_{38}N_4O_8$
Losartan	8,68	421,1580	$C_{22}H_{23}N_6OCl$
Losartan ácido-5-carboxílico	9,11	435,1378	$C_{22}H_{21}N_6O_2Cl$

A Figura 4.2 mostra os cromatogramas de íon extraído para cada um dos analitos. Como observado, foram obtidos picos bem definidos e com boa relação sinal-ruído. Os espectros de massas obtidos para cada um dos anti-hipertensivos estão apresentados na Figura 4.3. Todos os compostos obtiveram uma melhor detecção no modo negativo, sendo que através dos espectros de massas é possível confirmar a fórmula molecular correspondente à estrutura química de cada um dos analitos.

A faixa total de razão massa/carga (m/z) monitorada variou entre 200 e 700. Porém, com o objetivo de se aumentar a sensibilidade do método, a análise foi feita em dois segmentos: (i) m/z entre 200 e 350, onde foi analisado a hidroclorotiazida e (ii) m/z de 350 a 700, com análise dos demais compostos.

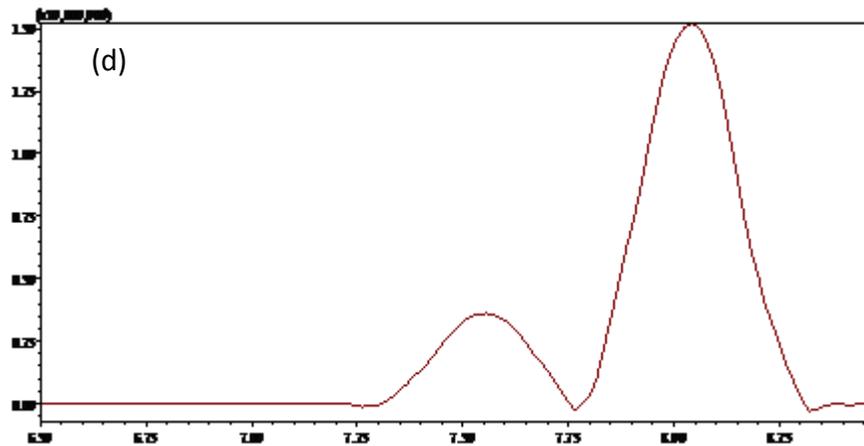
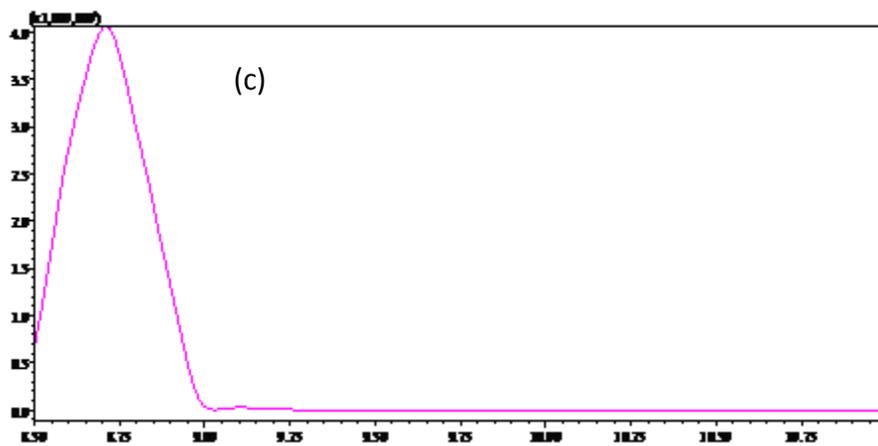
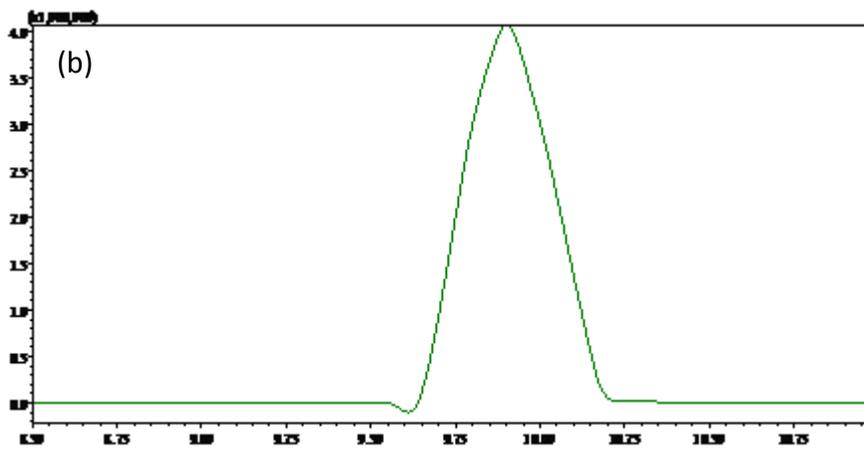
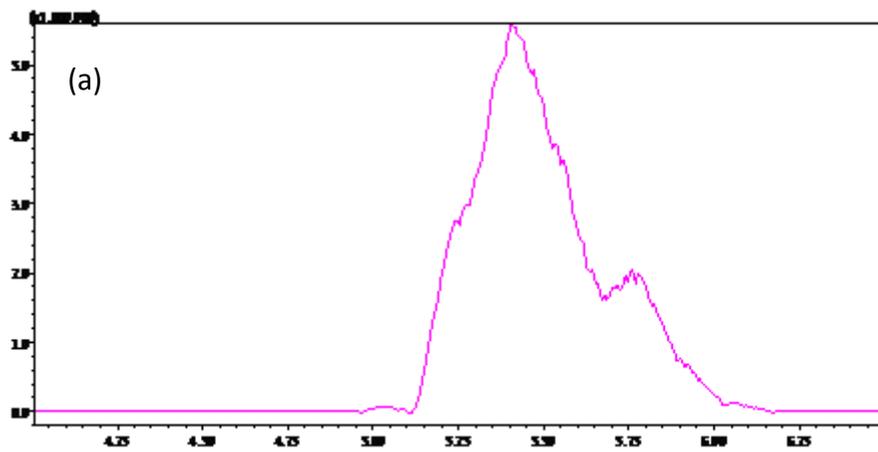


Figura 4.2.a. Cromatograma de íon extraído para (a) hidroclorotiazida, (b) valsartan, (c) valeril-hidroxi-valsartan e (d) telmisartan.

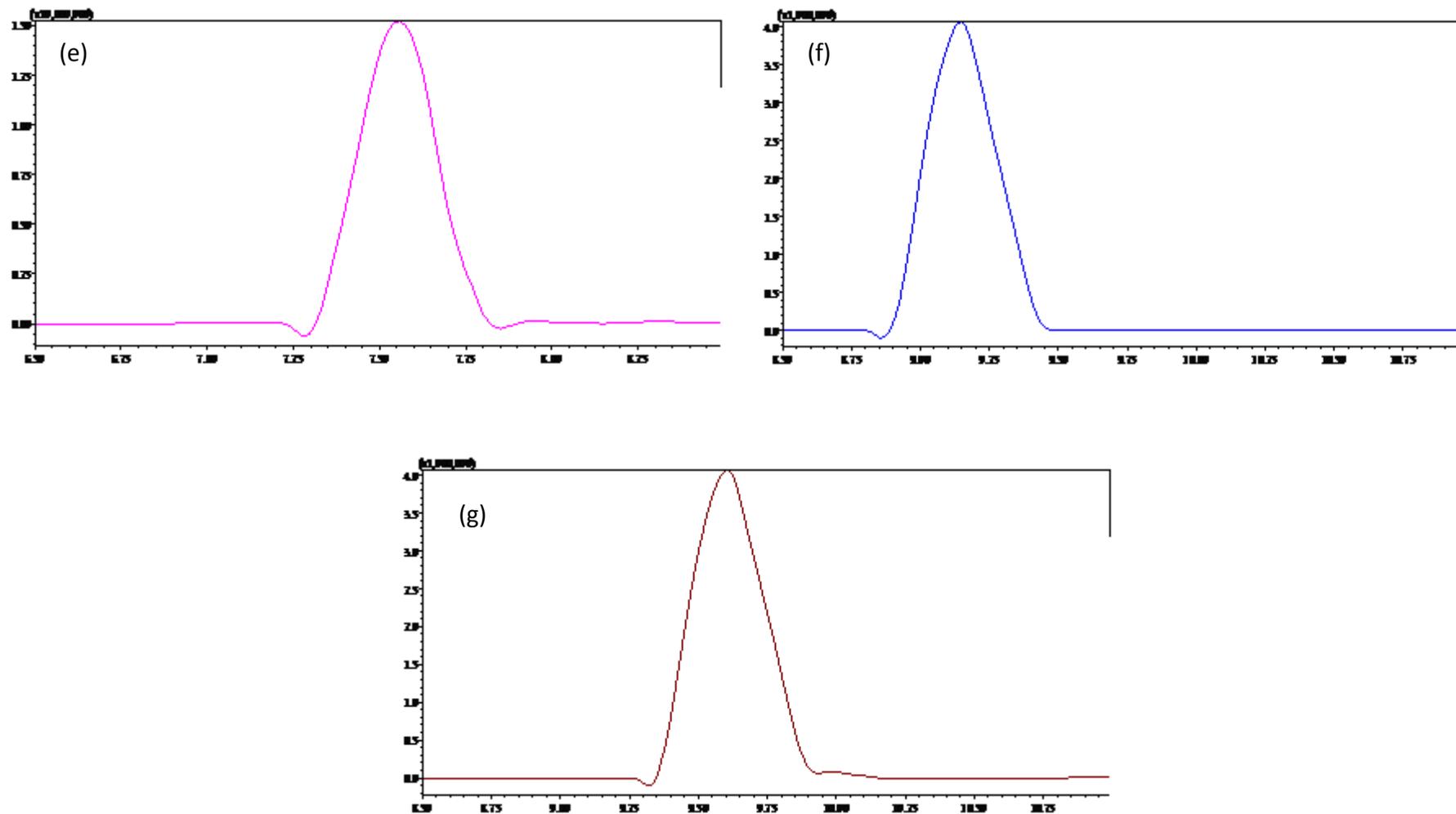


Figura 4.2.b. Cromatograma de íon extraído para: (e) telmisartan 1-O-acilglucoronídeo, (f) losartan e (g) losartan ácido-5-carboxílico.

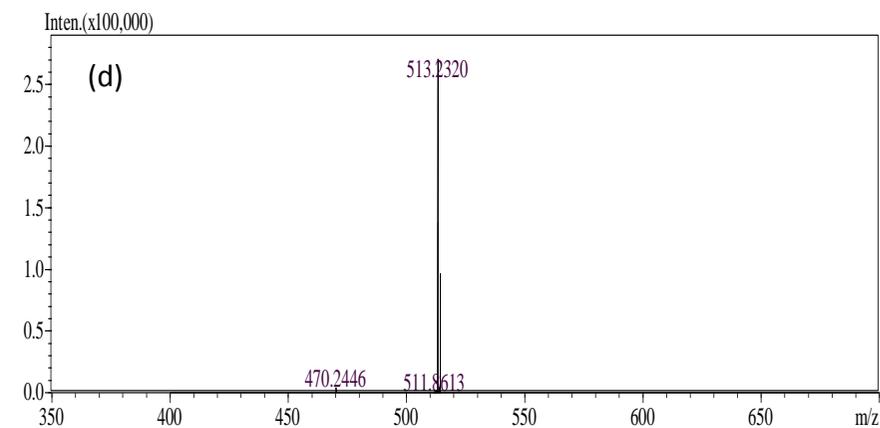
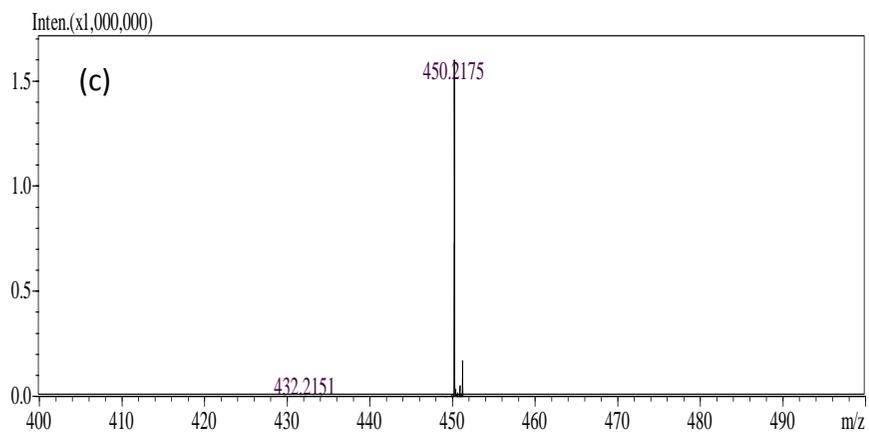
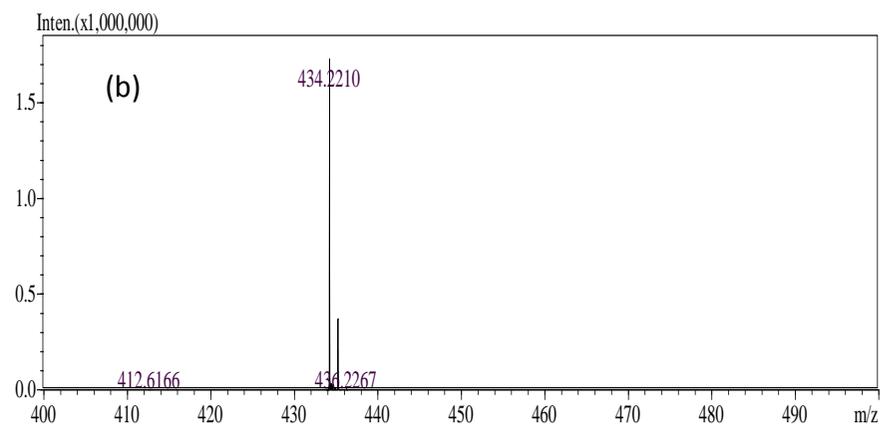
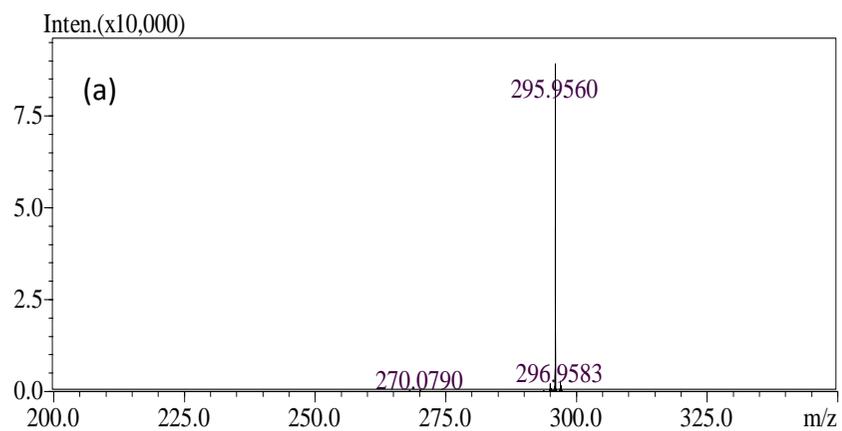


Figura 4.3.a. Espectros de massas característicos do pico de cada composto: (a) hidroclorotiazida, (b) valsartan, (c) valeril-hidroxi-valsartan e (d) telmisartan,

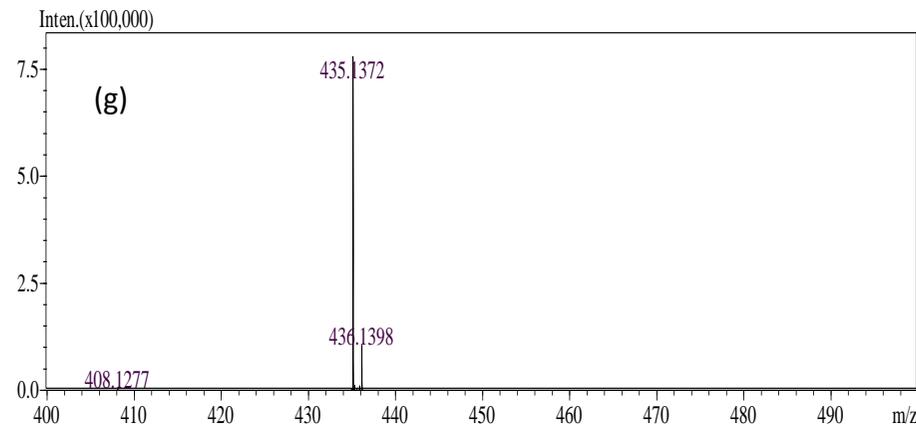
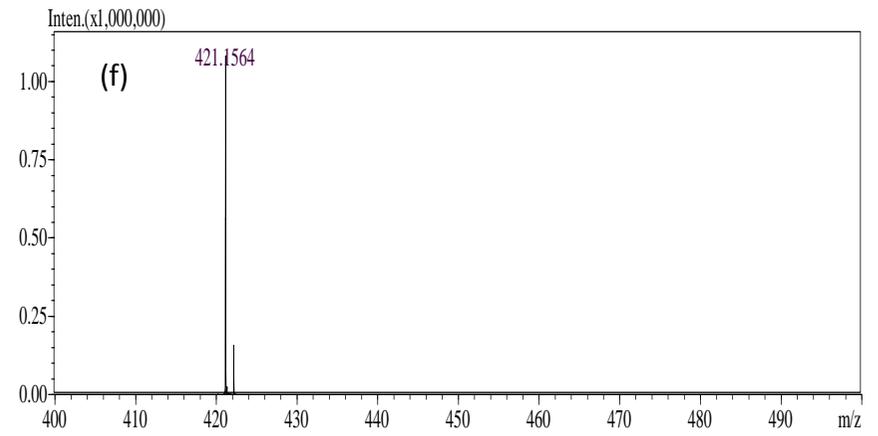
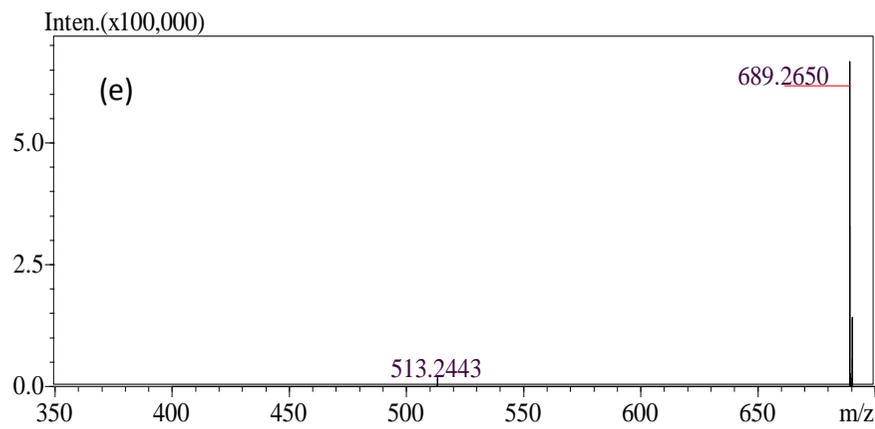


Figura 4.3.b. Espectros de massas característicos do pico de cada composto: (e) telmisartan 1-O-acilglucoronídeo, (f) losartan e (h) losartan ácido-5-carboxílico.

A alta resolução da técnica pode ser confirmada a partir da massa mensurada em relação à massa predita pelo software do equipamento utilizado nas análises. Esses resultados estão apresentados na Tabela 4.2, que mostra também o íon da forma desprotonada da molécula e o erro, em ppm, da massa mensurada quando comparada à massa predita.

Tabela 4.2. Erro entre massa mensurada e massa predita pelo software do equipamento.

Analitos	Forma desprotonada da molécula	Massa mensurada (m/z)	Massa predita (m/z)	Erro (ppm)*
Hydroclorotiazida	[M-H] ⁻	295,9560	295,9566	-2,03
Valsartan	[M-H] ⁻	434,2210	434,2192	4,15
Valeril-hidroxi-valsartan	[M-H] ⁻	450,2175	450,2141	7,55
Telmisartan	[M-H] ⁻	513,2320	513,2291	5,65
Telmisartan 1-O-acilglucoronídeo	[M-H] ⁻	689,2650	689,2611	5,66
Losartan	[M-H] ⁻	421,1564	421,1544	4,75
Losartan ácido-5-carboxílico	[M-H] ⁻	435,1372	435,1336	8,27

* Valores negativos significam que a massa mensurada é menor que a massa predita.

Observa-se que os valores encontrados para o erro ficaram entre 0,24 e 8,27 ppm, mantendo-se dentro do valor aceitável de 10 ppm e, então, a identificação dos compostos pode ser realizada sem ambiguidade.

4.3. Validação do método

Para validar o método, todos os testes foram realizados a um nível de confiança de 95% e os seguintes parâmetros foram analisados:

4.3.1. Seletividade

O método apresentou-se seletivo, uma vez que após a injeção da matriz branca da amostra não foram detectados picos no tempo de retenção dos analitos. Na Figura 4.4 é apresentado o cromatograma de íon extraído para o telmisartan (a) e o cromatograma de íon extraído para a análise da matriz branca (b). Todos os demais

analitos apresentaram comportamento semelhante, porém esse analito foi escolhido como exemplo, uma vez que o método foi aplicado em amostras contendo telmisartan.

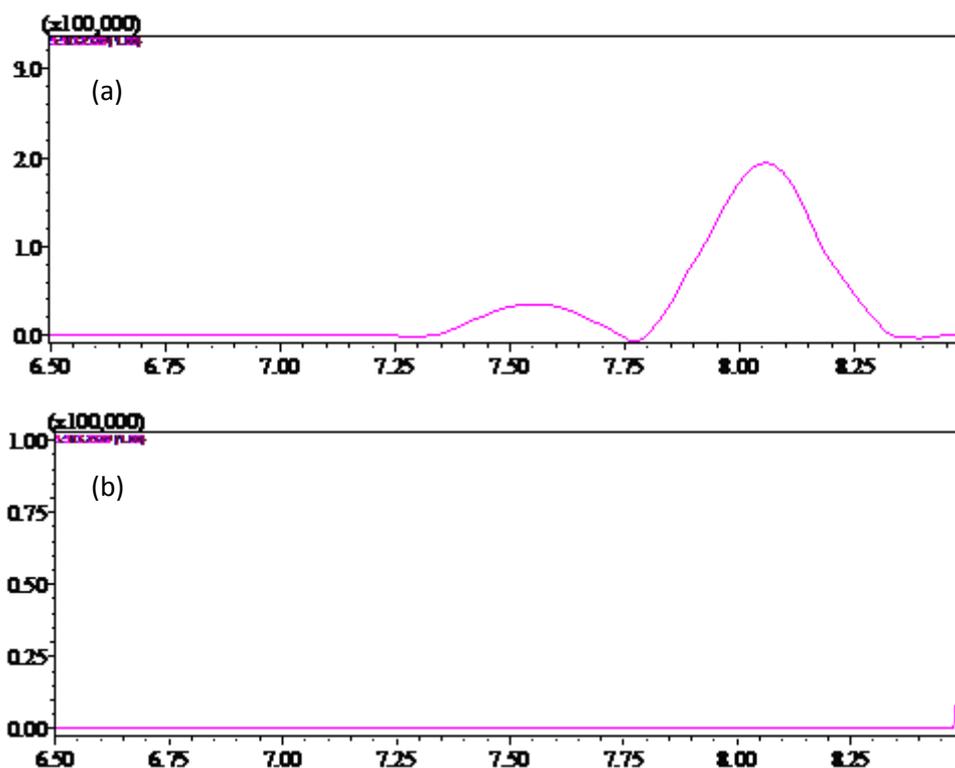


Figura 4.4. Cromatograma de íon extraído para o (a) telmisartan e (b) matriz branca da amostra.

Aliado a esse resultado, o uso de um analisador tipo TOF de alta resolução permite a determinação dos analitos mesmo na presença de outros compostos com massas ligeiramente diferentes. Isso é possível, pois este analisador possui habilidade para determinar a razão m/z dos anti-hipertensivos com quatro casas decimais, possibilitando a seleção de uma única fórmula molecular para análise, como foi apresentado na Figura 4.2 (cromatogramas de íon extraído). Dessa forma, foi possível desenvolver um método com alta seletividade.

4.3.2. Efeito de matriz

Para avaliação do efeito de matriz foram preparadas curvas analíticas para cada um dos compostos em metanol e na matriz branca da amostra, ambas com os mesmos níveis de concentrações (5, 10, 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) e em triplicata.

Como descrito no item 3.6.3, foram utilizados o teste F e o teste t para avaliação do efeito de matriz. Esses testes foram aplicados comparando-se a inclinação das curvas

preparadas no solvente (MeOH) e na matriz branca da amostra. Como exemplo, a Figura 4.5 apresenta as curvas preparadas em solvente puro e na matriz branca da amostra para o telmisartan.

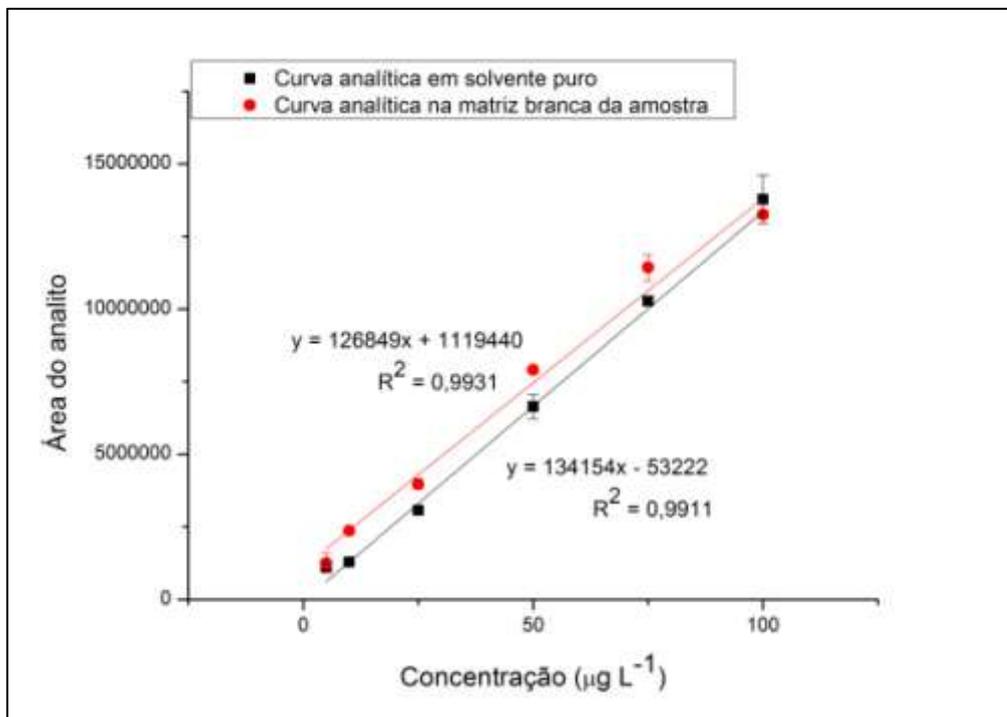


Figura 4.5. Curvas analíticas do telmisartan, preparadas em solvente puro (MeOH) e na matriz branca da amostra.

Para cada analito, aplicou-se primeiramente o teste F para verificação da homogeneidade das variâncias. Caso $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$, procede-se o teste t utilizando a Equação 1.3. Por outro lado, se $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$, a Equação 1.5 é utilizada para o cálculo de t .

Como critério de avaliação do efeito de matriz (Brasil - MAPA, 2001), tem-se que quando $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$, a matriz não interfere nos resultados da análise, porém quando $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabelado}}$, a matriz tem efeito estatisticamente significativo sobre os resultados.. Os valores encontrados para F_{calc} , F_{tab} , t_{calc} e t_{tab} estão apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Valores de F e t obtidos na comparação entre a curva preparada em metanol e a curva preparada na matriz branca da amostra.

Analitos	F_{calc}	F_{tab}	t_{calc}	t_{tab}
Hidroclorotiazida	2,117	19,00	0,825	2,78
Valsartan	24,928	19,00	1,567	4,30
Valeril-hidroxi-valsartan	1,032	19,00	1,658	2,78
Telmisartan	1,427	19,00	1,7,7	2,78
Telmisartan 1-O-acilglucoronídeo	5,240	19,00	0,705	2,78
Losartan	3,136	19,00	0,642	2,78
Losartan ácido-5-carboxílico	1,604	19,00	2,209	2,78

Os valores calculados de t e F mostram que não existe diferença significativa entre as inclinações das curvas, ao nível de 95% de confiança, para nenhum dos analitos estudados. Dessa forma, a matriz da amostra não interfere nas análises, podendo ser utilizadas as soluções preparadas no solvente para os posteriores estudos.

4.3.3. Linearidade

A linearidade foi avaliada na faixa de concentrações entre 5 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para todos os compostos estudados. Na Tabela 4.4 são apresentadas as equações das regressões lineares e os respectivos coeficientes de correlação (R^2) obtidos para as curvas analíticas construídas em solvente (MeOH) para todos os analitos, na faixa de concentrações estudada.

Tabela 4.4. Faixa linear, equação linear e coeficiente de correlação (R^2) dos anti-hipertensivos para as curvas em metanol.

Analito	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação linear	Coeficiente de correlação (R^2)
Hidroclorotiazida	5 - 100	$y = 50044x - 240262$	0,9918
Valsartan	5 - 100	$y = 527165x + 1281340$	0,9981
Valeril-hidroxi-valsartan	5 - 100	$y = 226401x + 83481$	0,9909
Telmisartan	5 - 100	$y = 134154x - 53222$	0,9911
Telmisartan 1-O-acilglucoronídeo	5 - 100	$y = 43657x - 79899$	0,9952
Losartan	5 - 100	$y = 393354x + 2183490$	0,9961
Losartan ácido-5-carboxílico	5 - 100	$y = 126059x + 154719$	0,9945

Os coeficientes de correlação ao quadrado (R^2) se mostraram satisfatórios para todos os compostos estudados, variando de 0,9909 para o valeril-hidroxi-valsartan e 0,9981 para o valsartan. Estes valores indicam que o método foi capaz de gerar resultados proporcionais à concentração na faixa linear estudada. As curvas analíticas preparadas em metanol obtidas para cada um dos compostos estudados, com a respectiva equação e o coeficiente de correlação ao quadrado, estão apresentadas na Figura 4.6. Na Figura 4.7 são apresentadas as curvas analíticas preparadas na matriz branca da amostra, também com as respectivas equações e o coeficiente de correlação ao quadrado.

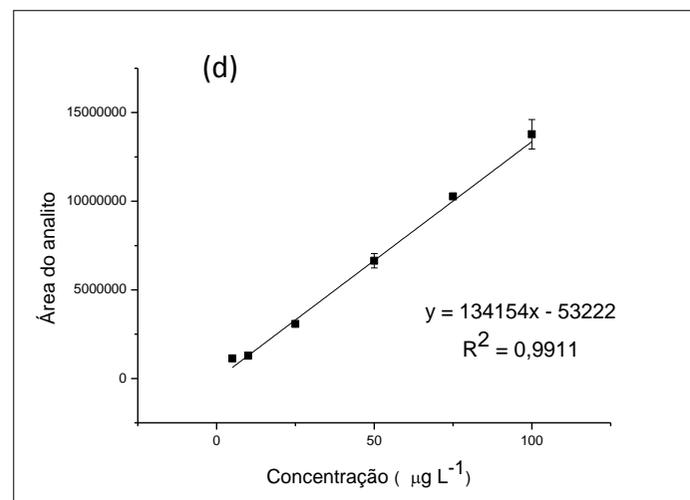
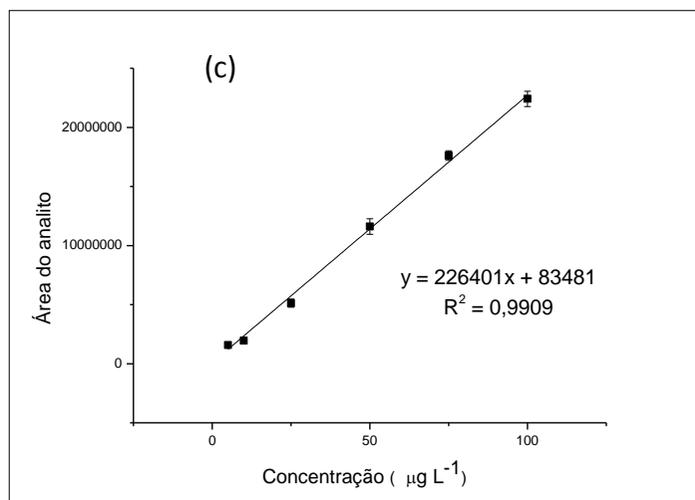
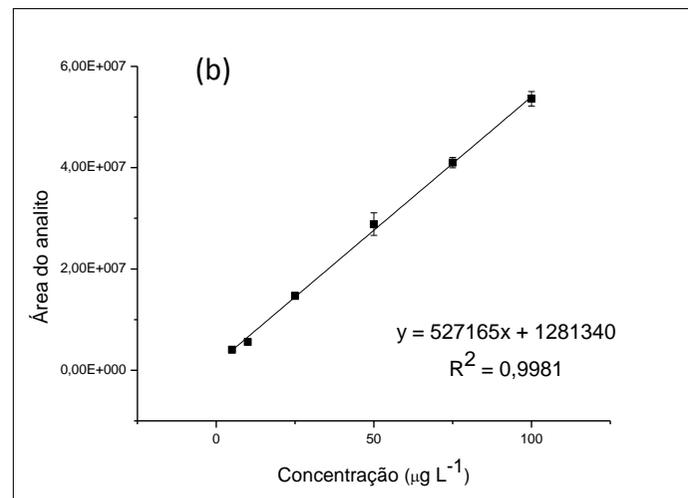
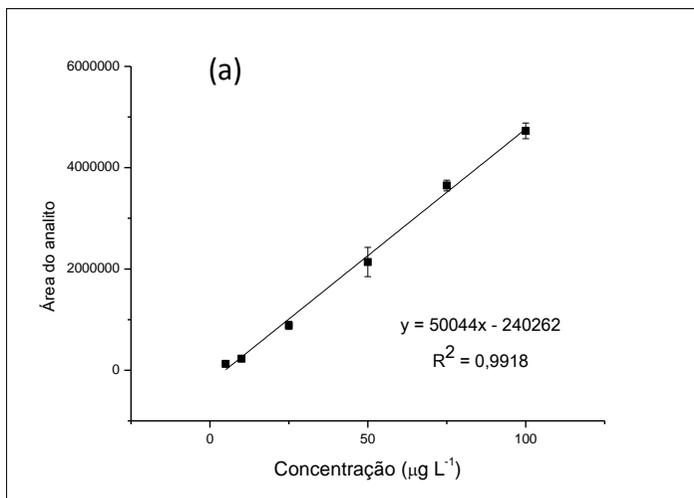


Figura 4.6.a. Curvas analíticas preparadas em metanol, para cada um dos analitos: (a) hidroclorotiazida, (b) valsartan, (c) valeril-hidroxi-valsartan, e (d) telmisartan.

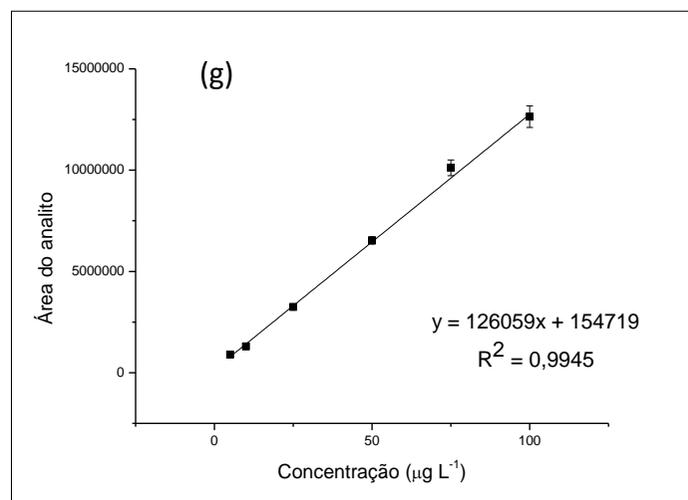
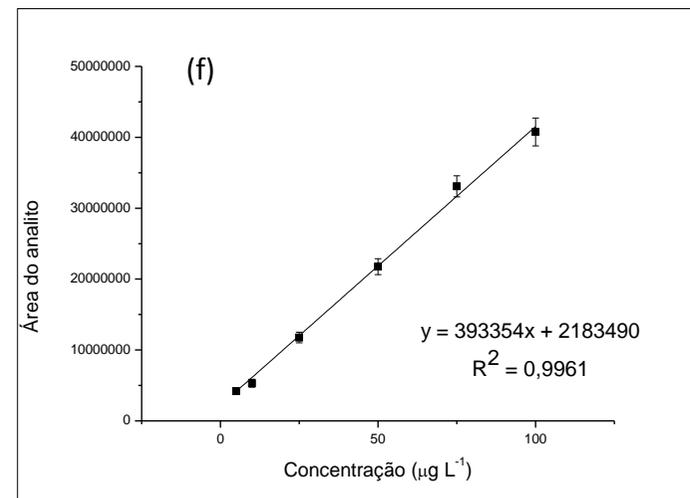
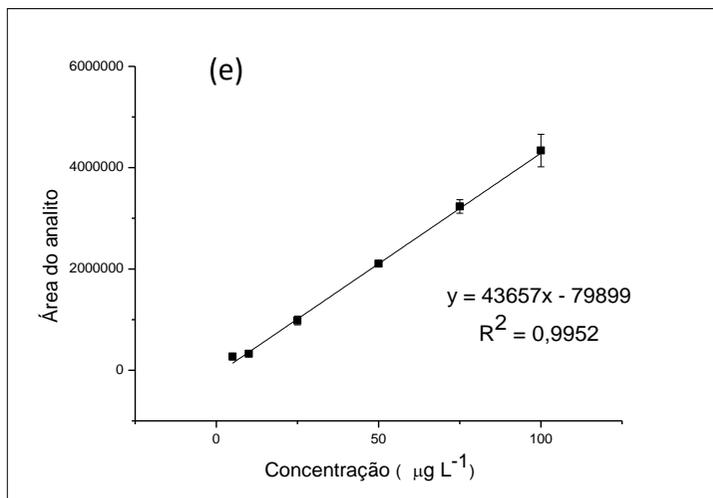


Figura 4.6.b. Curvas analíticas preparadas em metanol, para cada um dos analitos: (e) telmisartan 1-O-acilglucoronídeo, (f) losartan e (g) losartan ácido-5-carboxílico.

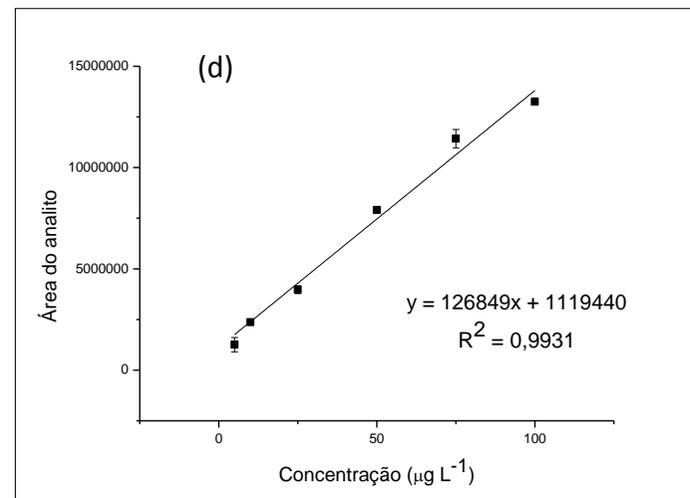
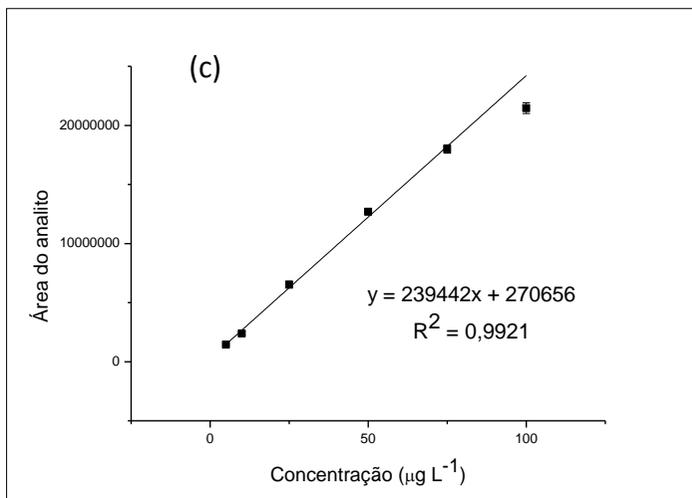
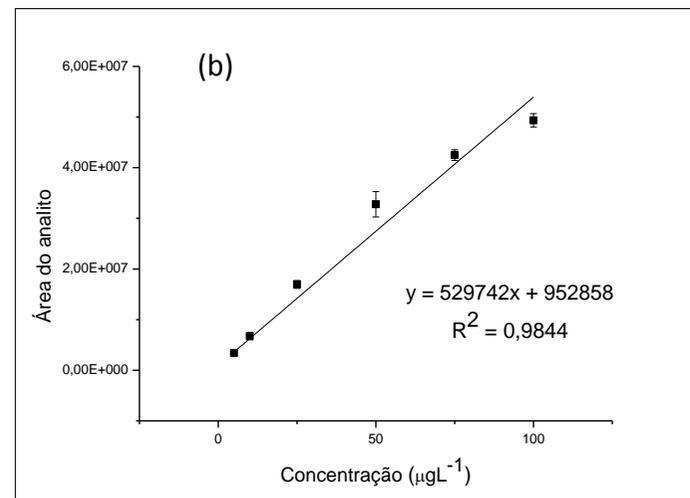
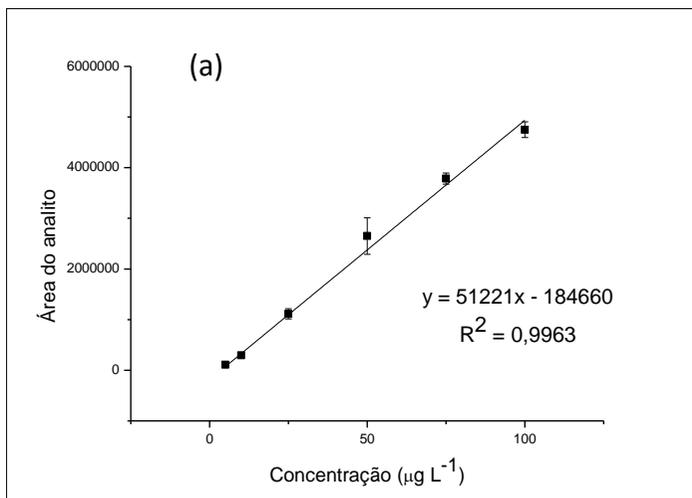


Figura 4.7.a. Curvas analíticas preparadas na matriz branca da amostra, para cada um dos analitos: (a) hidroclorotiazida, (b) valsartan, (c) valeril-hidroxi-valsartan e (d) telmisartan.

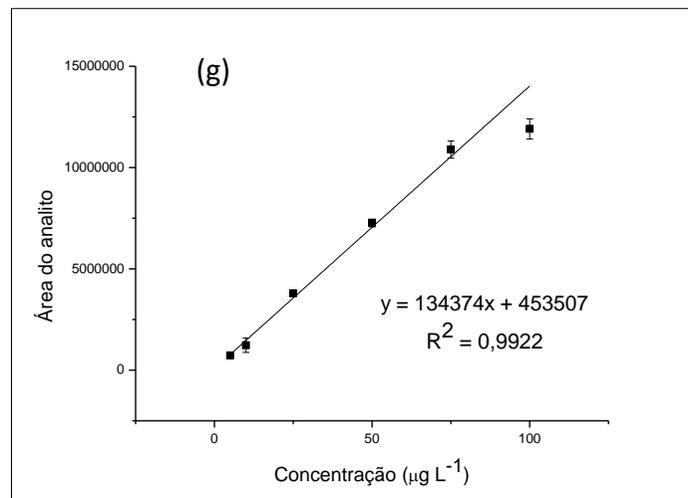
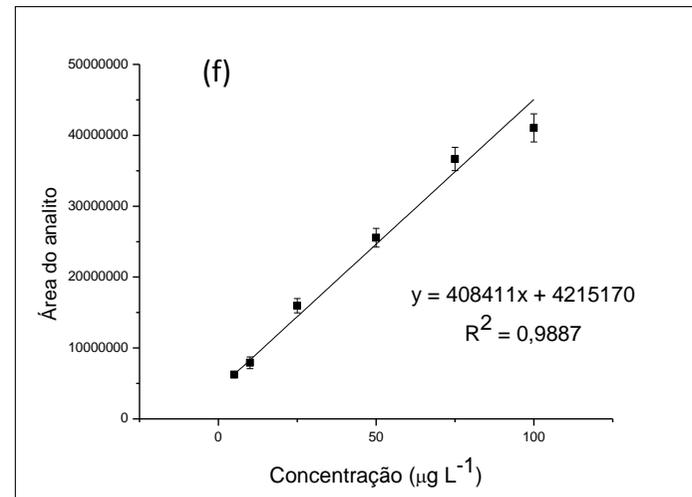
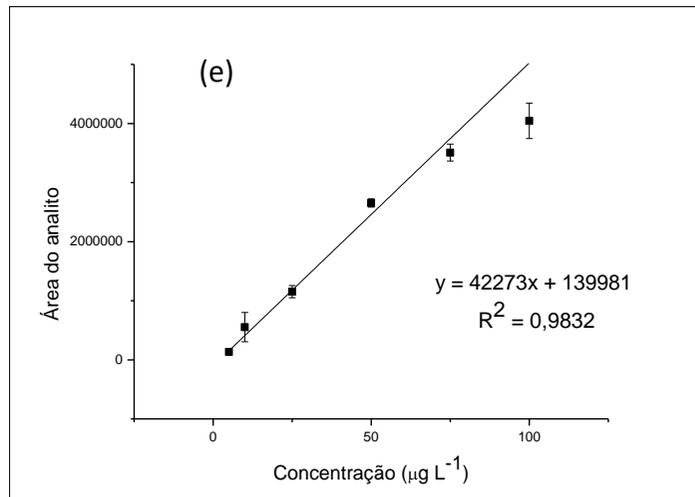


Figura 4.7.b. Curvas analíticas preparadas na matriz branca da amostra, para cada um dos analitos: (e) telmisartan 1-O-acilglucoronídeo, (f) losartan e (g) losartan ácido-5-carboxílico.

A Tabela 4.5 apresenta as equações de cada curva analítica na matriz da amostra e seu respectivo coeficiente de correlação, R^2 , para cada um dos analitos.

Tabela 4.5. Faixa linear, equação linear e coeficiente de determinação dos anti-hipertensivos para as curvas preparadas na matriz branca da amostra.

Analito	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação linear	Coefficiente de correlação (R^2)
Hidroclorotiazida	5 - 100	$y = 51221x - 184660$	0,9963
Valsartan	5 - 100	$y = 529742x + 952858$	0,9844
Valeril-hidroxi-valsartan	5 - 100	$y = 239442x + 270656$	0,9921
Telmisartan	5 - 100	$y = 126849x + 1119440$	0,9931
Telmisartan 1-O-acilglucoronídeo	5 - 100	$y = 42273x + 139981$	0,9832
Losartan	5 - 100	$y = 408411x + 4215170$	0,9887
Losartan ácido-5-carboxílico	5 - 100	$y = 134374x + 453507$	0,9922

As curvas preparadas em matriz também apresentaram linearidade adequada, com valores de R^2 superiores a 0,980 para todos os analitos e variando entre 0,9832 para o telmisartan 1-O-acilglucoronídeo e 0,9963 para a hidroclorotiazida.

4.3.4. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Ambos os parâmetros, LD e LQ, foram determinados através da análise de diluições sucessivas de soluções dos analitos. Observou-se que $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ corresponde à menor concentração em que algum sinal analítico, de magnitude aproximadamente três vezes o nível de ruído da linha de base, pode ser observado para os analitos. Esse valor de concentração foi definido como o LD. De maneira similar, observou-se que $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ foi a concentração que gerou um sinal analítico de magnitude igual a dez vezes o ruído da linha de base. Essa concentração foi definida como o LQ. Além disso, como essa concentração foi um dos níveis analisados nos ensaios de exatidão e precisão, o valor de LQ atendeu a esses critérios estudados. Tabela 4.6 apresenta os limites de detecção e quantificação obtidos para todos os analitos.

Tabela 4.6. Valores do limite de detecção e limite de quantificação dos anti-hipertensivos estudados pelo método proposto.

Analito	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Hidroclorotiazida	1,0	5,0
Valsartan	1,0	5,0
Valeril-hidroxi-valsartan	1,0	5,0
Telmisartan	1,0	5,0
Telmisartan 1-O-acilglucoronídeo	1,0	5,0
Losartan	1,0	5,0
Losartan ácido-5-carboxílico	1,0	5,0

A similaridade das estruturas dos compostos estudados, com grupamentos amino e ácidos carboxílicos, pode ser uma explicação para a similaridade nos valores de LD e LQ obtidos.

4.3.5. Precisão e exatidão (veracidade)

Os estudos de precisão foram feitos em termos da repetitividade, onde 7 replicatas, em três níveis de concentração (baixo, médio e alto), foram analisadas. Para a menor concentração avaliada ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) a precisão do método variou entre 2,6-5,3%; para a concentração média ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) a variação foi de 2,8-4,1%; e, para a concentração mais alta ($100 \mu\text{g L}^{-1}$), 1,1-5,1%, como mostra a Tabela 4.7.

De acordo com RIBANI *et al.* (2004), métodos que quantificam compostos em macro quantidades requerem RSDs de 1 a 2%. Em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos RSDs de até 20%, dependendo da complexidade da amostra. Os valores obtidos na avaliação da precisão foram menores que 5,5%, indicando que o método possui precisão adequada.

Tabela 4.7. Precisão de cada analito, em termos do RSD%, obtida da matriz fortificada em três níveis de concentração: 5, 50 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Analito	Precisão (RSD%)		
	5	50	100
Hidroclorotiazida	-	2,8	2,5
Valsartan	2,9	3,9	1,4
Valeril-hidroxi-valsartan	5,3	3,4	1,1
Telmisartan	2,6	3,7	3,8
Telmisartan 1-O-acilglucoronídeo	3,7	3,2	5,1
Losartan	5,1	4,1	2,9
Losartan ácido-5-carboxílico	4,4	3,8	1,7

A exatidão foi determinada por ensaios de adição e recuperação, sendo avaliada em três níveis de concentrações correspondentes aos mesmos avaliados na precisão. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8. Exatidão de cada analito (recuperação) obtidas da matriz fortificada em três níveis de concentração: 5, 50 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Analito	Recuperação (% \pm s)		
	5	50	100
Hidroclorotiazida	102,8 \pm 17,9	111,1 \pm 2,6	86,8 \pm 2,0
Valsartan	95,8 \pm 10,3	92,8 \pm 3,9	111,9 \pm 1,7
Valeril-hidroxi-valsartan	109,5 \pm 6,5	77,4 \pm 2,7	99,7 \pm 1,1
Telmisartan	107,0 \pm 3,2	109,3 \pm 4,1	96,5 \pm 3,7
Telmisartan 1-O-acilglucoronídeo	115,6 \pm 3,9	95,2 \pm 3,0	127,2 \pm 6,5
Losartan	124,7 \pm 17,9	95,2 \pm 5,7	104,6 \pm 3,8
Losartan ácido-5-carboxílico	106,4 \pm 6,4	111,9 \pm 4,3	124,4 \pm 2,1

Os valores obtidos para a exatidão, em termos da recuperação, para os anti-hipertensivos, na matriz da amostra, variou de 77,4 a 127,2%.

A Tabela 4.9 apresenta uma comparação entre alguns parâmetros analíticos obtidos no método desenvolvido e aqueles observados em trabalhos similares encontrados na literatura. Como observado, embora o método desenvolvido apresente uma faixa linear menor quando comparada a outros trabalhos (Chen *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2008; Shah *et al.*, 2009), a mesma não variou entre os analitos estudados. Os limites de detecção e de quantificação apresentaram valores superiores quando comparados a alguns dos trabalhos da literatura, como, por exemplo, aos obtidos por Choi *et al.* (2008) e Soldner *et al.* (2000), porém podem ser considerados adequados uma vez que são inferiores ao IC₅₀ do losartan (8,46 µg L⁻¹) e do valsartan (19,54 µg L⁻¹).

A precisão obtida neste estudo foi melhor que a obtida por pesquisadores utilizando plasma humano como matriz (Gonzales *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2005; Ferreirós *et al.*, 2007) e também quando utilizou-se HBBS como matriz (Hakala *et al.*, 2003). Os valores obtidos para a exatidão, em termos da recuperação, para os anti-hipertensivos, na matriz da amostra, variou entre 77,4 a 127,2%. Estes resultados se mostraram semelhantes aos apresentados por Ferreirós *et al.* (2007), utilizando plasma humano como matriz, assim como os resultados obtidos por Hakala *et al.* (2003), na matriz HBBS.

Salienta-se que, apesar de muitos trabalhos descreverem metodologias para análise de diferentes anti-hipertensivos, de forma concomitante ou não, não há na literatura métodos que apresentem determinação simultânea dos principais anti-hipertensivos antagonistas do sistema renina-angiotensina e seus respectivos metabólitos utilizando a técnica de espectrometria de massas de alta resolução (LC-MS/IT/TOF), ressaltando, dessa forma, a relevância do trabalho.

Tabela 4.9. Comparação de parâmetros em estudos de validação em trabalhos encontrados na literatura.

Referência	Faixa linear	Número de analitos	LD	LQ	Precisão (RSD%)	Exatidão (Recuperação, %)
Método desenvolvido	5 – 100 µg L ⁻¹	7	1,0 µg L ⁻¹	5,0 µg L ⁻¹	1,1 – 5,3	77,4 – 127,2
Soldner et al., 2000	-	2	-	0,5 µg L ⁻¹	-	> 95
Hakala et al., 2003	-	10	0,06 µg L ⁻¹	-	2,1 – 28,6	81,8 – 134,2
Chen <i>et al.</i> , 2005	1 a 2000 µg L ⁻¹	1	-	1,0 µg L ⁻¹	3,4 – 11,2	> 78
Young et al., 2006	-	-	-	-	-	-
Kristoffersen <i>et al.</i> , 2007	Variou entre os analitos	14	2,07 µg L ⁻¹	6,21 µg L ⁻¹	3,4 – 21,0	90,0 – 103,0
Kolocouri <i>et al.</i> , 2007	Variou entre os analitos	4	-	-	5,3 – 8,9	92,7 – 105,7
Ferreirós <i>et al.</i> , 2007	Variou entre os analitos	7	1,7 µg L ⁻¹	8,0 µg L ⁻¹	1,04 – 11,29	71,4 – 123

Zhu <i>et al.</i> , 2008	Variou entre os analitos	5	-	0,5 µg L ⁻¹	2,4 – 11,3	5,1 – 110,8
Choi <i>et al.</i> , 2008	1 a 1000 ng L ⁻¹	2	0,5 µg L ⁻¹	1,0 µg L ⁻¹	1,35 – 11,36	~ 98
Shah <i>et al.</i> , 2009	50 – 4500 µg L ⁻¹	4	-	2,0 e 50,0 µg L ⁻¹	< 10,0	90,28 – 96,63
Salvadori <i>et al.</i> , 2009	Variou entre os analitos	2	-	4,0 µg L ⁻¹	1,4 – 11,9	91,3 – 106,4
Prasaja <i>et al.</i> , 2009	Variou entre os analitos	2	-	1,85 µg L ⁻¹	3,55 – 7,77	79,03 – 90,24
Gonzales <i>et al.</i> , 2010	Variou entre os analitos	10	-	2,0 – 75,0 µg L ⁻¹	0,7 – 12,7	68 - 106

4.4. Aplicação do método

O método validado foi aplicado em amostras obtidas a partir de estudos de permeabilidade do fármaco telmisartan (TLM) através de membranas de células Caco-2. Os estudos de permeabilidade foram realizados para o fármaco puro e também para seus compostos de inclusão com a β -ciclodextrina (β CD), nas proporções fármaco: β CD de 1:1, 1:2 e 1:3. Na Tabela 4.10 estão apresentadas as concentrações médias ($n = 3$) obtidas para a análise do telmisartan na solução contida na câmara basolateral em cada experimento de permeação. Em cada experimento o tempo de recolhimento das alíquotas foi de 15, 30, 60 e 120 minutos.

Tabela 4.10. Concentrações de telmisartan obtidas nas análises das soluções contidas na câmara basolateral de experimentos de permeação em células de Caco-2.

Amostras	Tempo (min)	Concentração média ($\mu\text{g L}^{-1} \pm s$)	RSD (%)
TLM	15	332,3 \pm 48,6	14,6
	30	426,3 \pm 121,2	28,4
	60	684,5 \pm 131,3	19,2
	120	553,64 \pm 20,7	3,7
TLM: β CD (1:1)	15	709,2 \pm 160,5	22,6
	30	819,8 \pm 228,4	27,9
	60	1298,7 \pm 270,8	20,9
	120	1411,3 \pm 301,7	21,4
TLM: β CD (1:2)	15	134,1 \pm 26,3	19,6
	30	213,3 \pm 22,5	10,5
	60	183,7 \pm 74,7	40,6
	120	363,3 \pm 50,2	14,9
TLM: β CD (1:3)	15	120,4 \pm 25,1	20,8
	30	222,7 \pm 100,9	45,3
	60	286,2 \pm 81,6	28,5
	120	256,9 \pm 11,3	4,4

A biodisponibilidade (fração de uma dose administrada de uma droga não alterada que atinge a circulação sanguínea) de um fármaco, quando administrado por via oral, depende de vários fatores, entre os quais a velocidade de dissolução, a solubilidade e a velocidade de absorção intestinal (Rama *et al.*, 2005). Como observado, a inclusão do telmisartan à ciclodextrina na proporção de 1:1 aumentou tanto a velocidade como o grau de absorção do fármaco através das células de Caco-2. Esse resultado é particularmente interessante, pois em princípio, quanto mais rápida for a absorção de um fármaco, mais rápida será sua ação terapêutica, desde que a dose absorvida seja suficiente para obtenção do efeito desejado.

O telmisartan é caracterizado por apresentar uma biodisponibilidade muito baixa, de apenas ~42%, que pode ser atribuída à sua baixa solubilidade em fluidos biológicos (Singh & Jain, 2013). Assim, a formação de complexos TLM:βCD, pode viabilizar um aumento da biodisponibilidade e, conseqüentemente a dose administrada do fármaco será menor, bem como seus efeitos colaterais.

O aumento de solubilidade do telmisartan quando complexado com a βCD já havia sido demonstrado por Singh & Jain (2013). Assim, os dados obtidos nesse trabalho mostram que esse aumento de solubilidade acarreta também em um aumento da biodisponibilidade. Estudos adicionais serão realizados para tentar justificar a diminuição da biodisponibilidade do fármaco quando complexado com βCD em proporções de 1:2 e 1:3.

5. CONCLUSÕES

Diversos trabalhos que objetivam a determinação e quantificação de anti-hipertensivos, utilizando técnica semelhante à deste trabalho, estão descritos na literatura. Entretanto não há trabalhos que envolvam a análise simultânea do losartan, valsartan, telmisartan e seus respectivos metabólitos. Além disso, grande parte dos trabalhos utilizam matrizes como plasma humano, plasma de ratos e urina e, naqueles onde amostras resultantes de estudos de permeação são analisadas, a técnica de HPLC-UV é mais comumente utilizada. Dessa forma, são escassas as discussões acerca da validação de métodos que envolvem a determinação desse tipo de amostra, corroborando a necessidade do desenvolvimento e validação de novos métodos analíticos.

A técnica utilizada neste trabalho, LC-ESI/IT/TOF/MS, apresenta grande vantagem na determinação simultânea de compostos, uma vez que apresenta alta resolução e precisão de massas. Outro fator positivo é o pequeno tempo despendido nas análises, 14 minutos no total.

A seletividade é um parâmetro de grande importância quando o objetivo é a realização de determinações simultâneas. Como observado nos resultados, não foi verificada a presença de picos no tempo de retenção dos analitos, quando se injetou a matriz branca, assim este método pode ser considerado altamente seletivo. Seletividade esta também proporcionada devido ao uso do analisador tipo TOF de alta precisão.

A metodologia LC-ESI/IT/TOF/MS utilizada para determinação de anti-hipertensivos, em seus estudos de validação, se mostrou linear, com $R^2 > 0,98$ para todos os fármacos. Através dos testes estatísticos, F e t, foi possível verificar que os coeficientes angulares das curvas construídas em solvente e em matriz branca da amostra são estatisticamente iguais. Assim, o método não apresenta efeito de matriz. O LD e LQ do método foram determinados em 1,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, valores esses que são abaixo do IC_{50} do losartan (8,46 $\mu\text{g L}^{-1}$) e do valsartan (19,54 $\mu\text{g L}^{-1}$). A precisão, em termos da repetibilidade, também se mostrou adequada, uma vez que apresentou valores inferiores a 5,5% para todos os analitos. A exatidão, avaliada através de ensaios de recuperação, se mostrou semelhante à de outros trabalhos encontrados na literatura e obteve valores entre 77,4 a 127,2%.

Quando comparados a outros métodos desenvolvidos na literatura, os valores dos parâmetros de validação obtidos neste trabalho se mostram adequados e muitas

vezes superiores. Assim, pode-se asseverar que a metodologia proposta neste trabalho, possui características desejáveis e se mostra apropriada para a determinação simultânea de anti-hipertensivos em matrizes de estudos de permeação de fármacos. Cabe ressaltar que o método desenvolvido foi até o momento aplicado em amostras provenientes de estudos de permeação apenas do telmisartan, mas a metodologia será aplicada na análise de outros estudos em células de Caco-2 envolvendo os demais fármacos e suas formulações.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARTURSSON, P.; & KARLSSON, J. “Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells.” **Biochemical and biophysical research communications**, v. 175, n. 3 (1991) 880-885.

BLACK, H.R.; BAILEY, J.; ZAPPE, D.; SAMUEL, R. “Valsartan: More than a decade of experience.” **Drugs**, v. 69, n. 17 (2009) 2393-2414.

BLUMER, J.; BATISKY, D.L.; WELLS, T.; SHI, V.; SOLAR-YOHAY, S.; SUNKARA, G. “Pharmacokinetics of valsartan in pediatric and adolescent subjects with hypertension.” **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 49, n. 2 (2009) 235-241.

BOHETS, H.; ANNAERT, P.; MANNENS, G.; ANCIAUX, K.; VERBOVEN, P.; MEULDERMANS, W.; LAVRIJSEN, K. “Strategies for absorption screening in drug discovery and development.” **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 1, n. 5 (2001) 367-383.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (**ANVISA**), “Guia para Qualidade em Química Analítica: Uma Assistência à Habilitação”, vol. 1, (2005).

BRASIL, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (**INMETRO**): DOC.CCGRE-008, “Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos”, Revisão

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (**MAPA**): Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA), “Guia de validação e controle de qualidade analítica : fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários”, 1º ed., Brasília- (2011) 72 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. “Hipertensão arterial sistêmica para o Sistema Único de Saúde.” Brasília: Ministério da Saúde. **Cadernos de Atenção Básica**, n. 15, série A (2006) Normas e Manuais Técnicos.

CHEN, B.M.; LIANG, Y.Z.; WANG, Y.L.; DENG, F.L.; ZHOU, P.; GUO, F.Q.; HUANG, L.F. “Development and validation of liquid chromatography–mass spectrometry method for the determination of telmisartan in human plasma.” **Analytica Chimica Acta**, v. 540, n. 2 (2005) 367-373.

CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. “O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de

massas na análise de compostos tóxicos em alimentos.” **Química Nova**, v. 31, n. 3 (2008) 623-36.

CHOI, Y., KIM, J.K., BAN, E., PARK, J.S., KIM, C.K. “Determination of losartan in human plasma by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (LC-ESI-MS): application to bioequivalence study.” **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 31, n. 17 (2008) 2643-2656.

COLLINS, C.H. Fundamentos de cromatografia. Campinas: **Ed. UNICAMP** (2006). 453 p. ISBN 8526807048.

CROMM, K.F.; KEATING, G.M. “A review of its use in patients with heart failure and/or left ventricular systolic dysfunction after myocardial infarction.” **American Journal of Cardiovascular Drugs**, v. 4, n. 6 (2004) 395-404.

DE OLIVEIRA, E.M.; ALVES, G.B.; BARAUNA, V.G.. “Sistema renina-angiotensina: interação gene–exercício.” **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 10 (2003) 125-129.

DEEKS, E.D. “Amlodipine/Valsartan/Hydrochlorothiazide: Fixed-dose combination in hypertension.” **American Journal of Cardiovascular Drugs**, v. 9, n. 6 (2009) 411-418.

DHOLE, S.N., KUCHEKAR, B.S. “Comparative study of antihypertensive activity of telmisartan with telmisartan-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexes.” **International Journal of Comprehensive Pharmacy**, v. 2, n. 10 (2011) 1-5.

DÜLCKS, T., JURASCHEK, R. “Electrospray as an ionization method for mass spectrometry.” **Journal of Aerosol Science**, v. 30, n. 7 (1999) 927-943.

EBNER, T., HEINZEL, G., PROX, A., BESCHKE, K., WACHSMUTH, H. “Disposition and chemical stability of telmisartan 1-O-acylglucuronide.” **Drug metabolism and disposition**, v. 27, n. 10 (1999) 1143-1149.

FENN, J.B.; MANN, M.; MENG, C.K.; WONG, S.;F. WHITEHOUSE, C.M. “Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules.” **Science**, v. 246, n. 4926 (1989) 64-71.

FERREIRA, S.R.G.; MOURA, E.C.; MALTA, D.C.; SARNO, F. “Frequência de hipertensão arterial e fatores associados: Brasil, 2006.” **Revista de Saúde Pública**, v. 43, supl. 2 (2009), 98-106.

FERREIRÓS, N.; DRESEN, S.; ALONSO, R.M.; WEINMANN, W. “Validated quantitation of angiotensin II receptor antagonists (ARA-II) in human plasma by liquid-chromatography-tandem mass spectrometry using minimum sample clean-up and

investigation of ion suppression.” **Therapeutic drug monitoring**, vol. 29, n. 6 (2007) 824-834.

FILHO, J.R.N.; DEBASTIANI, D.; NUNES, A.D.; PERES, K.G. “Prevalência de fatores de risco cardiovascular em adultos de Luzerna, Santa Catarina, 2006.” **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 89, n. 5 (2007) 319-324.

GONZALEZ, O.; IRIARTE, G.; RICO, E.; FERREIRÓS, N.; MAGUREGUI, M.I.; ALONSO, R.M.; JIMÉNEZ, R.M. “LC-MS/MS method for the determination of several drugs used in combined cardiovascular therapy in human plasma.” **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 28 (2010) 2685-2692.

GRIENGLING, K.K.; MURPHY, T.J.; ALEXANDER, R.W. “Molecular biology of the renin-angiotensin system.” **Circulation**, v. 87, n. 6 (1993) 1816-1828.

HILGERS, A.R.; CONRADI, R.A.; BURTON, P.S. “Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa.” **Pharmaceutical research**, v. 7, n. 9 (1990) 902-910.

HIRAYAMA F.; UEKAMA, K.. “Cyclodextrin-based controlled drug release system.” **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 36 (1999) 125–141

HOFFMANN, E; STROOBANT, V. “Mass spectrometry : principles and applications.) – 3rd ed. **Ed. John Wiley & Sons Ltd** (2007). 502 p. ISBN 978-0-470-03310-4.

IGLESIAS, A.H. Introdução ao Acoplamento Cromatografia Líquida – Espectrometria de Massas. (2012). Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/met/index.php/17-met/138-programacao1>. [Acesso em 02.2013].

IRIARTE, G.; FERREIRÓS, N.; IBARRONDO, I.; ALONSO, R.M.; MAGUREGI, M.I. GONZALEZ, L.; JIMÉNEZ, R.M. “Optimization via experimental design of an SPE-HPLC-UV-fluorescence method for the determination of valsartan and its metabolite in human plasma samples.” **Journal of separation science**, v. 29, n. 15 (2006) 2265-2283.

KANE, R.N.; KUCHEKAR, B.S. “Preparation, physicochemical characterization, dissolution and formulation studies of telmisartan cyclodextrin inclusion complexes.” **Asian Journal of Pharmaceutics**, v. 4, n. 1 (2010) 52.

KAUSALYA, J.; SURESH, K.; PADMAPRIYA, S.; RUPENAGUNTA, A.; SENTHILNATHAN, B. “Solubility and Dissolution Enhancement Profile of Telmisartan using various techniques.” **International Journal of PharmTech Research**, v. 3 (2011) 1737-1749.

KOLOCOURI, F.; DOTSIKAS, Y.; APOSTOLOU, C.; KOUSOULOS, C.; LOUKAS, Y. L. “Simultaneous determination of losartan, EXP-3174 and hydrochlorothiazide in plasma via fully automated 96-well-format-based solid-phase extraction and liquid chromatography–negative electrospray tandem mass spectrometry.” **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387 (2007) 593–601.

KRATZ, J.M. “Implementação e aplicação do modelo in vitro com células Caco-2 para estudo da permeabilidade intestinal de fármacos.” 186 f. **Tese (Doutorado)** - Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina (2011).

KRISTOFFERSEN, L.; ØIESTAD, E.L.; OPDAL, M.S.; KROGH, M.; LUNDANES, E.; CHRISTOPHERSEN, A.S. “Simultaneous determination of 6 beta-blockers, 3 calcium-channel antagonists, 4 angiotensin-II antagonists and 1 antiarrhythmic drug in post-mortem whole blood by automated solid phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry. Method development and robustness testing by experimental design.” **Journal of Chromatography B**, v. 850 (2007) 147–160.

LI, J., LOH, X.J. “Cyclodextrin-based supramolecular architectures: syntheses, structures, and applications for drug and gene delivery.” **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 9 (2008) 1000-1017.

MAGALHÃES, E.J. “Desenvolvimento de métodos para quantificação de drogas em matrizes de interesse forense.” 152 f. **Tese (Doutorado)** – Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais (2012)

MAILLARD, M.; BURNIER, M. “Telmisartan/hydrochlorothiazide: a new fixed dose combination.” **Expert Review of Cardiovascular Therapy**, v. 3, n. 3, (2005) 375-386.

MAXWELL, E.J.; CHEN, D.D. “Twenty years of interface development for capillary electrophoresis–electrospray ionization–mass spectrometry.” **Analytica Chimica Acta**, v. 627, n. 1 (2008) 25-33.

MEKJARUSKUL, C.; YANG, Y.; LEED, M.G.D.; SADGROVE, M.P.; JAY, M.; SRIPANIDKULCHAIA, B. “Novel formulation strategies for enhancing oral delivery of methoxyflavones in *Kaempferia parviflora* by SMEDDS or complexation with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin” **International Journal of Pharmaceutics**, V. 445 (2013) 1– 11.

MENDES, M.J.F.L.; ALVES, J.G.B.; ALVES, A.V.; SIQUEIRA, P.P.; FREIRE, E.F.C. “Associação de fatores de risco para doenças cardiovasculares em adolescentes e seus pais.” **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 6, supl 1 (2006) S49-S54.

MOREIRA, R.P.L. “Desenvolvimento e validação de métodos multirresíduos para determinação de medicamentos veterinários em alimentos e em ração utilizando CL-EM/EM. **Tese (Doutorado)** – Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais (2012).

PASSOS, V.M.D.A.; ASSIS, T.D.; BARRETO, S.M.. “Hipertensão arterial no Brasil: estimativa de prevalência a partir de estudos de base populacional.” **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 15, n. 1, (2006) 35-45.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. “Introdução à espectroscopia.” São Paulo: **Ed. Cengage Learning** (2010). 700 p. ISBN 9788522107087.

PIMENTA, E. “Hidroclorotiazida x clortalidona: os diuréticos tiazídicos são todos iguais.” **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 15, n. 3 (2008) 166-167.

PRASAJA, B.; SASONGKO, L.; HARAHAP, Y.; LUSTHOM, W.; GRIGG, M. “Simultaneous quantification of losartan and active metabolite in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using irbesartan as internal standard.” **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n. 3 (2009) 862-867.

QUIROZ, M.C.M.B. “Caracterização não farmacológica de um novo dispositivo de liberação controlada para o estudo crônico do SRA.” 113 f. **Dissertação (Mestrado)** – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (2006).

RAMA, A.C.R.; VEIGA, F.; FIGUEIREDO, I.V.; SOUSA, A.; CARAMONA, M. “Aspectos biofarmacêuticos da formulação de medicamentos para neonatos. Fundamentos da complexação de indometacina com hidroxipropil- β -ciclodextrina para tratamento oral do fechamento do canal arterial”. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3 (2005) 281-299.

RAPOSO-COSTA, A.P.; REIS, A.M. “O sistema renina-angiotensina em ovário.” **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 44, n. 4 (2000) 306-313.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I C.S.F.; MELO, L.F.C. “Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos”. **Química Nova**, v. 27 (2004) 771-780.

RIBEIRO, W.; MUSCARÁ, M.N. “Características farmacocinéticas de antagonistas de cálcio, inibidores da ECA e antagonistas de angiotensina II em humanos.” **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8 (2001) 114-124.

RIGATTO, K.V.; BOHLKE, M.; IRIGOYEN, M.C. “Sistema renina angiotensina: da fisiologia ao tratamento.” **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, v. 3 (2004) 1-5.

SALVADORI, M.C.; MOREIRA, R.F.; BORGES, B.C.; ANDRAUS, M.H.; AZEVEDO, C.P.; MORENO, R.A.; BORGES, N.C. “Simultaneous determination of losartan and hydrochlorothiazide in human plasma by LC/MS/MS with electrospray ionization and its application to pharmacokinetics.” **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 31, n. 5 (2009) 415-427.

SCHUPP, M.; UNGER, T. “Telmisartan: from lowering blood pressure to end-organ protection.” **Future Cardiology**, v.1 , n.1 (2005) 7-15.

SEELAM, R.R.; CHANDIRAN I, S.; DIVI, K.R.; JAYAVEERA, K.N. “Development and Validation of High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometric Method for Simultaneous Quantification of Telmisartan in Human Plasma.” **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 2, n. 3 (2010) 188-192.

SEREBRUANY, V.L.; MALININ, A.I.; LOWRY, D.R.; SANE, D.C.; WEBB, R.L.; GOTTLIEB, S.O.; O’CONNOR, C.M.; HENNEKENS, C.H. “Effects of valsartan and valeryl 4-hydroxy valsartan on human platelets: a possible additional mechanism for clinical benefits.” **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 43, n. 5 (2004) 677-684.

SHAH, H.J.; KATARIA, N.B.; SUBBAIAH, G.; PATEL, C.N. “Simultaneous LC–MS–MS Analysis of Valsartan and Hydrochlorothiazide in Human Plasma.” **Chromatographia**, v. 69, n. 9-10 (2009) 1055-1060.

SHARPE, M.; JARVIS, B.; GOA, K.L. “Telmisartan: A review of its use in hypertension.” **Drugs**, v. 61, n. 10 (2001) 1501-1529.

SILVA, J.C.C. “Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de microcistina-LR e agrotóxicos em águas superficiais, utilizando as técnicas de cromatografia líquida e cromatografia gasosa acopladas a espectrometria de massas” 176 p. **Dissertação (Mestrado)** - Programa de Pós - graduação em Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Ouro Preto(2010).

SINGH, R.; JAIN, D.A. “Development, characterization & stabilization of poorly water soluble drugs utilizing solid dispersion techniques by using β -cyclodextrin.” **Journal of Drug Delivery & Therapeutics**; v. 3, n. 2 (2013) 74-79.

SINISTERRA, R.D., DE PAULA, W.X.; SANTOS, R.A.S., FREZARD, F.J.G. “Preparation of formulations of angiotensin II AT1 receptor antagonists for the

treatment of arterial hypertension, others cardiovascular illnesses and its complications.” **Patent WO02080910A1** (2002).

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA / Sociedade Brasileira de Hipertensão / Sociedade Brasileira de Nefrologia. “VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão.” **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 95, n. 1, supl.1 (2010) 1-51.

SOLDNER, A.; BENET, L.Z.; MUTSCHLER, E.; CHRISTIANS, U. “Active transport of the angiotensin-II antagonist losartan and its main metabolite EXP 3174 across MDCK-MDR1 and Caco-2 cell monolayers.” **British Journal of Pharmacology**, v. 129, n. 6 (2000) 1235-1243.

SOUSA, A.de. “Híbridos de Gel Polimérico em Sílica Mesoporosa Estruturalmente Ordenada para Liberação Controlada de Fármacos” 175 f. **Tese (Doutorado)** – Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais (2009)

SOUSA, F.B. “Estudo e Caracterização Estrutural e Termodinâmica de Compostos de Inclusão Formados entre Antidepressivos e Ciclodextrinas” 160 f. **Dissertação (Mestrado)** – Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais (2007)

SOUSA, F.B (a) “Estudo e Caracterização Físico-Química de Sistemas Supramoleculares Nanoagregados e de Matrizes Poliméricas Associadas à Ciclodextrina” 143 f. **Tese (Doutorado)** – Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais (2010)

SOUZA, J.; FREITAS, Z.M.F., STORPIRTIS, S. “Modelos in vitro para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção.” **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 4 (2007) 515-527.

SOUZA, S.C.V. (b) “Procedimento para Validação Intralaboratorial de Métodos de Ensaio: Delineamento e Aplicabilidade em Análises de Alimentos.” 296 f. **Tese (Doutorado)** - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais (2007).

STREEL, B.; LAINE, C.; ZIMMER, C.; SIBENALER, R.; CECCATO, A. “Enantiomeric determination of amlodipine in human plasma by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry.” **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 54, n. 1 (2002) 357-368.

SZEJTLI, J. “Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry.” **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5 (1998) 1743.

TRIALISTS' COLLABORATION, Blood Pressure Lowering Treatment. "Effects of different blood-pressure-lowering regimens on major cardiovascular events: results of

prospectively-designed overviews of randomised trials." **Lancet**. v. 362, n. 9395 (2003) 1527-1535.

UNGER, T. "The Role of the Renin–Angiotensin System in the Development of Cardiovascular Disease." **American Journal of Cardiology**, v. 89, (2002) 3A–10A.

VYAS, A., SARAF, S., SARAF, S. "Cyclodextrin based novel drug delivery systems" **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 62, n. 1-2 (2008) 23-42.

WIENEN, W.; ENTZEROTH, M.; MEEL, J. C.; STANGIER, J.; BUSCH, U.; EBNER, T.; SCHMID, J.; LEHMANN, H.; MATZEK, K.; KEMPTHORNE-RAWSON, J.; GLADIGAU, V.; HAUDEL, N. H. "A review on telmisartan: A novel, long-acting angiotensin II-receptor antagonist." **Cardiovascular Drug Reviews**, v. 18, n. 2 (2000) 127-154.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO (2011). Disponível em: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>. [Acesso em 02.2013]

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO (2012). Disponível em: http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2012/en/index.html. [Acesso em 02.2013]

YAMASHITA, M.; FENN, J.B. "Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme." **The Journal of Physical Chemistry**, v. 88, n. 20 (1984) 4451-4459.

YOUNG, A.M.; AUDUS, K.L.; PROUDFOOT, F.; YAZDANIAN, M. "Tetrazole compounds: the effect of structure and pH on Caco-2 cell permeability. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, n. 4 (2006) 717-725.

ZHANG, F.; REN, J.; CHAN, K.; CHEN, H. "Angiotensin-(1–7) regulates Angiotensin II-induced VCAM-1 expression on vascular endothelial cells" **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 430 (2013) 642–646

ZHU, X.; SUN, J.; HAO, H.; WANG, G.; HU, X.; LV, H.; XU, J. "Simultaneous determination of multiple angiotensin type 1 receptor antagonists and its application to high-throughput pharmacokinetic study: Cassette dosing versus cassette analysis." **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 272, n. 2 (2008) 127-136.