

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**MARIANA AZEVEDO ROSA**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE ALBUMINA  
SÉRICA BOVINA PARA O EMPREGO EM PREPARO DE AMOSTRAS**

**Alfenas/MG**

**2019**

**MARIANA AZEVEDO ROSA**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE ALBUMINA  
SÉRICA BOVINA PARA EMPREGO EM PREPARO DE AMOSTRAS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título em Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo

**Alfenas/MG**

**2019**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central – Campus Alfenas

Rosa, Mariana Azevedo.

R788s Síntese e caracterização de micropartículas de albumina sérica  
bovina para emprego em preparo de amostras / Mariana Azevedo Rosa. –  
Alfenas/MG, 2019.

117 f.: il. --

Orientador: Eduardo Costa de Figueiredo.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade  
Federal de Alfenas, 2019.

Bibliografia.

1. Albumina sérica -- Bovina. 2. Microextração em fase sólida. 3. Anti-  
hipertensivos. 4. Cromatografia líquida . 5. Espectrometria de massas.  
I. Figueiredo, Eduardo Costa de. II. Título.

CDD- 547.3

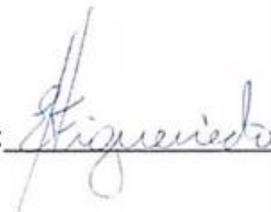
MARIANA AZEVEDO ROSA

“SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA PARA O EMPREGO EM PREPARO DE AMOSTRAS”

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em: 22/04/2013

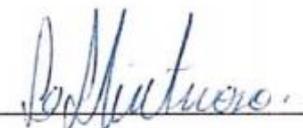
Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. José Alberto Fracassi Silva  
Instituição: UNICAMP

Assinatura: 

Prof. Dr. Luciano Sindra Virtuoso  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais, Elaine e Joel, por estarem comigo sempre e por me incentivarem e apoiarem durante todas as situações, por acreditarem em mim em momentos que nem eu mesma acreditava e por serem as primeiras pessoas com as quais quero dividir todos os momentos. Gostaria de agradecer também à minha avó, Maria, e às minhas irmãs, Tatiana e Geovana, vocês contribuíram muito para essa história, obrigada por poder contar sempre com vocês.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo, por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa por duas vezes, pela confiança em meu trabalho, por toda a ajuda e ensinamentos, pela compreensão e preocupação e por se manter sempre positivo e confiante.

Aos alunos do LATF - Aline, Alyne, Ana Flávia, Beatriz, Bruna, Daniel, Dialilson, Gabriela, Grazielle, Jonathan, Jorge, Juliana, Lucas, Lucimara, Luiz, Marcello, Matheus, Rafael, Rafaela, Rodrigo, Simone e Taila; às professoras – Isarita, Mariane e Vanessa; à Patrícia e à Márcia, agradeço pela convivência e por sempre estarem disponíveis. Em especial, Alberto, Ayla, Henrique, Lailah, Mayara, Milton e Tássia, obrigada por terem contribuído imensamente para esse projeto com ideias, conselhos, ensinamentos, dias nos equipamentos e assuntos aleatórios. Essa dissertação tem muito de vocês.

À Mayara, que me aguentou durante todo o mestrado, sou muito grata por dividir com você todas as etapas dessa jornada, desde o momento em que me ofereceu ajuda já nas primeiras disciplinas até o fim da escrita das dissertações. Esses dois anos não teriam sido os mesmos sem você. Também agradeço muito ao Henrique por ter confiado em mim já na iniciação científica, pelo apoio de sempre e por ter insistido para que eu fizesse a prova do mestrado.

Ao Érik e ao Júnior, pelos mais de dez anos de amizade e por nunca termos nos perdido, mesmo cada um em uma cidade diferente. Obrigada pelos assuntos sérios, conversas aleatórias e por todo apoio e entusiasmo. Agradeço também aos demais amigos de Pouso Alegre, em especial à Amanda.

À Giovana e à Leticia, as primeiras pessoas que conheci na Unifal e às quais sou imensamente grata de ter por perto até hoje. Obrigada por dividirmos não só a graduação, mas o mestrado também, pelas risadas, pela ajuda de sempre e por estarem junto comigo

nos momentos bons e nos complicados também. Ao Luiz Paulo e à Monalisa, que também me acolheram em Alfenas, obrigada por todo apoio, pelas conversas e pelas bandas apresentadas.

À Universidade Federal de Alfenas, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (financiamento 001) por me proporcionar a possibilidade de realizar esse mestrado. Ao Laboratório de Microscopia e Análise Ultraestrutural (UFLA) e os laboratórios da Unifal: LSLF, LACFAR, LabIQ, LabAFM e NCQ, que abriram suas portas para que fossem realizados diversos dos ensaios que compõe essa dissertação. À CEMIC e à FINEP (Proc. 0179/12) pela oportunidade de realização das microscopias de força atômica.

Agradeço a todos que contribuíram para as amostras desse projeto, seja doando ou coletando sangue para mim; aos voluntários que forneceram as chamadas amostras reais. À Carolina, que primeiramente me ajudou com as fibras e ao Dialison pela ajuda estatística.

Enfim, agradeço a todas as pessoas, familiares e amigos que torceram para esse projeto e a todos que direta ou indiretamente contribuíram com ele. “Embora venhamos de lugares diferentes e falemos línguas diferentes, nossos corações batem como um só”.

“Existem inúmeros tipos de livros no mundo, e faz sentido porque existem inúmeros tipos de pessoas. ”

- *Lemony Snicket, 1999.*

## RESUMO

O preparo de amostras é a etapa do procedimento analítico que apresenta maiores possibilidades de erros e na qual é dispendido o maior tempo. Técnicas empregando materiais de acesso restrito (RAMs) estão sendo desenvolvidas para minimizar as dificuldades presentes no preparo de matrizes complexas. A albumina sérica bovina (BSA) vem sendo amplamente utilizada para o preparo de RAMs, uma vez que associada com outros materiais confere a capacidade de excluir macromoléculas por mecanismos físicos e químicos. Nesse contexto, têm-se os objetivos principais do trabalho: a síntese de partículas de BSA (sem materiais suporte) e o seu uso inédito como RAM em sistemas de extração em fase sólida para a determinação de anti-hipertensivos em plasma humano. As micropartículas foram obtidas por processo de coacervação, usando-se BSA, solução fosfato 0,2 mmol L<sup>-1</sup> (pH=5,00), etanol, glutaraldeído 25% e borohidreto de sódio 1% como reagentes de síntese. Estudos de caracterização do material envolveram testes de exclusão de proteínas (resultados superiores a 96% foram obtidos) e avaliações quanto à cinética e às isotermas de adsorção (modelos de Elovich e de Sips foram melhor ajustados para os analitos e esses estudos ainda mostraram a capacidade do material sintetizado em interagir tanto com fármacos de alta quanto com os de baixa taxa de ligação a proteínas plasmáticas). Caracterizações do material foram obtidas empregando testes de solubilidade, espectroscopia de infravermelho, microscopia eletrônica, microscopia de força atômica, potencial zeta, espalhamento de luz dinâmico, porosimetria e análises termogravimétricas. Dois métodos distintos para a extração de fármacos foram desenvolvidos, um referente a extração *online* e o outro à microextração em fase sólida (SPME). Ambos evidenciaram a capacidade extrativa das micropartículas de BSA, e o segundo foi validado apresentando linearidade ( $r \geq 0,99$ ), precisão e exatidão (respeitando limites propostos por guias de validação), além de robustez para sete parâmetros distintos e limites de quantificação adequados (variando de 15 a 100 µg L<sup>-1</sup>). Ainda sobre a SPME, fibras de micropartículas de BSA foram confeccionadas e as mesmas apresentaram características favoráveis como: resistência, baixo custo (R\$ 0,20/fibra), possibilidade de reuso, reprodutibilidade entre diferentes lotes (n=3) de síntese (desvios padrão relativos inferiores a 10%), fácil manuseio e portabilidade. Amostras de plasma de pacientes que faziam o uso de anti-hipertensivos foram analisadas por SPME LC-MS/MS e concentrações quantificáveis dos fármacos foram encontradas.

Palavras-chaves: Micropartículas de BSA; RAM; fibras de SPME.

## ABSTRACT

The sample preparation is the step of the analytical procedure that presents higher possibilities of errors and the one that consumes more time. Techniques employing restricted access materials (RAMs) are being developing to minimize the difficult of the complex matrix preparation. The bovine serum albumin (BSA) are being widely used to prepare RAMs, once in association with other materials confers to them the capacity to exclude macromolecules by physics and chemistry mechanisms. In this scenario, we have the main goals of this work: the synthesis of BSA particles (without the use of support material) and their novel use as RAM in solid phase extraction systems to anti-hypertensives determination from untreated human plasma. The microparticles were obtained by the coacervation process, using BSA, phosphate solution  $0.2 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH=5.00), ethanol, glutaraldehyde 25% and sodium borohydride 1% as synthesis reagents. The characterization studies involved proteins exclusion tests (results above 96% were obtained) and evaluations about kinetic and adsorption isotherms were performed (Elovich and Sips models best fitted the analytes and these studies also shown the ability of the synthetized material to interact both with drugs that have low and high protein binding rate). The material characterization was obtained employing solubility tests, infrared spectroscopy, transmission electron microscopy, atomic force microscopy, zeta potential, dynamic light scattering, porosimetry and thermogravimetric analyses. Two different methods for extraction were developed. One based on the online extraction and another on the solid phase microextraction (SPME). Both evidenced the extraction capacity of the BSA microparticles, and the second one was validated presenting linearity ( $r \geq 0.99$ ), precision, accuracy (respecting the limits proposed by the validation guidelines), showed robustness for seven distinct parameters and suitable limits of quantification (ranging from 15 to  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ). In addition, the SPME BSA microparticle probes presented favorable characteristics like: resistance, low cost (R\$ 0.20/probe), reuse possibility, reproducibility among different (n=3) synthesis (relative standard deviations above 10%), easy handling and portability. Plasma samples from patients whose use the anti-hypertensives were analyzed with SPME LC-MS/MS and quantified concentrations of the drugs were found in the samples.

Key-words: BSA microparticles; RAM; SPME probes.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

ACN	-	Acetonitrila
AFM	-	Microscopia de força atmica, <i>atomic force microscopy</i>
$a_K$	-	Constante do modelo de Khan
ANAVA	-	Análise de variância
$a_R$	-	Expoente do modelo de Redlich- Peterson
$a_T$	-	Constante do modelo de Toth
ATE	-	Atenolol
ATR	-	Refletância total atenuada, <i>attenuated total reflectance</i>
$\beta_0$	-	Coefficiente angular
$\beta_1$	-	Coefficiente linear
$b_K$	-	Expoente do modelo de Khan
BSA	-	Albumina sérica bovina, <i>bovine serum albumin</i>
BET	-	Análise da área superficial e porosidade; <i>Brunauer, Emmett and Teller</i>
Ce	-	Concentração dos analitos no equilíbrio para o estudo de isoterma
CE	-	Energia de colisão, <i>collision energy</i>
CLOR	-	Clortalidona
CNT	-	Nanotubo de carbono, <i>carbon nanotube</i>
DLS	-	Espalhamento de luz dinâmico, <i>dynamic light scattering</i>
DP	-	Desvio Padrão
DPR%	-	Desvio Padrão Relativo
DSC	-	Calorimetria exploratória diferencial, <i>differential scanning calorimetry</i>
DTG	-	Primeira derivada da análise termogravimétrica
d-SPE	-	Extração em fase sólida dispersiva, <i>dispersive solid phase extraction</i>
E%	-	Erro relativo
ESI	-	Ionização por electrospray, <i>electrospray ionization</i>
FM	-	Fase móvel
HIDRO	-	Hidroclorotiazida
HPLC	-	Cromatografia líquida de alta eficiência, <i>high performance liquid chromatography</i>
HSA	-	Albumina sérica humana, <i>human serum albumin</i>
IIP	-	Polímero de impressão iônica, <i>ionic impressed polymer</i>

IR	- Espectroscopia de infravermelho, <i>infrared spectroscopy</i>
k	- Constante no modelo de Elovich
$k_r$	- Constante do modelo de Redlich-Peterson
$k_1$	- Constante de velocidade de pseudoprimeira ordem
$k_2$	- Constante de velocidade de pseudo segunda ordem
$k_{AV}$	- Constante cinética de Avrami
$k_{id}$	- Constante de velocidade da difusão intrapartícula
$k_F$	- Constante do modelo de Freundlich
$k_L$	- Constante de afinidade de Langmuir
$k_S$	- Constante do modelo de Sips
$k_T$	- Constante do modelo de Toth
LC	- Cromatografia líquida, <i>liquid chromatography</i>
LD	- Limite de detecção
LI	- Limite inferior
LLE	- Extração líquido-líquido, <i>liquid liquid extraction</i>
LQ	- Limite de quantificação
LS	- Limite superior
MEP	- Microextração por sorvente empacotado, <i>microextraction by packed sorbent</i>
MET	- Metoprolol
MeOH	- Metanol
MIP	- Polímero de impressão molecular, <i>molecular imprinted polymer</i>
MM	- Massa molecular
MRM	- <i>Multiple reaction monitoring</i>
MS	- Espectrometria de massas, <i>mass spectrometry</i>
$m/z$	- Razão massa-carga
n	- Taxa inicial de adsorção do modelo de Elovich
NAD	- Nadolol
$n_{AV}$	- Expoente de Ordem fracionária (Avrami)
NCM	- Modo de não contato para microscopia de força atômica, <i>non contact mode</i>
$n_F$	- Expoente do modelo de Freundlich
$n_S$	- Expoente do modelo de Sips
PDI	- Índice de polidispersão
PDMS	- Polidimetilsiloxano
PI	- Padrão interno

pI	- Ponto isoelétrico
PF	- Ponto de fusão
PROP	- Propranolol
q <sub>e</sub>	- Capacidade de adsorção
q <sub>s</sub>	- Capacidade de saturação teórica
r	- Coeficiente de correlação
RACC	- Carvão ativado de acesso restrito, <i>restricted access -activated carbon cloths</i>
RACNT	- Nanotubo de carbono de acesso restrito, <i>restricted access carbon nanotube</i>
RAM	- Material de acesso restrito, <i>restricted access material</i>
RAMIP	- Polímero de impressão molecular de acesso restrito
SBSE	- Extração por barra sortiva
SEM	- Microscopia eletrônica de varredura, <i>scanning electron microscopy</i>
SIM	- <i>Selected ion monitoring</i>
SPE	- Extração em fase sólida, <i>solid phase extraction</i>
SPME	- Microextração em fase sólida, <i>solid phase microextraction</i>
t	- Tempo de contato
t <sub>1/2</sub>	- Tempo de meia vida
TGA	- Análise termogravimétrica, <i>thermogravimetric analyses</i>
TR	- Tempo de permanência retenção
Trp	- Triptofano
t <sub>t</sub>	- Expoente do modelo de Toth
UHPLC	- Cromatografia líquida de ultra performance, <i>Ultra high performance liquid chromatography</i>
UV-VIS	- Ultravioleta-visível

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Esquema representativo da válvula de comutação.....	21
Figura 2	- Esquema para extração e dessorção usando fibra comercial de SPME.....	22
Figura 3	- Formas de SPME.....	22
Figura 4	- Exemplificação do processo de exclusão de interferentes por meio de um RAM.....	25
Figura 5	- Estrutura cristalográfica da BSA.....	28
Figura 6	- Estrutura química da clortalidona e hidroclorotiazida.....	31
Figura 7	- Estrutura química do atenolol, do metoprolol, do propranolol e do nadolol.....	32
Figura 8	- Esquema do processo de síntese das partículas de BSA.....	39
Figura 9	- Esquema do sistema utilizado para os testes de exclusão.....	43
Figura 10	- Esquema da configuração do HPLC para os estudos de cinética e de isotermas.....	45
Figura 11	- Esquema do preparo da fibra extratora.....	48
Figura 12	- Aparato utilizado para o preparo de amostras.....	50
Figura 13	- Processo de entrecruzamento da BSA.....	60
Figura 14	- Fotos da BSA e do material sintetizado.....	60
Figura 15	- Diferença de solubilidade entre BSA e partículas de BSA.....	61
Figura 16	- Espectroscopia no infravermelho.....	62
Figura 17	- Tamanho e distribuição das micropartículas obtidas por meio da técnica de DLS.....	63
Figura 18	- Microscopias de força atômica para as partículas sintetizadas.....	64
Figura 19	- Microscopia eletrônica das partículas de BSA.....	65
Figura 20	- Curvas de potencial zeta.....	66
Figura 21	- Curvas de TG e DTG.....	67
Figura 22	- Curva de TG e DSC em função da temperatura.....	68
Figura 23	- Coluna RAM confeccionada.....	69
Figura 24	- Curva de resistência ao fluxo.....	70
Figura 25	- Exclusão de proteínas de solução de BSA e de interferentes presentes na matriz.....	72
Figura 26	- Áreas obtidas para atenolol e para clortalidona no estudo do pH de adsorção.....	73
Figura 27	- Cinéticas de adsorção.....	75
Figura 28	- Modelo de difusão intrapartícula.....	76
Figura 29	- Isotermas de adsorção.....	77
Figura 30	- Perfil cromatográfico para os analitos com diferentes fases de separação.....	80
Figura 31	- Cromatogramas para branco e para solução aquosa fortificada com os analitos.....	81

Figura 32	- Separação do atenolol empregando fases de separação com diferentes ajustes de pH.....	82
Figura 33	- Cromatogramas de plasma fortificado após a adição do padrão interno.....	84
Figura 34	- Cromatogramas para plasma fortificado com o forno analítico operando a 40°C e 35°C.....	86
Figura 35	- Imagem da fibra extratora confeccionada.....	88
Figura 36	- Variáveis otimizadas para o preparo de amostras.....	92
Figura 37	- Esquema do sistema cromatográfico para as análises .....	94
Figura 38	- Áreas relativas para as diferentes extrações sequenciais com uma única fibra.....	96
Figura 39	- <i>Boxplots</i> para metoprolol e para propranolol.....	99
Figura 40	- Cromatogramas para plasma branco e plasma fortificado nos pontos baixo, médio e alto.....	100
Figura 41	- Cromatogramas de amostras de voluntários.....	104

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Propriedades dos fármacos clortalidona e hidroclorotiazida.....	31
Tabela 2	- Propriedade dos fármacos atenolol, metoprolol, propranolol e nadolol.....	33
Tabela 3	- Fragmentos utilizados para as análises por ESI LC-MS/MS.....	49
Tabela 4	- Condições para a determinação dos analitos por LC-MS/MS.....	50
Tabela 5	- Parâmetros para avaliar a robustez do método proposto.....	56
Tabela 6	- Matriz para a realização do Teste de Youden.....	56
Tabela 7	- Resultados do teste de porosimetria.....	69
Tabela 8	- Exclusão de proteínas para uma solução de BSA.....	70
Tabela 9	- Exclusão de interferentes para um plasma branco.....	72
Tabela 10	- Ajustes de modelos para cinética de adsorção dos analitos.....	75
Tabela 11	- Ajustes de modelos para isoterma de adsorção dos analitos.....	78
Tabela 12	- Estudos de tempo de carregamento para o sistema de <i>column switching</i> .....	83
Tabela 13	- Eventos para o <i>column switching</i> .....	83
Tabela 14	- Resolução para atenolol e clortalidona em diferentes temperaturas da coluna analítica.....	85
Tabela 15	- Resolução para atenolol e clortalidona em diferentes temperaturas da coluna RAM.....	85
Tabela 16	- Comparação entre diferentes lotes de fibras para a extração dos analitos.....	95
Tabela 17	- Comparação entre as diferentes extrações sequenciais com uma mesma fibra.....	96
Tabela 18	- Estabilidade da matriz e do eluato.....	97
Tabela 19	- Comparação entre os coeficientes angulares das curvas em solvente e em matriz.....	98
Tabela 20	- Estimativas dos parâmetros das curvas de calibração ajustada....	99
Tabela 21	- Análise das pressuposições das curvas ajustadas.....	100
Tabela 22	- Precisão e exatidão para os fármacos em estudo.....	101
Tabela 23	- Recuperação absoluta dos analitos.....	102
Tabela 24	- Comparação dos diferentes ensaios para o teste de robustez.....	103
Tabela 25	- Concentração dos fármacos encontrados em plasma de voluntários.....	104

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
2.1	EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.....	19
<b>2.1.1</b>	<b>Extração em fase sólida <i>online</i>: <i>column switching</i></b> .....	20
<b>2.1.2</b>	<b>Microextração em fase sólida e fibras extratoras</b> .....	21
2.2	MATERIAIS DE ACESSO RESTRITO.....	24
2.3	ALBUMINA SÉRICA BOVINA.....	28
2.4	DIURÉTICOS: CLORTALIDONA E HIDROCLOROTIAZIDA.....	30
2.5	β-BLOQUADORES: ATENOLOL, METOPROLOL, PROPRANOLOL E NADOLOL.....	31
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	35
3.1	OBJETIVO GERAL.....	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	36
4.1	REAGENTES, SOLUÇÕES E EQUIPAMENTOS .....	36
4.2	AMOSTRAS.....	37
4.3	PARTE 1- SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE BSA.....	38
<b>4.3.1</b>	<b>Síntese</b> .....	38
<b>4.3.2</b>	<b>Caracterização das partículas obtidas</b> .....	39
4.3.2.1	<i>Solubilidade das micropartículas sintetizadas</i> .....	39
4.3.2.2	<i>Espectroscopia no infravermelho</i> .....	40
4.3.2.3	<i>Espalhamento de luz dinâmico</i> .....	40
4.3.2.4	<i>Microscopia de força atômica</i> .....	40
4.3.2.5	<i>Microscopia eletrônica de varredura</i> .....	41
4.3.2.6	<i>Potencial zeta</i> .....	41
4.3.2.7	<i>Análise termogravimétrica</i> .....	41
4.3.2.8	<i>Calorimetria exploratória diferencial</i> .....	42
4.3.2.9	<i>Análise da área superficial e porosidade</i> .....	42
4.3.2.10	<i>Resistência ao fluxo</i> .....	42
4.3.2.11	<i>Exclusão de proteínas</i> .....	43
4.3.2.12	<i>Estudo de pH para adsorção dos analitos – atenolol e clortalidona</i> .....	44
4.3.2.13	<i>Cinéticas de adsorção</i> .....	44
4.3.2.14	<i>Isotermas de adsorção</i> .....	46
4.4	PARTE 2 - EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA ONLINE: ATENOLOL, CLORTALIDONA E HIDROCLOROTIAZIDA.....	46
4.5	PARTE 3 - FIBRA DE SPME: ATENOLOL, PROPRANOLOL, METOPROLOL E NADOLOL.....	47
<b>4.5.1</b>	<b>Confecção das fibras de micropartículas de BSA</b> .....	47
<b>4.5.2</b>	<b>Otimização dos parâmetros de fragmentação</b> .....	48
<b>4.5.3</b>	<b>Preparo de amostras e determinação dos analitos</b> .....	49

<b>4.5.4</b>	<b>Comparação entre diferentes sínteses</b> .....	51
<b>4.5.5</b>	<b>Reuso das fibras de extração</b> .....	51
<b>4.5.6</b>	<b>Estabilidade</b> .....	51
<b>4.5.7</b>	<b>Validação analítica</b> .....	52
4.5.7.1	<i>Efeito matriz</i> .....	52
4.5.7.2	<i>Seletividade</i> .....	53
4.5.7.3	<i>Linearidade e tratamento estatístico das curvas de calibração</i> .....	53
4.5.7.4	<i>Precisão e exatidão</i> .....	54
4.5.7.5	<i>Limites de detecção e limites de quantificação</i> .....	54
4.5.7.6	<i>Efeito de memória</i> .....	54
4.5.7.7	<i>Recuperação absoluta</i> .....	55
4.5.7.8	<i>Robustez</i> .....	55
4.6	<b>APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS</b> .....	57
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	58
5.1	<b>PARTE 1- SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE BSA</b> .....	58
<b>5.1.1</b>	<b>Síntese das micropartículas de BSA</b> .....	58
<b>5.1.2</b>	<b>Caracterização das micropartículas</b> .....	61
5.1.2.1	<i>Solubilidade</i> .....	61
5.1.2.2	<i>Espectroscopia no infravermelho</i> .....	62
5.1.2.3	<i>Espalhamento de luz dinâmico</i> .....	63
5.1.2.4	<i>Microscopia de força atômica</i> .....	63
5.1.2.5	<i>Microscopia eletrônica de varredura</i> .....	64
5.1.2.6	<i>Potencial zeta</i> .....	65
5.1.2.7	<i>Análise termogravimétrica</i> .....	67
5.1.2.8	<i>Calorimetria exploratória diferencial</i> .....	67
5.1.2.9	<i>Análise da área superficial e porosidade</i> .....	68
5.1.2.10	<i>Resistência ao fluxo</i> .....	69
5.1.2.11	<i>Exclusão de proteínas</i> .....	70
5.1.2.12	<i>Estudo de pH para adsorção dos analitos – atenolol e clortalidona</i> .....	73
5.1.2.13	<i>Cinéticas de adsorção</i> .....	74
5.1.2.14	<i>Isotermas de adsorção</i> .....	76
5.2	<b>PARTE 2: EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA ONLINE: ATENOLOL, CLORTALIDONA E HIDROCLOROTIAZIDA</b> .....	79
<b>5.2.1</b>	<b>Estudos de fase móvel</b> .....	79
<b>5.2.2</b>	<b>Estudos de carregamento e de eluição</b> .....	82
<b>5.2.3</b>	<b>Diluição do plasma</b> .....	84
<b>5.2.4</b>	<b>Temperatura do forno analítico</b> .....	84
<b>5.2.5</b>	<b>Conclusões parte 2</b> .....	86
5.3	<b>PARTE 3 - FIBRA DE SPME: ATENOLOL, PROPRANOLOL, METOPROLOL E NADOLOL</b> .....	87
<b>5.3.1</b>	<b>Confecção das fibras de micropartículas de BSA</b> .....	87
<b>5.3.2</b>	<b>Padrão de fragmentação dos analitos</b> .....	87
<b>5.3.3</b>	<b>Otimização do preparo de amostras</b> .....	88
5.3.3.1	<i>Composição da fase de eluição</i> .....	89

5.3.3.2	<i>Tempo de extração e tempo de eluição</i> .....	90
5.3.3.3	<i>Diluição do plasma</i> .....	90
5.3.3.4	<i>Volume de eluição e volume de extração</i> .....	91
5.3.3.5	<i>Velocidade de agitação</i> .....	91
<b>5.3.4</b>	<b>Sistema cromatográfico empregado e otimização do método</b> .....	<b>93</b>
<b>5.3.5</b>	<b>Comparação entre diferentes sínteses</b> .....	<b>94</b>
<b>5.3.6</b>	<b>Reuso das fibras</b> .....	<b>95</b>
<b>5.3.7</b>	<b>Estabilidade</b> .....	<b>97</b>
<b>5.3.8</b>	<b>Validação analítica</b> .....	<b>97</b>
5.3.8.1	<i>Efeito Matriz</i> .....	98
5.3.8.2	<i>Linearidade e tratamento estatístico das curvas</i> .....	98
5.3.8.3	<i>Precisão e exatidão</i> .....	101
5.3.8.4	<i>Limites de detecção e limites de quantificação</i> .....	101
5.3.8.5	<i>Seletividade e efeito de memória</i> .....	102
5.3.8.6	<i>Recuperação absoluta</i> .....	102
5.3.8.7	<i>Robustez</i> .....	103
5.4	<b>APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS</b> .....	<b>104</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>105</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>106</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Quando se trata de matrizes complexas (como as biológicas, as alimentares e as ambientais), o preparo de amostras é a etapa crítica no desenvolvimento das análises. Esse procedimento deve permitir que os compostos de interesse sejam extraídos da amostra e promover a exclusão de macromoléculas interferentes presentes na matriz, para que estas não prejudiquem a detectabilidade das técnicas e os sistemas utilizados (MARTINS, 2015). Assim, é no preparo que se tem maiores possibilidade de erros e no qual se despende o maior tempo durante a marcha analítica (ŠAFARŤIKOVÁ; ŠAFARŤÍK, 1999). Técnicas de extração em fase sólida (SPE) e em fase líquida (LLE), incluindo suas formas miniaturizadas e automatizadas (GORASSINI et al., 2017; TAGHVIMI, HAMISHEHKAR, 2017; TIMOFEEVA et al., 2017; QU et al., 2017) são usualmente empregadas em análises de amostras biológicas.

A precipitação com solventes orgânicos e/ou ácidos ainda é o método mais visto em literatura para a separação de proteínas de matrizes complexas. No entanto, essa técnica apresenta algumas limitações referentes à seletividade dos compostos precipitados, à mudança do pH do meio e à diluição da amostra (HAN et al., 2016; KIM et al., 2017; MARTINS, 2015). Para evitar tais limitações, novos procedimentos de exclusão estão sendo desenvolvidos e, dentre eles, destacam-se os materiais de acesso restrito (RAMs), que apresentam a capacidade de excluir macromoléculas e de extrair os analitos de forma concomitante (DE FARIA et al., 2017a). Consequentemente são obtidos benefícios ao preparo de amostras como menor tempo investido, menor uso de solventes e maior confiabilidade no procedimento.

Uma das metodologias para a obtenção de RAMs é o recobrimento de materiais com a albumina sérica bovina (BSA). Por conferir um grupamento superficial volumoso, a camada externa de BSA dificulta a aproximação de compostos de alto peso molecular aos poros do material de extração. Além disso, em meios com pH diferente do ponto isoelétrico da albumina, a camada externa evita, por mecanismos de repulsão eletrostática, o acúmulo de macromoléculas sobre a superfície do material extrator (DE FARIA et al., 2017a).

Diversos trabalhos são encontrados empregando materiais RAM-BSA na extração de analitos de matrizes complexas (DE FARIA et al., 2017a, 2017b; PINTO; DE SOUZA; QUEIROZ, 2017; SANTOS et al., 2016) e, mesmo com seu amplo uso, até o presente momento são raros ou inexistentes métodos utilizando somente essa proteína entrecruzada como sorbente no preparo de amostras. Assim, partindo-se do princípio que a BSA atua na

exclusão de macro interferentes e de que é possível a ligação de diversos fármacos a partículas de albumina, já utilizadas em sistemas de *drug delivery* (GALISTEO-GONZÁLEZ; MOLINA-BOLÍVAR, 2014; KUMARA; PRAKASH; GNANAMANI, 2017; VARCA; QUEIROZ; LUGÃO, 2016); o presente projeto propõe o estudo do comportamento de micropartículas de BSA entrecruzada e o seu uso para a determinação de fármacos em plasma humano. Dessa forma, é proposto um novo sorbente a ser utilizado em métodos analíticos com um tempo de síntese, procedimentos, e custos reduzidos; mas que mantêm as vantagens de um RAM.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A seguir será realizada a revisão sobre temas importantes para a construção do presente trabalho: extração em fase sólida, RAMs, BSA, diuréticos e  $\beta$ -bloqueadores.

### 2.1 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

O procedimento analítico pode ser descrito por seis etapas principais: (I) amostragem; (II) armazenamento e transporte; (III) preparo de amostras; (IV) separação, identificação e quantificação; (V) validação analítica e (VI) avaliação estatística (BORGES; PEREIRA; MANO, 2015). Durante o desenvolvimento de um método, os procedimentos de coleta e de preparo são aqueles que consomem maiores tempos (aproximadamente 60%) e são os que possibilitam 30% das fontes de erros (KATAOKA; SAITO, 2012). Dessa forma, essas etapas devem ser otimizadas e simplificadas para que os resultados sejam mais confiáveis (BORGES; PEREIRA; MANO, 2015).

A SPE começou a ser utilizada em meados da década de 1970 (LISKA, 2000) e hoje é uma técnica já consolidada com aplicações diversas para a extração de analitos de meios complexos, podendo pré-concentrar os compostos de interesse e eliminar interferentes da matriz (ANDRADE-EIROA et al., 2016; PŁOTKA-WASYLKA et al., 2016). Tradicionalmente, a SPE é utilizada em forma de cartucho (PŁOTKA-WASYLKA et al., 2016), mas essa configuração apresenta algumas desvantagens como: obstrução após a passagem de grandes volumes de amostra; incompleta dessorção de analitos dos sítios ativos dos sorventes, contaminação dos compostos de interesse durante o processo; e heterogeneidade de partículas entre diferentes lotes e fabricantes (ABD-TALIB; MOHD-SETAPAR; KHAMIS, 2014; POOLE et al., 1997).

Nesse cenário, novas estratégias são constantemente desenvolvidas para melhorar o preparo de amostras: menor uso de solvente e de material extrator; menor tempo de análise, maior reprodutibilidade e menor ocorrência de contaminações. Essas metodologias envolvem a extração por dispersão (d-SPE), além de miniaturização da técnica com a microextração em fase sólida (SPME) e a microextração por sorvente empacotado (MEPs), a extração por barra sortiva (SBSE) e a automatização, SPE *online* (ANDRADE-EIROA et al., 2016; PŁOTKA-WASYLKA et al., 2016).

### 2.1.1 Extração em fase sólida *online*: *column switching*

A SPE *online* é uma técnica automatizada em que colunas de extração são acopladas a sistemas cromatográficos (ANDRADE-EIROA et al., 2016) e a abordagem mais comum é a chamada de *column switching*. Essa configuração tem sido reportada desde a década de 1970 com o desenvolvimento de equipamentos de alta pressão com válvulas multi-pórticas e, desde então, diversos trabalhos a utilizam para determinação de amostras biológicas, alimentares e ambientais (KATAOKA; SAITO, 2012).

O *column switching* permite a injeção direta de matrizes em sistemas cromatográficos e possibilita a integração de várias colunas, válvulas e bombas (SEGER et al., 2009). Assim, frações injetadas em uma primeira coluna (geralmente de extração) são seletivamente eluídas às colunas adicionais (separação) ou a detectores, permitindo que as etapas de extração/pré-concentração e determinação de analitos sejam realizados no próprio sistema cromatográfico, de modo sequencial e automático (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

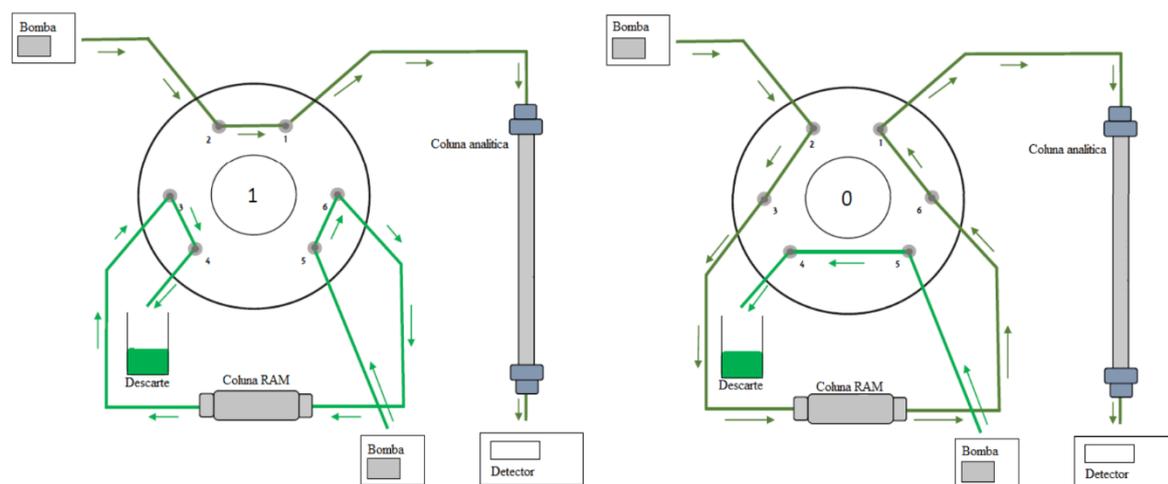
O procedimento *online* soma vantagens como o aumento da frequência analítica e a menor manipulação da amostra, evitando perdas e contaminações. Contudo, a técnica necessita de válvulas de comutação, o que aumenta a especificidade da instrumentação e pode apresentar dificuldades relacionadas à pressão do sistema devido ao material empacotado (SANTOS-NETO et al., 2008a).

Adicionalmente, a técnica de comutação de colunas pode apresentar duas configurações distintas, definidas de acordo com o sentido da vazão da fase móvel no momento da eluição, o *forward-flush* e o *backflush*. O primeiro (sentido da vazão é o mesmo tanto no carregamento da amostra quanto na eluição dos analitos retidos) apresenta como principal vantagem a prevenção de entupimento da coluna analítica por materiais particulados e como desvantagem, tem-se a possibilidade de perda de resolução ou alargamento dos picos devido ao efeito de dispersão dos analitos. Já o segundo (fluxo da fase para a eluição reverso ao sentido de carregamento da amostra), possibilita que os analitos fiquem majoritariamente concentrados em um único espaço da coluna de extração, permitindo maior frequência analítica; no entanto é mais susceptível ao entupimento da coluna cromatográfica (BATISTON, 2015). A Figura 1 a seguir exemplifica o sistema na configuração *backflush*, evidenciando as duas posições que a válvula pode assumir durante a análise cromatográfica (carregamento e eluição dos analitos).

Sobre o preparo de amostras, as técnicas tradicionais como a extração líquido-líquido e a SPE *off-line* vêm sendo substituídas. Enquanto a primeira apresenta alto consumo de

tempo e de solventes, além de dificuldades para otimização, a segunda é por diversas vezes limitada a um único uso por cartucho e requer diversas etapas manuais; por isso, o *column switching* tem ganhado espaço sobre essas técnicas (SADÍLEK; DALIBOR; SOLICH, 2007). Para o preparo de amostras complexas, o *column switching* geralmente emprega materiais de acesso restrito (RAMs) na primeira coluna do sistema, retendo os compostos de interesse e destinando os interferentes a um descarte (KATAOKA; SAITO, 2012).

Figura 1 - Esquema representativo da válvula de comutação para o *column switching*.



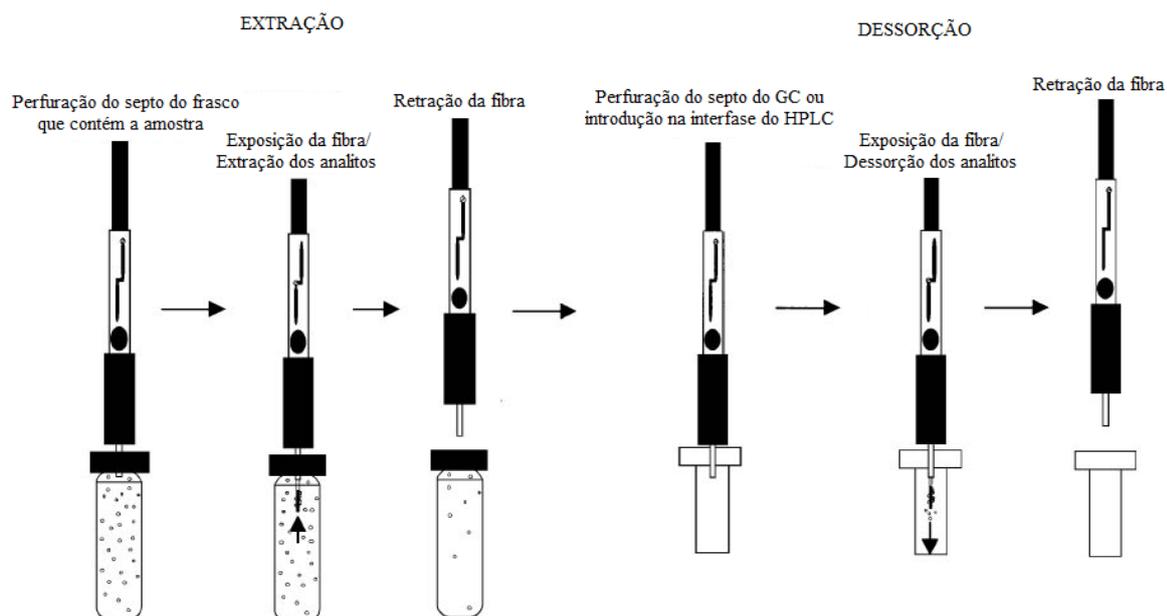
Fonte: ROSA; DE FARIA; FIGUEIREDO, 2018 – adaptado.

Nota: Durante a primeira etapa (posição 1), uma bomba impulsiona a fase de carregamento, levando a amostra injetada do *loop* para a coluna com material de acesso restrito (RAM), na qual os analitos são retidos e os interferentes são direcionados ao descarte. Enquanto isso, uma segunda bomba impulsiona uma fase de separação por meio da coluna analítica, condicionando-a. A seguir, ocorre a comutação da válvula para a eluição (posição 0). Nessa etapa, a fase móvel permeia primeiramente a coluna RAM retirando os analitos ali retidos levando-os à coluna analítica. A válvula comuta uma segunda vez, voltando a posição anterior, e ocorre a separação na coluna analítica e a limpeza da coluna RAM, que pode ser feita pela mesma fase de carregamento ou por uma outra composição de fase móvel.

### 2.1.2 Microextração em fase sólida e fibras extratoras

A SPME foi introduzida no preparo de amostras durante a década de 1990 como uma alternativa às metodologias clássicas (LORD; PAWLISZYN, 2000) e avançou significativamente ao longo dos anos com melhorias nos materiais extratores e nos suportes, trazendo benefícios em relação à estabilidade e à capacidade de extração (PIRIMOGHADAM; ALAM; PAWLISZYN, 2017). A Figura 2 mostra um esquema de uma seringa clássica e comercial de SPME e a possibilidade de dessorção direta de analitos voláteis no sistema cromatográfico.

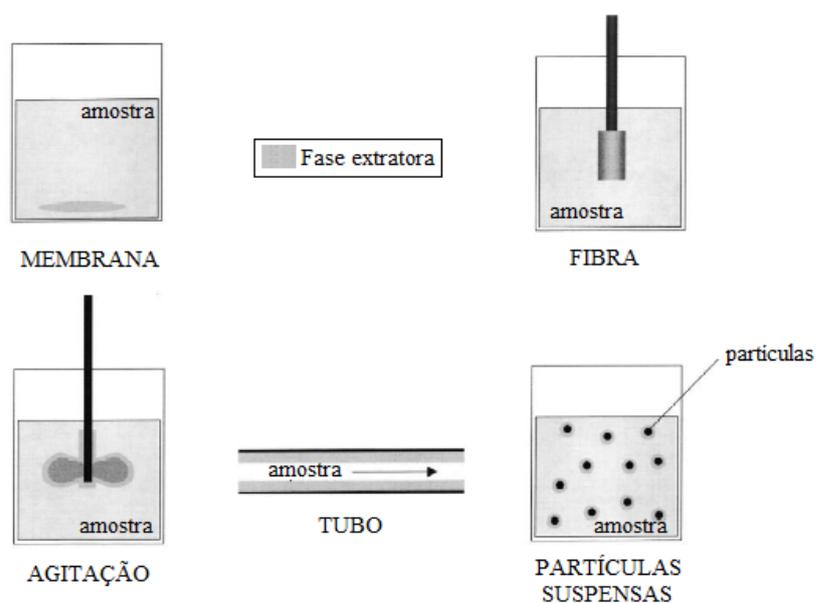
Figura 2 – Esquema para extração e dessorção de analitos usando uma fibra comercial de SPME.



Fonte: ORMSBY, 2005 – adaptado.

Diferentes metodologias podem empregar a SPME: *in tube*, barras agitadoras, membranas e fibras (FIGURA 3), incluindo seus usos em *headspace*. (LORD; PAWLISZYN, 2000). Em todas elas, uma pequena quantidade de fase extratora é colocada em contato com a matriz e deixada por tempo suficiente para que o equilíbrio seja atingido (LORD; PAWLISZYN, 2000), assim apresenta-se como um método não exaustivo, diferentemente da SPE convencional (PIRI-MOGHADAM; ALAM; PAWLISZYN, 2017).

Figura 3 – Formas de microextração em fase sólida.



Fonte: LORD; PAWLISZYN, 2000 – adaptado.

Diversos autores relatam a SPME como uma técnica simples, menos morosa, ambientalmente mais amigável, mais barata e segura, e com aplicações diversas tanto em laboratórios quanto *in situ* e *in vivo* (INUKAI; KAJI; KATAOKA, 2018; LORD; PAWLISZYN, 2000; NSUBUGA et al., 2018; PIRI-MOGHADAM; ALAM; PAWLISZYN, 2017). Alguns exemplos a seguir mostram a diversidade de materiais e de aplicações da técnica: Nsubuga e colaboradores (2017) utilizaram um nanomaterial confeccionado a partir de casca de arroz para  $\beta$ -bloqueadores em esgoto hospitalar (NSUBUGA et al., 2018); já Dastkhon e coautores (2017) sintetizaram nanopartículas de Cu@SnS/SnO<sub>2</sub> para a microextração dispersiva de nicotina e cotinina em amostras de cabelo (DASTKHOON et al., 2017); Ouyang et al. (2011) utilizaram uma fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) para a extração *in vivo* de atrazina, carbamazepina e fluoxetina de tecidos de peixes (OUYANG et al., 2011); enquanto Garavaglia e colaboradores (2014), utilizaram as fibras de PDMS para o *screening in situ* de leveduras produtoras de éster pela técnica de *head-space*-SPME (GARAVAGLIA et al., 2014).

Fibras comerciais são encontradas empregando PDMS, Carboxen PDMS e Carbowax-divinilbenzeno, já o suporte mais comum é a sílica fundida (VILELA; LOURDES, 2005). No entanto, outros sorbentes não convencionais estão sendo utilizados com êxito em preparos de amostras com a técnica de SPME, como é o caso de fibras de nanotubos de carbono para a extração de piretroides em amostras de chá (REN et al., 2018) e para extração de solventes residuais em antibióticos (GHIASVAND; NOURIASL; YAZDANKHAH, 2018); e dos polímeros molecularmente impressos (MIP) para a extração de policlorofênis em amostras de água (LIU et al., 2018), e de ácido hipúrico e metil hipúrico em amostras de urina (BOSCARI et al., 2017).

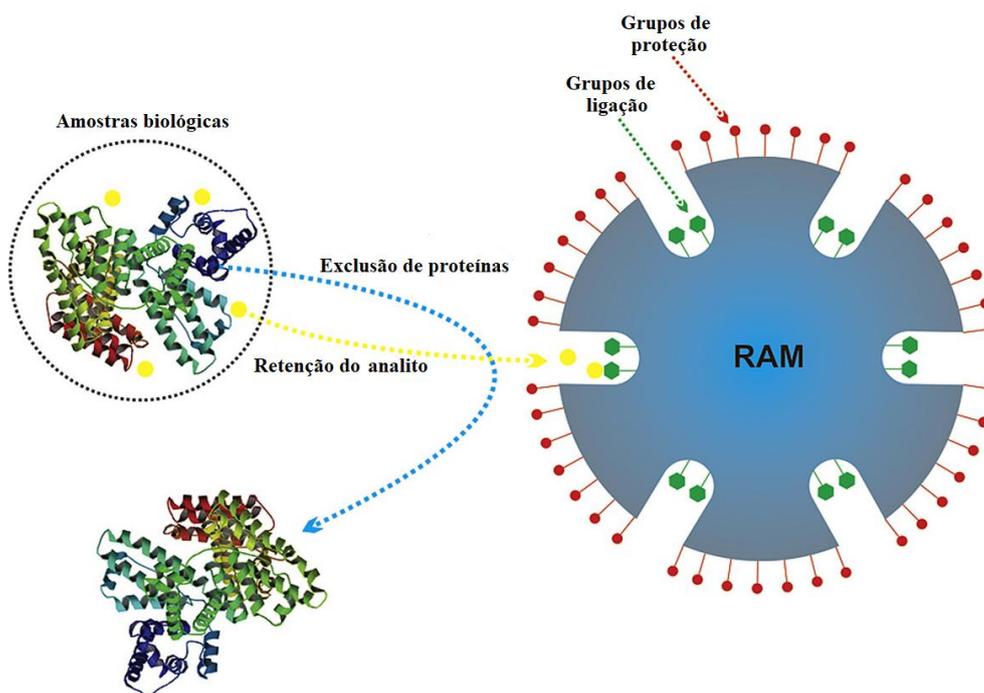
Tem-se então, além dos avanços na técnica de SPE, o uso de novos materiais objetivando-se benefícios como redução de custos e de tempo no preparo de amostras, maior especificidade, sensibilidade, reprodutibilidade da técnica e exclusão de macromoléculas interferentes. (ANDRADE-EIROA et al., 2016; DE FARIA et al., 2017a; PŁOTKA-WASYLKA et al., 2016). Dentre esses novos sorbentes encontram-se os RAMs, que apresentam a propriedade de extrair compostos de interesse de matrizes complexas sem a necessidade de tratamento prévio das mesmas (NETO, A. J. S.; LOPES, B. R.; CASS, 2015).

## 2.2 MATERIAIS DE ACESSO RESTRITO

A análise de matrizes biológicas não tratadas pode levar a sorção irreversível de macromoléculas às colunas dos sistemas cromatográficos, causando prejuízos ao estudo e ao sistema analítico (SADÍLEK; DALIBOR; SOLICH, 2007); por isso, a eliminação de macro interferentes é uma etapa prévia imprescindível. O método tradicional de precipitação de proteínas com solventes orgânicos e/ ou ácidos é dito como simples e rápido (MARTINS, 2015); contudo, mudanças causadas no meio (diluição e variação do pH) e dificuldades em relação à seletividade limitam o uso dessa metodologia (HAN et al., 2016; KIM et al., 2017; MARTINS, 2015). Como alternativa, estão sendo desenvolvidas novas estratégias de exclusão de macromoléculas por meio dos RAMs (NETO, A. J. S.; LOPES, B. R.; CASS, 2015).

Os RAMs começaram a ser reportados na literatura nas últimas três décadas e são materiais apropriados para a extração de diversos compostos de baixa massa molecular (como fármacos, seus metabólitos) e metais diretamente de matrizes não tratadas e ricas em macromoléculas (KATAOKA; SAITO, 2012; SADÍLEK; DALIBOR; SOLICH, 2007). Os analitos são retidos no interior do material extrator por mecanismos de partição, adsorção e/ou troca iônica. A partição é um processo físico baseado na diferença de solubilidade entre os componentes da amostra e a fase extratora; enquanto a adsorção ocorre na interface entre as fases; no processo de troca iônica íons presentes no material de extração são trocados por íons presentes na amostra. Por sua vez, os interferentes (mais frequentemente proteínas) são evitados pela camada de grupamentos funcionalizados sobre a superfície do material, através de mecanismos de exclusão física (tamanho) e/ou química (DE FARIA et al., 2017a; KATAOKA; SAITO, 2012). Um esquema genérico para RAMs é mostrado na Figura 4 a seguir.

Figura 4 - Exemplificação do processo de exclusão de interferentes por meio de um RAM já presente em literatura.



Fonte: DE FARIA et al., 2017a – adaptado.

Os RAMs podem ser obtidos por meio de modificações em sílica ou podem ser preparados a partir da funcionalização de outros materiais como polímeros de impressão molecular (MIP), nanotubos de carbono (CNT) e carvão ativado, frequentemente sintetizados em laboratório.

Após evoluções da classificação e dos materiais, os RAMs baseados em sílica são atualmente divididos em quatro categorias distintas e determinadas pelo mecanismo de exclusão e topoquímica de suas superfícies, sendo denominados tipo A, B, C ou D (NETO, A. J. S.; LOPES, B. R.; CASS, 2015).

- a) A: Apresentam barreira física e homogênea. São obtidos pela funcionalização com grupamentos hidrofílicos ou hidrofóbicos tanto na superfície interna quanto na externa da sílica. O acesso a macromoléculas é evitado pelo tamanho dos poros, enquanto que o acúmulo é impedido pelas cadeias externas (CASSIANO et al., 2006). Apresentam como maior vantagem a facilidade de síntese e como desvantagem, a possibilidade de picos cromatográficos com menor resolução (DE FARIA et al., 2017a).
- b) B: Também atuam por tamanho dos poros, mas há diferenças entre os grupamentos internos (geralmente hidrofóbicos) e os externos (comumente hidrofílicos), levando a um suporte heterogêneo (RUDOLPHI; BOOS, 1997). Essa configuração de sílica-RAM é a mais utilizada, possivelmente devido a sua

simplicidade para aplicação e a variabilidade de materiais comercialmente disponíveis. Por outro lado, o tipo B pode apresentar baixa seletividade (DE FARIA et al., 2017a).

- c) C: A barreira química é composta por um mesmo grupamento (hidrofílico ou hidrofóbico) tanto na parte interna quanto na externa (RUDOLPHI; BOOS, 1997). Devido a sua baixa estabilidade quando comparado aos outros tipos, esse sorbente não é muito utilizado (DE FARIA et al., 2017a).
- d) D: Uma superfície química e heterogênea é utilizada para impedir a entrada e o acúmulo de macromoléculas no material extrator (RUDOLPHI; BOOS, 1997). O tipo D apresenta como principal vantagem a compatibilidade com matrizes biológicas; entretanto, pode apresentar menor vida útil quando comparado com a fase tipo B (DE FARIA et al., 2017a). Esses RAMs são subdivididos de acordo com a barreira química utilizada:

- I. A camada hidrofílica é obtida a partir de  $\alpha_1$ -glicoproteínas ácidas. Um método reportado para a imobilização da proteína na superfície da sílica é a oxidação das cadeias carbônicas e sua ligação a um suporte por meio de uma reação com ácido (KAWANO et al., 2003).
- II. A BSA também fornece uma camada hidrofílica externa (RAM-BSA). Contudo, a ligação da proteína à superfície da sílica é realizada por meio de uma agente de entrecruzamento, o glutaraldeído (DE PAULA; DE PIETRO; CASS, 2008).
- III. A sílica pode ser modificada com metilcelulose, resultando em uma camada hidrofílica. A funcionalização da sílica se dá pela imersão do material em solução de metilcelulose, seguida por agitação, banho ultrassom e secagem (YAMAMOTO et al., 2001).

Alguns procedimentos de preparo de amostras e determinação de analitos podem ser dificultados pela não seletividade dos RAMs. Nesse contexto, os MIPs superam essa limitação proporcionando que o material extrator seja seletivo a um analito ou a uma classe deles (SANTOS et al., 2015). Para somar as vantagens dos dois materiais, os MIPs de acesso restrito (RAMIP) começaram a ser desenvolvidos e aplicados para amostras complexas (DE FARIA et al., 2017a) e eles também podem ser divididos em quatro grupos distintos:

- a) Comonômeros hidrofílicos: o RAM é obtido por meio de uma camada hidrofílica externa. É essa camada que previne a sorção de macro interferentes e a ação de moléculas de água sobre os sítios de ligação do MIP (HAGINAKA et al., 1999);
- b) Comonômeros hidrofílicos e BSA: a camada hidrofílica externa é semelhante ao do grupo acima descrito, contudo esta é entrecruzada com a BSA, resultando em um aumento de cargas superficiais quanto o pH do meio é diferente do ponto isoelétrico da albumina (MORAES et al., 2013);
- c) Comonômeros que se tornam hidrofílicos: nesse grupo a camada externa passa a ter atividade após um tratamentos e esses RAMIPs também podem ser obtidos com o uso de carboidratos para formar a camada externa (HUA et al., 2011);
- d) Comonômeros que se tornam hidrofílicos e BSA: assim como o grupo anterior, a barreira se torna funcionalizada após um tratamento. A BSA é utilizada para melhorar a performance do material extrator como RAM (SANTOS et al., 2016).

Finalmente, os CNTs oferecem vantagens aos métodos analíticos devido a sua estabilidade química e elevada área superficial (DE FARIA et al., 2017b). Recentemente Figueiredo e coautores demonstraram ser possível a obtenção de nanotubos de carbono de acesso restrito (RACNTs) a partir do recobrimento de CNTs com uma camada externa de BSA (BARBOSA et al., 2015, 2016). Dessa forma, o material se torna compatível com diversas amostras complexas não tratadas. Vale ressaltar que procedimento similar ao realizado para a obtenção de RACNTs também foi aplicado para carvão ativado, resultando no carbono ativado de acesso restrito, RACCs (ULLAH et al., 2016).

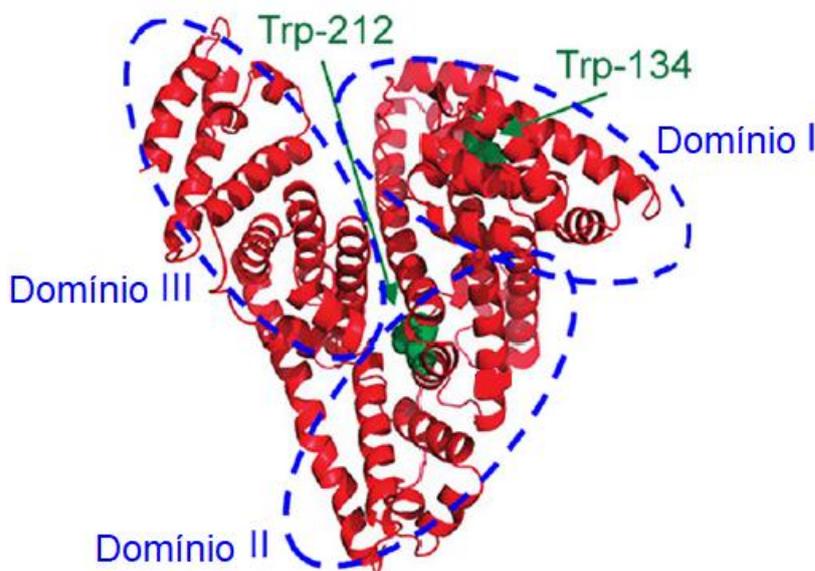
Os RAMs vêm sendo amplamente utilizados (DE FARIA et al., 2017a) tanto para sistemas *online* (DE FARIA et al., 2017c; DE PAULA; DE PIETRO; CASS, 2008) quanto para *off-line* (OLIVEIRA; SEGATELLI; TARLEY, 2016; QI et al., 2010), proporcionando vantagens ao preparo de amostras complexas (principalmente as biológicas) como: maior confiabilidade, exclusão de aproximadamente 100% das proteínas presentes na amostra, possibilidade de reuso e menor tempo e procedimentos dispendidos (BARBOSA et al., 2015; DE LIMA et al., 2016).

## 2.3 ALBUMINA SÉRICA BOVINA

A albumina é uma proteína globular (QUEIROZ et al., 2015), que apresenta peso molecular de 66 kDa e ponto isoelétrico próximo de 4,6 (TAGHVIMI; HAMISHEHKAR, 2017). Por apresentar fácil purificação e grande abundância (aproximadamente 50% das proteínas plasmáticas) tornou-se uma das primeiras proteínas a serem estudadas (FARRUGIA, 2010).

Existem diferentes tipos de albuminas conhecidas, como a ovoalbumina, a albumina sérica humana (HSA) e a BSA, sendo esta última a de maior concentração no sangue bovino e a responsável por funções diversas como regulação da pressão oncótica, transporte e distribuição de íons divalentes, hormônios, bilirrubina e ácidos graxos; eliminação de radicais livres de oxigênio e a desativação de metabólitos lipofílicos tóxicos; além de ter alta afinidade por compostos graxos e por pequenos compostos aromáticos negativamente carregados (FARRUGIA, 2010; TAGHVIMI; HAMISHEHKAR, 2017; TAN; HO, 2018). Ainda, como visto na Figura 5, a BSA apresenta três domínios homólogos (I, II e III) e cada um deles contém dois subdomínios, chamados de A e B (WU et al., 2011). Vantagens como alta estabilidade, semelhança à HSA e relativo baixo custo (AFSHARAN et al., 2016) contribuem para o uso de BSA em pesquisas tanto para seu uso em sistemas de liberação controlada de fármacos, quanto para a obtenção de materiais RAM-BSA, como mencionado no tópico acima.

Figura 5 - Estrutura cristalográfica da BSA evidenciando os domínios I, II e III e os resíduos de triptofano (Trp).



Fonte : WU et al., 2011 – adaptado.

Sistemas de liberação controlada de fármacos implicam em dispositivos dirigidos a alvos específicos no organismo e essa terapia pode compreender micro ou nanopartículas poliméricas, lipossomos, micelas, emulsões e nanocompósitos (LANZILLOTTI, 2012).

O interesse em desenvolver partículas proteicas vêm das vantagens que as mesmas trazem para o sistema de entrega, como: biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e baixa antigenicidade (TAN; HO, 2018). A BSA entra como modelo de estudo uma vez que além das características citadas, apresenta elevada habilidade de ligação com diversos fármacos, proporciona melhor interação dos mesmos com as barreiras biológicas e é muito semelhante à HSA (QUEIROZ et al., 2015).

O primeiro uso de albumina na indústria farmacêutica é atribuído à Edwin Cohn, que desenvolveu uma solução estável durante a II Guerra Mundial. Esse sistema foi rapidamente adotado, adaptado e é considerado crucial para a viabilidade da indústria de proteínas plasmáticas (FARRUGIA, 2010). Novas metodologias são constantemente desenvolvidas e empregadas para a obtenção de materiais a base de albumina para sistemas de entrega controlada de fármacos, como são exemplificados a seguir.

Galisteo-González e Molina-Bolíver (2014) utilizaram o processo de coacervação empregando etanol absoluto como solvente e solução de glutaraldeído em água (8%) como agente reticulador (GALISTEO-GONZÁLEZ; MOLINA-BOLÍVAR, 2014). Rodrigues (2014), sintetizou nanopartículas com o intuito de associar as mesmas com antígenos de *P. aeruginosa* para proteger camundongos contra esse patógeno. Uma solução aquosa de BSA (2% m:v) foi incubada com o antígeno e o processo de coacervação também foi realizado pela adição de etanol e glutaraldeído (25%). Namasivayan e Robin (2013) também utilizaram desse processo com uma agitação final de 8h. No entanto, diferentemente dos trabalhos anteriores, Tween-20 foi utilizado para a estabilização das partículas obtidas (NAMASIVAYAM; ROBIN, 2013).

O processo de dessolvatação foi empregado por Broze-Uhle e colaboradores (2016), Shankar e coautores (2016) e Kumara, Prakash e Gnanamani (2017). O primeiro grupo usou 200 mg de BSA em solução aquosa (água MilliQ<sup>®</sup>) com a adição de etanol a 1 mL min<sup>-1</sup> e glutaraldeído (8%), seguido por agitação em chapa magnética por 18h (BRONZE-UHLE et al., 2016). O segundo, utilizou a BSA dissolvida em solução de ureia (10 mmol L<sup>-1</sup>) e gotejamento de acetona (0,5 mL min<sup>-1</sup>), usando banho ultrassom para a formação das partículas (SHANKAR; AMETA; SINGH, 2016). Já o terceiro, não usou um agente de ligação entrecruzada (processo *self-crosslinker*), pois a presença do glutaraldeído, pode gerar uma resposta imunológica em sistemas de entrega de fármacos. (KUMARA; PRAKASH; GNANAMANI, 2017).

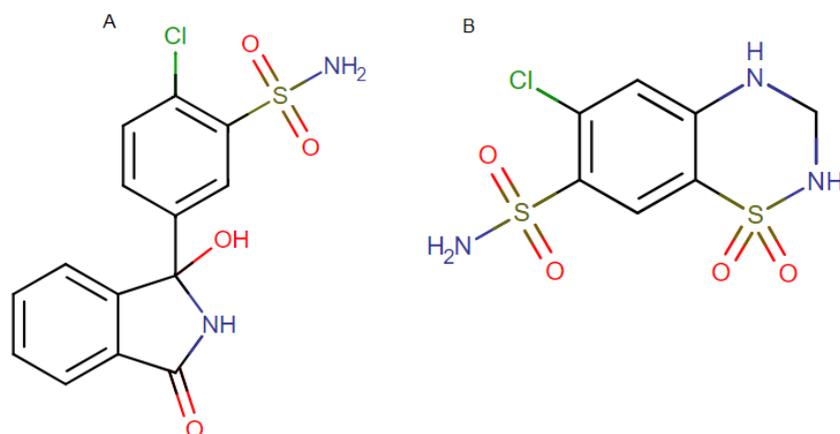
Queiroz e colaboradores (2015) também não utilizaram agentes reticulantes para a formação de partículas de BSA, no entanto submetem a proteína e um co-solvente à radiação- $\gamma$  para que esta fizesse o entrecruzamento (QUEIROZ et al., 2015). Por fim, Yedomon et al (2013) propuseram uma metodologia para se ampliar a escala de produção de partículas de BSA (até 10 g de BSA por síntese). Isso foi possível com um sistema de membrana, através da qual etanol era permeado e a fase aquosa circulava tangencialmente à sua superfície. Os resultados obtidos quanto à caracterização dos materiais foram semelhantes aos obtidos em uma menor escala de produção (YEDOMON; FESSI; CHARCOSSET, 2013).

As partículas resultantes nos trabalhos acima citados foram separadas por processo de centrifugação e caracterizadas por técnicas diversas. Como pôde ser observado, há uma grande variedade de metodologias de sínteses e amplo emprego da BSA em sistemas de *drug delivery*. Ainda, a BSA apresenta importante uso em preparo de amostras para a obtenção de RAMs. Contudo, são raros ou inexistentes trabalhos com o uso de BSA entrecruzada como material extrator para analitos de baixa massa molecular de amostras biológicas complexas.

## 2.4 DIURÉTICOS: CLORTALIDONA E HIDROCLOROTIAZIDA

Diuréticos tiazídicos como a clortalidona e a hidroclorotiazida, atuam no tubo contorcido distal inibindo o simporte  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  (DING et al., 2016). Esses fármacos foram inicialmente aprovados pelo FDA na década de 1960 e se tornaram largamente recomendados para pacientes com insuficiência cardíaca (CHITTURI; NOVAK, 2018) e com hipertensão (DING et al., 2016). A Figura 6 apresenta a forma estrutural desses dois fármacos.

Figura 6 - Estrutura química da clortalidona (A) e da hidroclorotiazida (B).



Fonte: DRUGBANK, 2018a, 2018b.

A hipertensão pode ser classificada como uma doença ou como um fator de risco, principalmente em associação a outras morbidades (MALTA et al., 2016). A hipertensão arterial atinge cerca de 30% da população brasileira acima de 40 anos e aproximadamente 75% dessas pessoas desconhecem sua condição ou não recebem tratamento adequado, fazendo com que muitos apresentem algum tipo de complicação micro-vascular no momento do diagnóstico inicial e/ou danos irreversíveis ao longo do tempo como perda da visão e de atividades renais (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 200-).

A clortalidona e a hidroclorotiazida apresentam amplas faixas terapêuticas (TABELA 1) e doses orais de 250 mg dia<sup>-1</sup> são recomendadas (CHITTURI; NOVAK, 2018) para manter níveis plasmáticos adequados para o tratamento.

Tabela 1 – Propriedades dos fármacos clortalidona e hidroclorotiazida.

Fármaco	Fórmula molecular	MM (g mol <sup>-1</sup> )	pKa	t <sub>1/2</sub> (h)
Clortalidona	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	338,766	8,8	40
Hidroclorotiazida	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	297,739	7,9	5,6-14,8

Fármaco	Faixa terapêutica (µg L <sup>-1</sup> )	Ligação a proteínas (%)	PF (°C)	log P
Clortalidona	150-300	75	239	0,85
Hidroclorotiazida	40-2000	68	266-268	-0,07

Fonte: DRUGBANK, 2018a, 2018b; SCHULZ, M.; SCHMOLDT, 2003.

Nota: MM, massa molecular; t<sub>1/2</sub>, tempo de meia vida; PF, ponto de fusão.

Formulações farmacêuticas contendo clortalidona e β-bloqueadores (como o atenolol) têm sido indicadas para tratamentos de hipertensão, principalmente quando a terapia individual se mostra ineficaz (ELGAWISH; MOSTAFA; ELSHANAWANE, 2011). Além disso, o atenolol e a clortalidona não interferem na farmacocinética um do outro e não apresentam sinergia para efeitos tóxicos (SWEETMAN, 2006). Elgawish e colaboradores (2011) determinam de forma simultânea clortalidona, hidroclorotiazida e atenolol em plasma

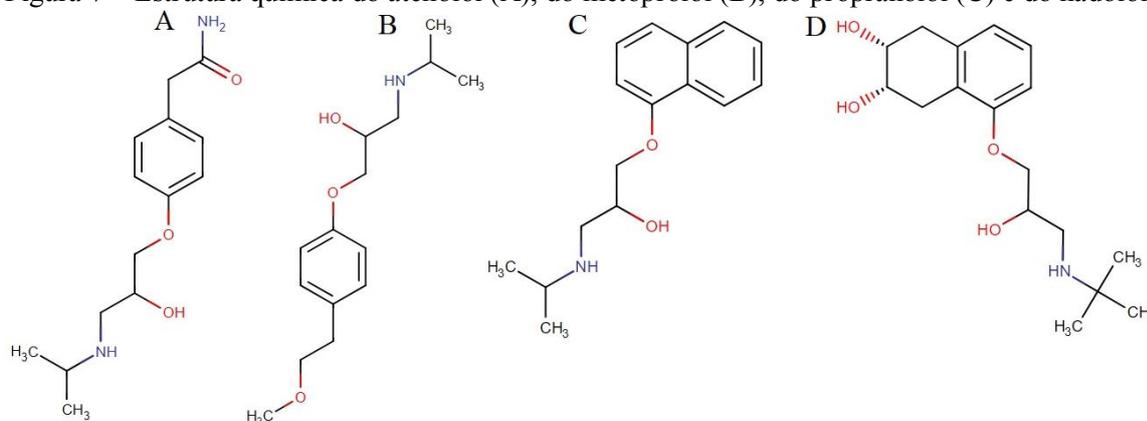
humano por HPLC–UV (225 nm), utilizando precipitação de proteínas como preparo de amostra e tampão fosfato (10 mmol L<sup>-1</sup>) pH=6,00 e metanol como fase móvel (ELGAWISH; MOSTAFA; ELSHANAWANE, 2011).

## 2.5 β-BLOQUADORES: ATENOLOL, METOPROLOL, PROPRANOLOL E NADOLOL

Por mais de 40 anos os β-bloqueadores têm sido indicados para o tratamento de desordens cardíacas como a hipertensão, a angina, a arritmia e o infarto do miocárdio (FARHADI; FIRUZI; HATAMI, 2015; GORYŃSKI; KIEDROWICZ; BOJKO, 2016; HEMMATI et al., 2016; SARAFRAZ-YAZDI; ABEDI; ES'HAGHI, 2013). Esses fármacos são antagonistas dos receptores β adrenérgico e agem no relaxamento dos músculos, diminuindo a frequência cardíaca do paciente (NSUBUGA et al., 2018).

A grande parte dos β-bloqueadores são compostos básicos que apresentam em sua estrutura uma amina secundária (SARAFRAZ-YAZDI; ABEDI; ES'HAGHI, 2013), como pode ser visto na Figura 7 a seguir.

Figura 7 – Estrutura química do atenolol (A), do metoprolol (B), do propranolol (C) e do nadolol (D).



Fontes: DRUGBANK, 2018c, 2018d, 2018e, 2018f.

O monitoramento de β-bloqueadores em amostras biológicas é requerido para estudos de otimização de dosagem, uma vez que a bioviabilidade dos mesmos varia entre pacientes (KATAYAMA et al., 2010); para ajustes de doses infantis (LO; RIEGELMAN, 1980); para análises forenses, em casos de overdose (UMEZAWA et al., 2008) e para ensaios de *doping*, o uso desses fármacos é proibido em competições que requerem alto controle de movimentos (GORYŃSKI; KIEDROWICZ; BOJKO, 2016). Soma-se aos fatos citados, a possibilidade dessa classe de medicamentos causar efeitos adversos como o ganho

de peso e o aumento do triglicéides, principalmente em tratamento concomitante com antipsicóticos (SILVA GRACIA et al., 2017). Por outro lado, as associações dos diferentes  $\beta$ -bloqueadores entre eles e com diuréticos parecem trazer benefícios aos pacientes em tratamento de hipertensão e de infarto do miocárdio (ELGAWISH; MOSTAFA; ELSHANAWANE, 2011).

Além da importância do controle da pressão arterial para a saúde pública e de pacientes responderem de formas distintas a esses fármacos. A escolha dos analitos (atenolol, metoprolol e propranolol) para o presente estudo ainda é atribuída ao fato de apresentarem afinidades opostas às proteínas plasmáticas quando administrados oralmente (TABELA 2), podendo assim interagir de forma distinta com as partículas de BSA propostas.

Tabela 2 – Propriedades dos fármacos atenolol, metoprolol, propranolol e nadolol.

<b>Fármaco</b>	<b>Fórmula molecular</b>	<b>MM (g mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>pKa</b>	<b>t<sub>1/2</sub> (h)</b>
Atenolol	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	266,34	9,6	6
Metoprolol	C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>3</sub>	267,36	9,7	3-7
Propranolol	C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>2</sub>	259,34	9,5	4
Nadolol	C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>4</sub>	309,40	9,6	14-24

<b>Fármaco</b>	<b>Faixa terapêutica (µg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Ligação a proteínas (%)</b>	<b>PF (°C)</b>	<b>log P</b>
Atenolol	100-1000	3	158-160	0,85
Metoprolol	35-500	12	120	1,88
Propranolol	20-300	>90	96	3,48
Nadolol	10-250	30	124-136	0,81

Fonte: DRUGBANK, 2018c, 2018d, 2018e, 2018f; SCHULZ, M.; SCHMOLDT, 2003.

Nota: MM, massa molecular; t<sub>1/2</sub>, tempo de meia vida; PF, ponto de fusão.

Para o atenolol, são reportadas concentração plasmática máxima em cerca de 600 µg L<sup>-1</sup> para a primeira dose (LEONETTI et al., 1980) e de 280 µg L<sup>-1</sup> para as de manutenção (GILMAN; GOODMAN, 2006). Para o metoprolol, o controle da pressão arterial é geralmente alcançado com doses de 100 a 400 mg dia<sup>-1</sup> (BENFIELD; CLISSOLD; BROGDEN, 1986; FDA, 2017) e a concentração plasmática do fármaco geralmente se encontra entre 100 e 200 µg L<sup>-1</sup> (BENGTSSON; JOHNSON; REGÅRDH, 1975; GILMAN; GOODMAN, 2006). Já para o propranolol, concentrações plasmáticas de 50 a 100 µg L<sup>-1</sup> são ditas como efetivas (MANSUR et al., 1998) e concentrações de 15 a 109 µg L<sup>-1</sup> são encontradas após de o estado de equilíbrio (MELANDER *et al.*, 1977).

Na literatura são encontrados trabalhos que utilizam SPME para determinar  $\beta$ -bloqueadores por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e por cromatografia gasosa (GC). Nsubuga e colaboradores (2018) e Sarafraz-Yazdi e colaboradores (2013) extraíram esses fármacos de matrizes ambientais (NSUBUGA et al., 2018; SARAFRAZ-

YAZDI; ABEDI; ES'HAGHI, 2013); enquanto que técnicas utilizando fibras de MIP (HU et al., 2009) e de poliacrilato (KATAYAMA et al., 2001); microextração por barra sortiva, (FARHADI; FIRUZI; HATAMI, 2015); partículas magnéticas *in tube* (MOLINER-MARTÍNEZ et al., 2012); *column switching* (SILVA GRACIA et al., 2017); e coluna de exclusão por tamanho (UMEZAWA et al., 2008) foram empregadas para matrizes biológicas.

### 3 OBJETIVOS

O objetivo geral e os específicos são mostrados nos tópicos a seguir.

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Aplicação de micropartículas de BSA devidamente sintetizadas e caracterizadas no preparo de amostras reais de plasma humano sem tratamento prévio.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Síntese das partículas de BSA baseando-se em metodologias da literatura;
- b) Caracterização do material por infravermelho, microscopias, análises térmicas, potencial zeta e porosimetria;
- c) Avaliação das partículas quanto a estudos de solubilidade, exclusão de proteínas, cinética e isoterma para a sorção de atenolol, metoprolol e clortalidona;
- d) Desenvolvimento de um método analítico por *column switching* LC–UV para a determinação de atenolol, clortalidona e hidroclorotiazida em plasma humano;
- e) Desenvolvimento e otimização de um método analítico por LC-MS/MS para determinação de atenolol, metoprolol, propranolol e nadolol em plasma humano;
- f) Validação do método analítico LC–MS/MS otimizado;
- g) Comparação do potencial das partículas para a extração de compostos com alta taxa de ligação a proteínas plasmáticas e para aqueles de baixa taxa de ligação;
- h) Aplicação em amostras reais de plasma humano.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e as metodologias aplicadas ao longo do trabalho serão descritos nos tópicos a seguir e, para o melhor entendimento, os mesmos serão divididos em três partes: (I) síntese e caracterização; (II) *column switching* e (III) SPME.

### 4.1 REAGENTES, SOLUÇÕES E EQUIPAMENTOS

Soluções estoques,  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ , de clortalidona (Santa Cruz Biotechnology<sup>®</sup>, Texas, USA), de atenolol, de hidroclorotiazida, de metoprolol, de cloridrato de propranolol e de nadolol (todos Sigma<sup>®</sup>, Missouri, USA) foram preparadas em metanol e armazenadas em frascos âmbar em freezer ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Soluções de trabalho foram preparadas diariamente em plasma humano.

Fosfato de sódio dibásico (Labsynth<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil) e fosfato de potássio monobásico (Dinâmica<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil) foram utilizados para o preparo dos tampões tanto para a síntese das partículas de BSA, quanto para fases móveis. Hidróxido de sódio (Sigma<sup>®</sup>) e ácido clorídrico (Audaz<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil), foram utilizadas para o ajuste de pH. Solução aquosa de cloreto de sódio (Labimpex<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil) a  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  foi utilizada para a diluição de amostras de plasma.

Sobre a síntese, etanol absoluto (Química Moderna<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil) foi utilizado como solvente, BSA liofilizada ( $\geq 98\%$ , Sigma<sup>®</sup>) foi mantida em geladeira ( $6^{\circ}\text{C}$ ) e soluções de glutaraldeído (Dinâmica<sup>®</sup>) 25% e de borohidreto de sódio (Casa da Química<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil) 1% foram preparadas no momento do uso.

Já para as fases móveis, acetonitrila (J. T. Baker<sup>®</sup>, New Jersey, EUA), metanol (J. T. Baker<sup>®</sup>), e ácido fórmico 85% (Pronex<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil) grau HPLC, além de água ultrapura (MilliQ<sup>®</sup>), foram empregados e as fases foram diariamente preparadas.

As análises de cinética e de isoterma e os ensaios com o *column switching* foram desenvolvidas em um HPLC composto por: 2 bombas LC-20AD (Shimadzu<sup>®</sup>, Tóquio, Japão), um injetor manual tipo 7725i (Rheodyne<sup>®</sup>, Waltham, USA), uma válvula de comutação de seis pórticos, modelo FCV-12AH (Shimadzu<sup>®</sup>), um detector UV modelo SPD-10AVP (Shimadzu<sup>®</sup>) e uma coluna analítica ACE<sup>®</sup> 5 C18 ( $150 \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ). O *software* para a aquisição e tratamento dos dados foi o LCSolution<sup>®</sup>.

As fibras de SPME foram preparadas usando micro-hematócrito (Perfecta<sup>®</sup>, 75 mm de comprimento, diâmetro interno de 1 mm e diâmetro externo de 1,5 mm) e cola epóxi (Araldite<sup>®</sup> Hobby). Os analitos extraídos por essa metodologia foram determinados utilizando um sistema de cromatografia líquida de ultra performance (UHPLC) modelo LC-MS 8030 equipado com um analisador de massas triplo-quadrupolo (Shimadzu<sup>®</sup>). O sistema era formado por 2 bombas LC-20AD um auto injetor SIL-20 AHT (todos obtidos da Shimadzu<sup>®</sup>), além de uma coluna guarda Acquity<sup>®</sup> 5 C18 (130 Na, 1,7 µm). O *software* para a aquisição e tratamento dos dados foi o LabSolution<sup>®</sup>.

Outros equipamentos utilizados durante os processos de síntese e de cromatografia envolveram: balança semi-analítica (Kern<sup>®</sup>, Balingen, Alemanha), agitador vórtex (Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup>, Massachusetts, EUA), agitador orbital (IKA<sup>®</sup>, Staufen, Alemanha), agitador de placas (Marconi<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil), agitador mecânico (Glas-col<sup>®</sup>, Indiana, EUA), peneira granulométrica (Brenzinox<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil), pHmetro (Analyser<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil), centrífuga (5810R, Eppendorf<sup>®</sup>, Hamburgo, Alemanha), secadora a vácuo (Centrivap Concentrator, LabConco<sup>®</sup>, Kansas, EUA), espectrofotômetro (BelPhotonics<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil) e banho ultrassom (Unique<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil).

## 4.2 AMOSTRAS

O uso de amostras biológica foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Alfenas, sob o protocolo CAAE 67813317.6.0000.5142. Amostras branco foram coletadas de voluntários que não faziam o uso de anti-hipertensivos. 10 mL de sangue total foram colhidos em tubos com heparina (BD<sup>®</sup>, Curitiba, Brasil), centrifugados a 2500 rpm e o plasma foi separado e armazenado (-20°C) até o momento do uso. Essas amostras foram utilizadas (em *pool*) como branco ou como calibradores fortificados.

Já as chamadas amostras reais foram obtidas voluntariamente de pacientes que utilizavam atenolol, metoprolol e/ou propranolol em suas rotinas. 5 mL de sangue total foram coletados, submetidos ao procedimento para a separação do plasma e fortificadas apenas com o padrão interno (PI).

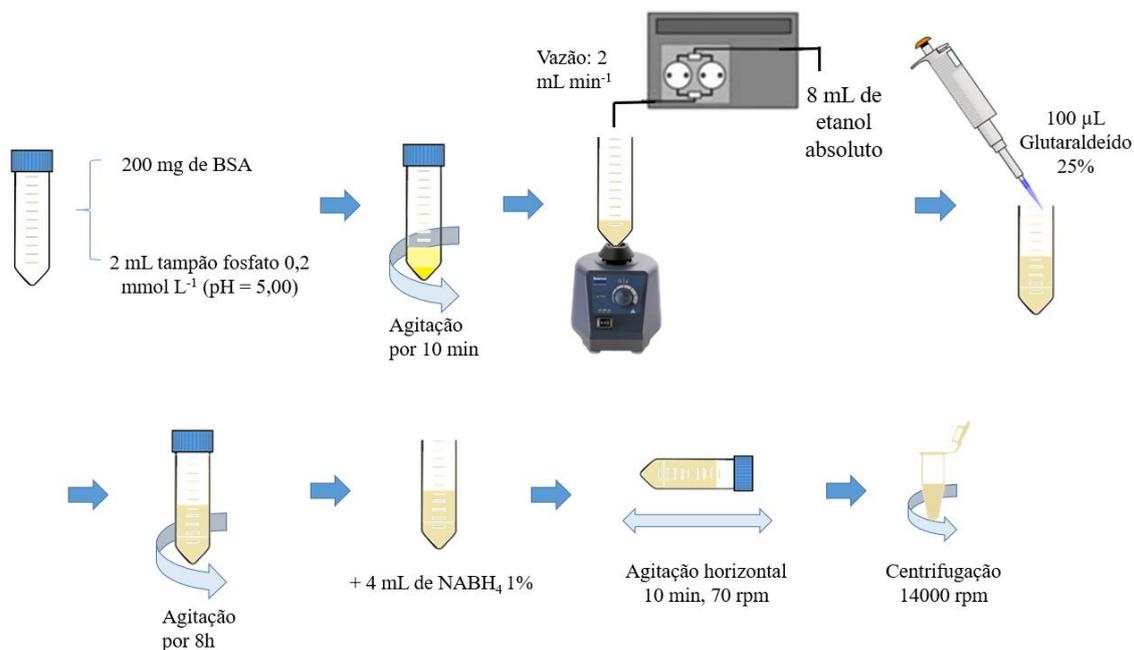
## 4.3 PARTE 1- SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE BSA

A seguir serão apresentados os procedimentos para a síntese e para a caracterização das micropartículas de BSA.

### 4.3.1 Síntese

As partículas de BSA foram sintetizadas por meio do processo de coacervação com modificações na técnica proposta por Galisteo-González e Molina-Bolíver (2014). Em um tubo Falcon (50 mL), foram adicionados 200 mg de BSA e 2 mL de tampão fosfato 0,2 mmol L<sup>-1</sup> (pH=5,00) e a mistura foi agitada em um agitador de placas até a solubilização das proteínas. Em seguida, 8 mL de etanol absoluto foram adicionados, sob agitação em vórtex, a uma vazão de 2 mL min<sup>-1</sup> (controlada por uma bomba do HPLC). Após 5 min, 100 µL da solução aquosa de glutaraldeído (25%) foram adicionados (de uma única vez) e meio reacional foi agitado (900 rpm) por 8h. Por fim, foram adicionadas, de uma única vez, 4 mL de uma solução aquosa de borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>) 1% (v:v), seguida de agitação por 10 min em um agitador mecânico horizontal (70 rpm). Para separar as partículas de BSA, o meio foi centrifugado a 14.000 rpm em três ciclos de 10 min cada (nos quais os sobrenadantes eram retirados e substituídos por etanol absoluto). O material sintetizado foi seco a temperatura ambiente, peneirado (75 < partículas < 106 µm) e guardado em frascos de penicilina até o momento do uso. A Figura 8 a seguir exemplifica as etapas do processo de síntese.

Figura 8 – Esquema ilustrativo do processo de síntese das partículas de BSA.



Fonte: do autor.

### 4.3.2 Caracterização das partículas obtidas

Os estudos a seguir referem-se as etapas de caracterização do material obtido.

#### 4.3.2.1 Solubilidade das micropartículas sintetizadas

Os testes foram realizados para a BSA comercial e para o material sintetizado com o intuito de observar visualmente diferenças entre eles. Além de verificar a possibilidade de as micropartículas serem submetidas a diferentes solventes, que poderiam vir a compor as fases empregadas no procedimento analítico, sem sofrer alterações. Foram avaliados: etanol, metanol, isopropanol, acetonitrila, acetona, hexano e água ultrapura (com pH ajustado entre 2,00 e 12,00).

Em tubos de ensaio (10 mL), 5 mg de cada material foram colocados (separadamente) em contato com 1 mL de cada um dos solventes. Os tubos foram fechados e agitados em agitador orbital por 1h (500 rpm, ± 25°C). Em seguida, avaliou-se visualmente a solubilidade (nas condições avaliadas) das partículas em cada solvente.

#### 4.3.2.2 Espectroscopia no infravermelho

Os estudos por espectroscopia no infravermelho (IR) foram realizados no modo de refletância total atenuada (ATR) para a BSA e para a BSA entrecruzada. Os espectros monitoraram a faixa de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  (com 64 *scans*) e as análises foram realizadas no equipamento IR System Shimadzu® localizado no Núcleo de Controle de Qualidade (NCQ), Unifal-MG.

#### 4.3.2.3 Espalhamento de luz dinâmico

Os estudos de espalhamento de luz dinâmico (DLS) foram realizados para estimar o tamanho das partículas de BSA sintetizadas. Os ensaios foram realizados no laboratório de Pesquisa em Sistemas de Liberação de Fármacos (LSLF – Unifal-MG) e em um analisador de DLS (Zetasizer Nano NS), operando com um ângulo de detecção de  $173^\circ\text{C}$  e a  $\pm 25^\circ\text{C}$ . Uma suspensão do material sintetizado ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) foi preparada em água ultrapura (viscosidade de 0,8872 e índice de refração de 1,330). Previamente às análises a suspensão foi sonicada por 30 min a temperatura ambiente e diluída na proporção de 0,5:9,5 (em água ultrapura v:v).

#### 4.3.2.4 Microscopia de força atômica

As análises por microscopia de força atômica (AFM) foram realizadas para estimar o tamanho e a topografia das partículas obtidas. Inicialmente foi preparada uma suspensão das partículas em etanol para a deposição das mesmas sobre uma lâmina de vidro (1,00 x 1,00 cm). A lâmina foi deixada a temperatura ambiente para a evaporação completa do solvente. As análises foram realizadas com um microscópio de força atômica Park® NX10 (cantilever NSC15), em modo de não contato (NCM) e com 256 pxl. Esse estudo foi realizado no Laboratório de Força Atômica (LabAFM, Unifal-MG).

#### 4.3.2.5 Microscopia eletrônica de varredura

As análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (LEO EVO, Carl Zeiss®) foram realizadas para a BSA e para o material sintetizado. Primeiramente, as amostras foram colocadas em lamínulas e as mesmas foram dispostas em *stubs*. Em seguida, os materiais receberam uma fina camada de ouro em sua superfície. Varreduras com aumento de 1000, 5000 e 10000 vezes foram feitas e as análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia e Análise Ultraestrutural (Universidade Federal de Lavras- UFLA).

#### 4.3.2.6 Potencial zeta

Mais uma vez o analisador de DLS foi utilizado. Foram preparadas em água ultrapura uma solução ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) para a BSA e uma suspensão na mesma concentração para as partículas sintetizadas (sonicadas por 30 min previamente às análises). As análises constituíram-se da medida ( $n=3$ ) do potencial zeta em função do pH. Uma varredura entre os pHs 3,00 e 9,00 foi realizada por titulação automática, adicionando-se volumes suficiente de soluções de NaOH ou HCl  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ . Esse procedimento também foi realizado no laboratório de Pesquisa em Sistemas de Liberação de Fármacos (Unifal-MG).

#### 4.3.2.7 Análise termogravimétrica

As análises foram realizadas para a BSA e para as micropartículas com condições análogas as de MARTÍNEZ *et al.* (2011). Aproximadamente 2 mg das amostras (colocadas em cadinho aberto) foram submetidas a uma variação de temperatura de 30 a  $600^\circ\text{C}$ , sob fluxo de nitrogênio a uma vazão de  $60 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ . A massa das amostras foi continuamente mensurada em função do aumento de temperatura ( $10^\circ\text{C min}^{-1}$ ) em um equipamento SII TG/DTA 7300 (SII Nanotechnology®, Tóquio, Japão) situado no Laboratório de Análise e Caracterização de Fármacos e Formulações (LACFAR – Unifal-MG). Com os resultados obtidos, curvas de decaimento de massa e curvas da primeira derivada (DTG) ( $\mu\text{g min}^{-1}$ ) em função da temperatura puderam ser construídas.

#### 4.3.2.8 Calorimetria exploratória diferencial

A análise foi realizada com condições semelhantes as empregadas no ensaio de termogravimetria (TGA) para o material sintetizado. A massa inicial foi cerca de 2,7 mg (colocada em cadinho fechado); a temperatura variou de 24 a 300°C min<sup>-1</sup>, sob fluxo de nitrogênio (60 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>). A diferença de energia do material foi continuamente mensurada em função do aumento de temperatura (10°C min<sup>-1</sup>) em um equipamento DSC Q20 V24.11 Build 124 (TA Instruments®, Delaware, EUA) localizado no Laboratório Interdisciplinar de Química (LabiQ-Unifal-MG). Com os resultados obtidos, curvas de fluxo de calor em função da temperatura puderam ser construídas.

#### 4.3.2.9 Análise da área superficial e porosidade

Os ensaios foram feitos para a BSA e para as micropartículas. Gás nitrogênio foi utilizado como sorvente: tempo de equilíbrio de 45 s a uma pressão de 0,67 kPa min<sup>-1</sup> e aproximadamente 300 mg de cada material foram usadas nas análises em um equipamento Gemini VII versão 3.03 (modelo 2390 t) na Central de Analítica (Unifal-MG, Poços de Caldas).

#### 4.3.2.10 Resistência ao fluxo

Previamente foi confeccionada (*labmade*) uma coluna RAM (0,63 cm de diâmetro externo e 0,40 cm de comprimento), a qual foi preenchida com cerca de 40 mg das micropartículas de BSA. Filtros poliméricos de cartuchos de SPE (0,50 cm de diâmetro) foram utilizados para não permitir que o material empacotado saísse da coluna. Para o teste, a coluna RAM foi colocada no HPLC (FIGURA 9B) e a vazão foi aumentada de 0,1 a 1,0 a uma taxa de 0,1 mL min<sup>-1</sup>. As pressões obtidas após a estabilização foram anotadas e gráficos de pressão (KgF cm<sup>-2</sup>) vs vazão (mL min<sup>-1</sup>) foram construídos. Esse ensaio foi realizado para

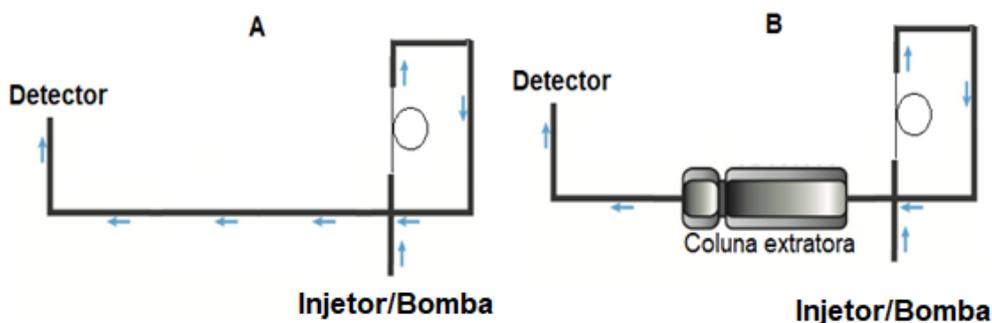
verificar a permeabilidade de diferentes fases móveis (água ultrapura, metanol e água ultrapura: metanol 50:50 v:v) por meio das micropartículas.

#### 4.3.2.11 Exclusão de proteínas

Os ensaios foram realizados de forma análoga ao desenvolvido por Barbosa e colaboradores (BARBOSA et al., 2015). Três testes distintos foram feitos para verificar a exclusão de macro interferentes, utilizando tampão fosfato 10 mmol L<sup>-1</sup> como fase móvel.

Primeiramente, 50 µL de uma solução aquosa de BSA (44 g L<sup>-1</sup>) foi injetado no HPLC (1 mL min<sup>-1</sup> como vazão de fase móvel), indo diretamente para o detector UV ( $\lambda = 255$  nm) e gerando um sinal analítico que correspondia a 100% da BSA (FIGURA 9A). Após, a coluna RAM foi inserida no sistema e a mesma solução foi analisada (FIGURA 9B). A porcentagem de proteínas que o material é capaz de excluir se dá pela divisão da área do sinal obtido com a coluna pelo obtido sem a coluna e multiplicado por 100.

Figura 9 - Esquema do sistema utilizado para os testes de exclusão de proteínas. Utilizando detector ultravioleta (255 nm). Fase móvel (tampão fosfato).



Fonte: DE FARIA et al., 2017b- adaptado.

Um segundo estudo foi realizado de maneira semelhante ao anterior, com a intenção de se verificar a influência do pH na exclusão de proteínas. Dessa vez a fase móvel foi ajustada com diferentes pHs (2,00- 8,00) e uma vazão de 0,3 mL min<sup>-1</sup> foi empregada.

Por fim, um terceiro ensaio foi realizado utilizando um *pool* (n=3) de plasma branco e a porcentagem de exclusão de interferentes da matriz pôde ser observada. Tampão fosfato (com pH ajustado em 6,00; 7,00 e 8,00) e água ultrapura foram utilizados como fase móvel e vazões de 0,3; 0,5; 0,8 e 1,0 mL min<sup>-1</sup> foram avaliadas.

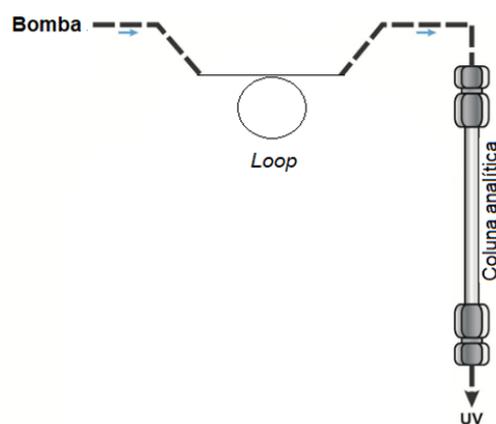
#### 4.3.2.12 Estudo de pH para sorção dos analitos – atenolol e clortalidona

Para verificar a influência do pH (2,00-8,00) na sorção de atenolol e de clortalidona, o sistema de *column switching* (FIGURA 1) foi montado, empregando tampão fosfato 10 mmol L<sup>-1</sup> (pH=6,00): acetonitrila (90:10 e 70:30 v:v), como fase de separação e tampão fosfato 10 mmol L<sup>-1</sup> ajustado nos diferentes pHs como fase de carregamento. As fases foram impulsionadas a uma vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, mantendo-se 1 min para o carregamento. 50 µL da solução dos analitos preparada em água ultrapura (0,5 mg L<sup>-1</sup>) foi injetado a temperatura ambiente e 225 nm foi selecionado como comprimento de onda. Os resultados obtidos (n=3), em termos de área de pico, para as diferentes condições avaliadas foram comparados por meio de análise de variância (ANAVA) e pelo teste Scott-Knott, ao nível de 0,05 de significância. A normalidade e a homogeneidade de variância dos resíduos foram verificadas pelos testes de Shapiro Wilk e de Barlett, respectivamente (5% de significância).

#### 4.3.2.13 Cinéticas de adsorção

De forma geral, em um tubo de ensaio (10 mL) foram colocados 10 mg de micropartículas de BSA e 2,00 mL de soluções dos analitos (atenolol, propranolol ou clortalidona) preparadas em tampão fosfato 10 mmol L<sup>-1</sup> (pH=7,00). As suspensões foram agitadas (agitador orbital, 250 rpm) a 25°C por diferentes tempos. A seguir, o sobrenadante foi separado das partículas e injetado (25 µL) no HPLC-UV (225 nm), usando uma coluna analítica ACE<sup>®</sup> C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) para a separação (FIGURA 10). Brancos (tampão não fortificado), também foram analisados. A fase móvel foi composta de tampão fosfato 10 mmol L<sup>-1</sup> (pH=7,00): acetonitrila (90:10 para atenolol, 35:65 para propranolol e 70:30 v:v, para clortalidona) a uma vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>.

Figura 10 - Esquema da configuração do HPLC para os estudos de cinética e de isoterma. *Loop* de 25  $\mu\text{L}$ , detector UV-VIS.



Fonte: DE FARIA et al., 2017b – adaptado.

Utilizando-se uma curva de calibração e os valores de área obtidos por meio das análises, foi possível calcular a concentração dos analitos presente nos diferentes sobrenadantes bem como a capacidade de sorção das micropartículas ( $q_e$ ) em mg de fármaco por g de material extrator (Equação 1).

$$q_e = \frac{[\text{concentração inicial da solução} - \text{concentração no sobrenadante (mg mL}^{-1}\text{)]} \times \text{volume de solução (mL)} \times 0,1}{\text{Equação 1.}}$$

Para a clortalidona, os ensaios ( $n=3$ ) consistiram na agitação do material sintetizado com a solução do analito ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ) por 0,16; 1,00; 2,00; 5,00; 10,00; 20,00; 30,00; 35,00 e 50,00 min e o sobrenadante foi separado por centrifugação (2500 rpm, por 5 min). Para o atenolol, os testes ( $n=3$ ) foram realizados com solução do analito a  $100 \text{ mg L}^{-1}$  agitados por 0,03; 0,16; 1,00; 2,00 e 5,00 min. Enquanto que a agitação de 0,03 min foi realizada manualmente, as demais foram feitas em agitador orbital (250 rpm). Imediatamente após, o sobrenadante foi separado das micropartículas utilizando um cartucho de SPE (Agilent<sup>®</sup>, Califórnia EUA) vazio com filtro polimérico (Agilent<sup>®</sup>, Califórnia EUA) em sistema de filtração a vácuo (Manifold<sup>®</sup>). Por fim, para o propranolol, os ensaios ( $n=3$ ) foram realizados com soluções ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) agitadas por 0,16; 0,50; 1,00; 5,00; 10,00; 12,00 e 15,00 min. Assim como para o atenolol, o sobrenadante foi separado por sistema de filtração. A partir das leituras, uma curva de cinética ( $q_e$  em função do tempo) pôde ser ajustada.

O ajuste das curvas de sorção foi realizado em diferentes modelos com o auxílio do *software* Origin<sup>®</sup>: pseudoprimeira ordem, pseudosegunda ordem, ordem fracionária, Elovich e difusão intrapartícula.

#### 4.3.2.14 Isotermas de adsorção

Para os ensaios de isotermas, 10 mg das partículas sintetizadas foram colocadas em contato com 2,00 mL de soluções em diferentes concentrações de atenolol, propranolol ou clortalidona (preparadas em tampão fosfato 10 mmol L<sup>-1</sup>, pH=7,00). As suspensões foram agitadas a 25°C em agitador orbital (250 rpm) durante 40 min. Os ensaios foram realizados em triplicata e o material extrator foi separado por meio de centrifugação (5 min, 2500 rpm); 25 µL do sobrenadante foi injetado no HPLC. As condições para a análise cromatográfica foram as mesmas descritas para os estudos de cinética (seção 4.3.2.13).

Para o atenolol, soluções de 20, 40, 60, 100, 200, 500, 800, 1000, 1500 e 1700 mg L<sup>-1</sup> foram colocadas em contato com o material extrator. Para o propranolol, concentrações de 50, 100, 250, 500, 800, 1000 e 1500 mg L<sup>-1</sup> foram avaliadas. Já para clortalidona, foram usadas concentrações de 10, 50, 80, 100, 250, 450, 600 e 800 mg L<sup>-1</sup>. Com uma curva de calibração e as áreas dos sobrenadantes foi possível calcular o  $C_e$  (concentração dos analitos no equilíbrio) e o  $q_e$  (mg de analito extraído por g de micropartículas). Com os dados de  $C_e$  e de  $q_e$  ajustou-se os modelos de isotermas de adsorção utilizando-se o *software* Origin<sup>®</sup>.

#### 4.4 PARTE 2 - EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA *ONLINE*: ATENOLOL, CLORTALIDONA E HIDROCLOROTIAZIDA

Os primeiros estudos com as micropartículas sintetizadas foram realizados com a técnica de *column switching* HPLC-UV, utilizando atenolol e clortalidona como analitos e hidroclorotiazida como padrão interno (PI). Esses anti-hipertensivos foram escolhidos devido a comum associação atenolol + clortalidona em tratamentos cardíacos, além deles apresentarem taxas distintas de ligação a proteínas plasmáticas (3; 75 e 67% para atenolol, clortalidona e hidroclorotiazida, respectivamente) (DRUGBANK, 2018c, 2018a, 2018b).

Um método de separação dos fármacos com a coluna analítica ACE<sup>®</sup> 5 C18, (150 x 4,6 mm, 5 µm) foi otimizado partindo-se de condições da literatura (EL-GINDY; SALLAM; ABDEL-SALAM, 2008; ELGAWISH; MOSTAFA; ELSHANAWANE, 2011; GONZALEZ et al., 2009). Os ensaios foram feitos em triplicata e 100 µL dos analitos preparados em água ultrapura (1 mg L<sup>-1</sup>) foram injetados no sistema com seguintes condições iniciais: vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>, 225 nm e temperatura ambiente. Avaliou-se diferentes fases

móveis para a separação dos fármacos - água ultrapura: acetonitrila (90:10 e 70:30 v:v), tampão fosfato 10 mmol L<sup>-1</sup>: acetonitrila (85:15, 80:20, 70:30 v:v), e tampão fosfato 10 mmol L<sup>-1</sup>: metanol (85:15, 80:20, 70:30 v:v). A temperatura do forno analítico foi estudada no intervalo de 25 a 50°C, com variações de 5°C.

Com o sistema de *column switching* (FIGURA 1) e a injeção de *pool* (n=6) de plasma branco fortificado, os parâmetros otimizados para a separação foram mantidos, enquanto que outros foram estudados: ajustes no pH do tampão fosfato da fase de separação para 6,00; 7,00 ou 8,00; temperatura de extração (de 25 a 50°C); vazão de carregamento (0,3; 0,5, 0,8 e 1,0) e de eluição (0,5; 0,8 e 1,0); tempo de carregamento (0,5; 0,7; 0,9; 1,1 e 1,3) e de eluição (0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 e 0,8); e diluição do plasma (1:1; 1:2, 1:3, 1:4 – plasma: água ultrapura v:v). Em condições iniciais, 50 µL de plasma fortificado (1 mg L<sup>-1</sup>) foi injetado no sistema, água ultrapura foi usada como fase de carregamento, tempos de 0,7 e 0,5 min, foram adotados para carregamento e eluição, respectivamente; a vazão das fases foi mantida em 1 mL min<sup>-1</sup>.

#### 4.5 PARTE 3 - FIBRA DE SPME: ATENOLOL, PROPRANOLOL, METOPROLOL E NADOLOL

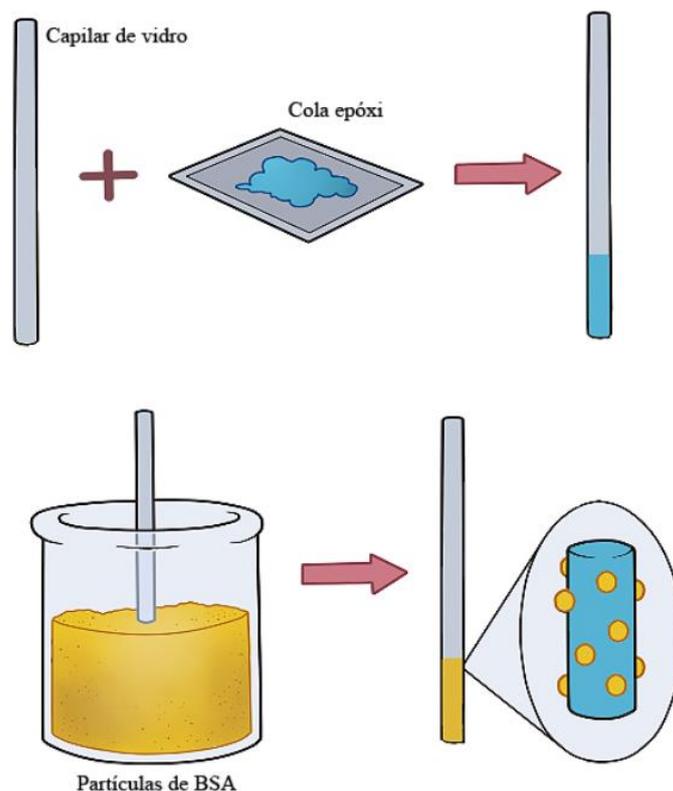
Devido ao comportamento do material sintetizado frente à técnica de *column switching* e dificuldades relacionadas a ionização da clortalidona (ambos melhores discutidos nas seções 5.2.5 e 5.3.1), o projeto foi alterado em relação aos analitos e à técnica para a extração dos mesmos (com a utilização de fibras de micropartículas de BSA e técnicas de SPME LC-MS/MS).

##### 4.5.1 Confeção das fibras de micropartículas de BSA

O material sintetizado foi depositado na extremidade externa de um capilar de vidro utilizando cola epóxi (Araldite<sup>®</sup> Hobby). O processo para a obtenção da fibra foi análogo ao desenvolvido por Boscari et al. (2017) e consistiu em 4 etapas descritas a seguir e resumidas na Figura 11.

- a) Uma das extremidades do capilar foi vedada utilizando a cola epóxi, enquanto a outra recebeu uma fina camada de revestimento (cerca de 1,0 cm) da mesma cola;
- b) A extremidade com a cola foi revestida com as micropartículas de BSA (pó);
- c) As fibras permaneceram em repouso por 8h para a secagem completa da cola;
- d) As fibras foram lavadas com água ultrapura, sob agitação orbital por 5 min.

Figura 11 - Esquema do preparo da fibra extratora.



Fonte: do autor.

#### 4.5.2 Otimização dos parâmetros de fragmentação

A ionização por *electrospray* (ESI) foi utilizada para a fragmentação dos fármacos, os padrões de fragmentação foram otimizados a partir de soluções preparadas em metanol a  $1 \text{ mg L}^{-1}$  e utilizando metanol: ácido fórmico 0,1% (90: 10 v: v) como fase móvel ( $0,45 \text{ mL min}^{-1}$ ). Inicialmente foi realizado o *scan* no modo positivo e, em sequência, foram feitos o monitoramento do íon precursor e dos fragmentos mais abundantes para cada um dos compostos (TABELA 3). Também foram otimizados os parâmetros de energia de colisão

(CE), fluxo do gás de secagem ( $2 \text{ L min}^{-1}$ ), temperatura da linha de dessolvatação ( $250^\circ\text{C}$ ) e do *heat block* ( $400^\circ\text{C}$ ). Para a quantificação, foi utilizado o íon de maior intensidade.

Tabela 3 – Fragmentos utilizados para as análises por ESI LC-MS/MS e energia de colisão.

Fármaco	Íon precursor ( <i>m/z</i> )	Fragmentos ( <i>m/z</i> )	Energia colisão (eV)
Atenolol	267,1	116,1*	-28,0
		145,1	-21,0
		133,1	-32,0
Metoprolol	268,1	116,2*	-20,0
		133,1	-27,0
		98,2	-21,0
Propranolol	259,8	116,2*	-26,0
		98,2	-20,0
		155,1	-19,0
Nadolol (PI)	309,8	201,1*	-27,0
		74,2	-24,0
		145,1	-16,0

Fonte: do autor.

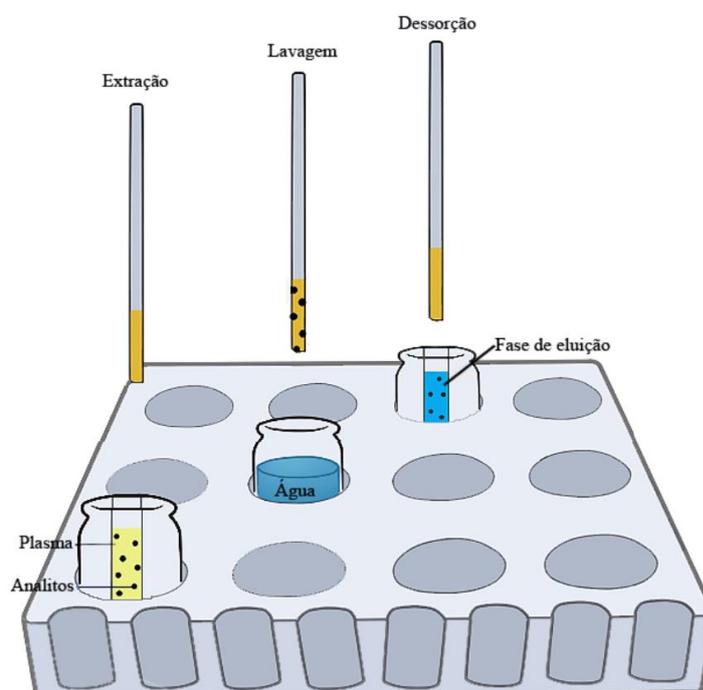
Nota: \* Fragmentos utilizados para a quantificação.

#### 4.5.3 Preparo de amostras e determinação dos analitos

Após a otimização, realizada com plasma fortificado com ATE ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) e de forma univariada. O processo de extração dos analitos se deu em três etapas sequenciais e sob agitação em agitador orbital, 250 rpm. (FIGURA 12):

- a) Extração: a fibra de micropartículas de BSA foi inserida em um *insert* de vidro contendo  $200 \mu\text{L}$  de plasma fortificado e diluído 4:1 em solução  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  de NaCl para a sorção do analito durante 10 min;
- b) Limpeza: a fibra foi mergulhada em *vial* contendo 1 mL de água ultrapura por 5 s;
- c) Eluição: a fibra foi colocada em um segundo *insert* contendo  $200 \mu\text{L}$  fase de eluição (metanol: água 70:30 v:v) por 2 min, para a dessorção dos fármacos.

Figura 12 – Aparato utilizado para o preparo de amostras. O suporte foi acoplado a um agitador de tubos orbital.



Fonte: do autor.

O eluato obtido após a terceira etapa foi diretamente injetado (10  $\mu\text{L}$ ) no sistema de UHPLC-MS/MS. Uma pré-coluna Acquity<sup>®</sup> C18 (2,1 mm x 5 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ ) foi a única coluna presente no sistema e metanol: ácido fórmico 0,1% (90:10 v:v) foi utilizado como fase móvel a um fluxo de 0,45 mL  $\text{min}^{-1}$ . Durante as análises, uma segunda proporção de fase foi utilizada (80:20 aquoso: orgânico v:v) para a limpeza da pré-coluna e do sistema analítico. Em 3 min a análise era encerrada (TABELA 4).

Tabela 4 – Condições para a determinação dos analitos.

Tempo (min)	Concentração de MeOH (%)	Posição da válvula	Evento
0,01	90	Massas	Fragmentação
0,20	20	Massas	Determinação
0,70	20	Descarte	Limpeza
1,20	90	Descarte	Limpeza
2,60	90	Massas	Recondicionamento
3,00	90	Massas	Fim da análise

Fonte: do autor.

Nota: MeOH = metanol.

#### 4.5.4 Comparação entre diferentes sínteses

Fibras preparadas a partir das micropartículas de BSA sintetizadas em três diferentes dias (protocolos descritos nas seções 4.3.1 e 4.5.1) foram comparadas com o intuito de se verificar a reprodutibilidade e a precisão entre três lotes distintos. Para esse estudo, plasmas branco fortificados com os analitos nas concentrações baixa (100, 80 e 15  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), média (600, 600 e 120  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e alta (1200, 1000 e 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ , para atenolol, metoprolol e propranolol, respectivamente) e com o PI (370  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), foram diluídos 1:4 em solução de NaCl (1 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) e submetidos a extração. As áreas absolutas e as relativas para cada um dos fármacos foram comparadas em termos de desvio padrão relativo (DPR%).

#### 4.5.5 Reuso das fibras de extração

A vida útil de uma fibra, assim como sua capacidade máxima de reuso, foi avaliada por meio de 35 extrações sequências de plasma fortificado com a concentração média dos analitos e com o PI e diluído com NaCl. As áreas absolutas e as relativas de cada um dos fármacos foram comparadas nas diferentes extrações.

#### 4.5.6 Estabilidade

A estabilidade foi avaliada de acordo com formas de armazenamento que poderiam ser aplicadas ao longo das análises. As estabilidades de bancada (curto prazo) e após congelamento (longo prazo) foram aplicadas para o plasma fortificado nas concentrações baixa, média e alta (n=3). Para o teste de curto prazo, a matriz foi deixada sob a bancada por 4 h, submetida ao preparo de amostras e analisada. Já para o de longo prazo, o plasma dopado foi congelado ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) por 25 dias, descongelado a temperatura ambiente, extraído e analisado. Um terceiro ensaio avaliou a estabilidade do eluato (obtido após a dessorção dos analitos da fibra extratora) em geladeira ( $6^{\circ}\text{C}$ ) por 24 h e esse teste também foi realizado em

3 concentrações e em triplicata. Os resultados foram comparados, em termos de exatidão (erro relativo, E%) com aqueles obtidos com amostras recém preparadas.

#### 4.5.7 Validação analítica

A validação do método proposto para a determinação de atenolol (ATE), de metoprolol (MET) e de propranolol (PROP), utilizando nadolol (NAD) como PI, foi realizada para assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos, seguindo diretrizes de guias de validação como o FDA (FDA, 2013) e o guia da União Europeia (OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2002). Efeito matriz, linearidade, precisão, exatidão, seletividade, efeito de memória, recuperação e robustez foram os parâmetros avaliados. Nos ensaios foram quantificados os fragmentos selecionados para cada um dos fármacos (ver Tabela 3), utilizado um volume de injeção de 10  $\mu$ L.

##### 4.5.7.1 Efeito matriz

Para verificar a existência do efeito matriz, foram construídas duas curvas de calibração com as concentrações baixa, média e alta ( $n=3$ ) de cada um dos analitos e com a presença do PI ( $370 \mu\text{g L}^{-1}$ ). A primeira curva foi obtida a partir de água ultrapura fortificada e submetida ao preparo de amostra e a segunda, a partir de plasma fortificado e submetido ao preparo de amostra. Os coeficientes de inclinação ( $\beta_1$ ) de ambas as curvas foram comparados por meio de um teste t de Student ao nível de 5% de significância. Resultados estatisticamente iguais (valor-p  $\geq 0,05$ ) indicam que o efeito da matriz não é considerável; enquanto que resultados estatisticamente diferentes (valor-p  $< 0,05$ ), dizem que a matriz causa influência no método de determinação dos analitos.

#### 4.5.7.2 Seletividade

A seletividade foi avaliada por meio da injeção de um *pool* (n=6) de plasma branco. A não presença de sinais analíticos ou áreas absolutas inferiores a 20% daquelas obtidas com o limite de quantificação (LQ) nos mesmos tempos de retenção dos fármacos, foi usada como critério para indicar a seletividade do método proposto.

#### 4.5.7.3 Linearidade e tratamento estatístico das curvas de calibração

A linearidade foi avaliada por meio de curvas de calibração (n=6) obtidas com plasma fortificado nas seguintes concentrações: 100, 200, 400, 600, 800 e 1200  $\mu\text{g L}^{-1}$  (para ATE); 80, 200, 400, 600, 800 e 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  (para MET) e 15, 40, 120, 160 e 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  (para PROP), a concentração do NAD foi mantida em 370  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A linearidade é observada quando o modelo aplicado não viola as pressuposições da análise de regressão e apresenta coeficiente de correlação superior à 0,99 como predito por guias de validação (FDA, 2013).

Inicialmente foram analisadas a precisão das áreas relativas para os fármacos conforme cada uma das concentrações. Nos casos em que se obteve  $\text{DPR}\% > 16\%$ , foram realizadas uma análise gráfica por *boxplot* a fim de se identificar e retirar observações discrepantes que prejudicavam a análise (*outliers*). Após, as curvas foram ajustadas considerando a média das áreas relativas. Para avaliar as pressuposições, analisou-se os resíduos quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk (1965), à independência pelo teste de Box-Pearce (1970) e à homocedasticidade de variância por meio do teste de Breusch-Pagan (1979); já para verificar a significância do modelo, realizou-se uma ANAVA por meio de um teste F. Vale ressaltar que as análises estatísticas foram realizadas considerando o nível de 5% de significância, utilizando o *software R*<sup>®</sup>.

#### 4.5.7.4 Precisão e exatidão

Os ensaios de precisão (DPR%) e de exatidão (E%) foram realizados com plasma fortificado e em três diferentes dias: intradia (6 réplicas analisadas no mesmo dia) e interdía (3 réplicas das concentrações baixa, média e alta realizadas em outros dois dias sequenciais).

Para a precisão foram aceitos desvios de até 20% para o ponto mais baixo de cada curva (100, 80 e 15  $\mu\text{g L}^{-1}$ , para ATE, MET e PROP) e de 15% para as demais concentrações. Já para a exatidão, foram considerados aceitáveis desvios de  $\pm 20\%$  para o limite de quantificação e desvios de  $\pm 15\%$  para as concentrações média e alta (FDA, 2013).

#### 4.5.7.5 Limites de detecção e limites de quantificação

Os limites de detecção (LD) foram calculados por meio dos coeficientes das curvas de calibração obtidas com matriz fortificada (Equação 2) e os limites de quantificação (LQ) foram considerados como os menores pontos das curvas obtidos com precisão e exatidão adequadas para cada um dos analitos.

$$LD = \frac{3,3 \times s \beta_0}{\beta_1} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde  $s$  é o desvio padrão,  $\beta_1$  é o coeficiente angular e  $\beta_0$  é o coeficiente de linear.

#### 4.5.7.6 Efeito de memória

Para esse ensaio, primeiramente um plasma branco foi analisado, seguido da leitura do ponto de maior concentração preparado em matriz (1200, 1000 e 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ , para ATE, MET e PROP). Por fim, foram lidos mais dois brancos em sequência. Se presentes no último branco, as áreas absolutas dos analitos e do PI não devem superar 20% das áreas obtidas com a matriz fortificada no menor ponto (FDA, 2013).

#### 4.5.7.7 Recuperação absoluta

A recuperação absoluta foi avaliada para os níveis baixo, médio e alto de cada um dos analitos e para o PI. Para esse teste, foram comparados os resultados obtidos com a matriz fortificada antes do preparo de amostras (descrito na seção 4.5.3) e a matriz branco fortificada após o processo extrativo, como sumarizado abaixo:

- a) 200  $\mu\text{L}$  de plasma branco (diluído 4:1 em solução de NaCl 1mmol  $\text{L}^{-1}$ ) foi submetido ao processo de extração com a fibra de micropartículas de BSA por 10 min;
- b) A fibra foi mergulhada (5s) em água ultrapura;
- c) Em um eppendorf<sup>®</sup> de 1,5 mL, soluções dos analitos (preparadas em metanol) foram adicionadas em volume suficiente para se obter as concentrações finais presentes na matriz quando a mesma era fortificada no início do processo extrativo (considerando-se a diluição de 1:4, NaCl 1,0 mmol  $\text{L}^{-1}$ : plasma v:v), a seguir foram secos e ressuspensos em 200  $\mu\text{L}$  de fase de eluição (metanol: água, 70:30 v:v);
- d) A fibra passou pelo processo de eluição por 2 min;
- e) O eluato foi analisado por UHPLC-MS/MS.

As áreas absolutas de cada um dos analitos e do PI obtidas em ambas as metodologias foram comparadas, adotando-se o preparo fortificado ao final como a resposta referente a 100% (processo sem perdas), e os resultados obtidos com a matriz fortificada no início do processo, como a porcentagem de recuperação absoluta.

#### 4.5.7.8 Robustez

A robustez do método proposto foi avaliada de acordo com o Teste de Youden e com o Guia de Validação da União Europeia (OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2002). Os estudos foram realizados utilizando um *pool* (n=6) de plasma branco fortificado na concentração média dos analitos e com a presença do PI. Sete ensaios distintos foram realizados (n=3), nos quais um ou mais parâmetros já otimizados sofreram pequenas variações e uma oitava análise foi feita com as condições otimizadas. Os

parâmetros avaliados e a combinação dos mesmos para o Teste de Youden são mostrados nas Tabelas 5 e 6 abaixo.

Tabela 5- Parâmetros para avaliar a robustez do método proposto.

<b>Parâmetros</b>	<b>Otimizada (+)</b>	<b>Variação (-)</b>
Volume de eluição	200 µL	190 µL
Volume de extração	200 µL	190 µL
Tempo de extração	10 min	10,5 min
Tempo de eluição	2 min	2,5 min
Fase móvel (MeOH: CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,1%)	90:10 v:v	87:13 v:v
Vazão de fase móvel	0,45 mL min <sup>-1</sup>	0,48 mL min <sup>-1</sup>
Fase de eluição (MeOH: H <sub>2</sub> O)	70:30 v:v	73:27 v:v

Fonte: do autor.

Nota: MeOH, metanol e CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ácido fórmico.

Tabela 6 – Matriz para a realização do Teste de Youden.

<b>Parâmetros analíticos</b>	<b>Combinação fatorial</b>							
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
Volume de extração	+	+	+	+	-	-	-	-
Volume de eluição	+	+	-	-	+	+	-	-
Tempo de extração	+	-	+	-	+	-	+	-
Tempo de eluição	+	+	-	-	-	-	+	+
Fase móvel	+	-	+	-	-	+	-	+
Vazão de fase móvel	+	-	-	+	+	-	-	+
Fase de eluição	+	-	-	+	-	+	+	-
RESULTADO	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>g</i>	<i>h</i>

Fonte: do autor.

A ordem de realização dos testes foi aleatória e definida por sorteio. Para avaliar a existência de possíveis diferenças significativas entre os resultados (áreas relativas) dos ensaios (*a* - otimizada e *b*, *c*, *d*, *e*, *f*, *g*, *h* – com variações), realizou-se uma ANAVA considerando-se um nível de 5% de significância.

#### 4.6 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS

Amostras de voluntários que apresentam em sua rotina o uso de ATE, MET e/ou PROP foram coletadas e avaliadas por meio de questionário uma vez que o paciente não poderia apresentar uso concomitante de NAD. Os plasmas coletados foram fortificados com o PI ( $370 \mu\text{g L}^{-1}$ ), diluídos com NaCl  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ , submetidos ao preparo de amostras (seção 4.5.3) e analisados a partir do método validado. As concentrações dos fármacos em cada análise foram calculadas utilizando as áreas relativas obtidas e a equação de reta resultante da curva de calibração.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nos tópicos a seguir serão abordados os resultados obtidos ao longo do projeto.

### 5.1 PARTE 1- SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE BSA

A seguir serão apresentados e discutidos os resultados da síntese das micropartículas de BSA bem como dos diferentes testes de caracterização do material obtido.

#### 5.1.1 Síntese das micropartículas de BSA

Metodologias já presentes em literatura que obtiveram como resultado partículas de maiores diâmetros (de até cerca de 500 nm) foram utilizadas como base para a síntese no presente projeto. Essa condição foi escolhida devido ao sistema inicialmente proposto, o *column switching*, pois no preenchimento de colunas os materiais podem levar a complicações quanto a pressão do sistema durante as análises e a entupimentos nos filtros da coluna RAM.

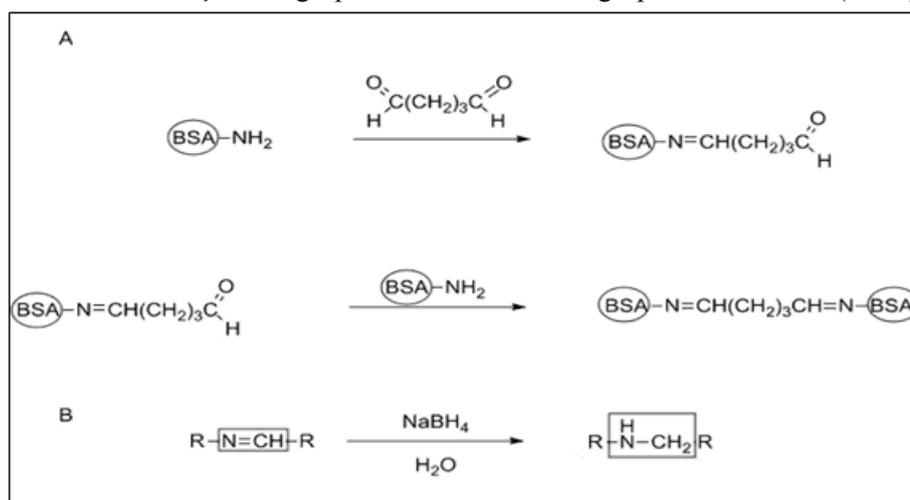
Galisteo-González e Molina-Bolíver (2014) estudaram o diâmetro das partículas de BSA sob diferentes condições de síntese. Em um dos resultados, foi percebido que quando mantido o pH do tampão, o diâmetro era aumentado em função da concentração de BSA. Maiores concentrações resultam em uma diminuição da taxa de nucleação por unidade de volume e por unidade de tempo (GALISTEO-GONZÁLEZ; MOLINA-BOLÍVAR, 2014), levando assim a uma maior agregação e, conseqüentemente, a formação de partículas maiores (KAKRAN et al., 2012). Em um segundo estudo, os autores perceberam que o diâmetro diminuía à medida em que o pH se afastava do ponto isoelétrico da BSA, indicando que a interação eletrostática é um fator que controla a formação das partículas (GALISTEO-GONZÁLEZ; MOLINA-BOLÍVAR, 2014). Assim, no projeto proposto, para se obter maior diâmetro utilizou-se pH=5,00. O estudo da taxa de adição de etanol também foi realizado e os autores perceberam que uma injeção rápida de solvente levava à um aumento na nucleação e partículas uniformes foram formadas na faixa de 1,0 a 7,5 mL min<sup>-1</sup> (GALISTEO-

GONZÁLEZ; MOLINA-BOLÍVAR, 2014). Como a diferença no diâmetro com uma taxa de adição de 1 ou de 2 mL min<sup>-1</sup> não foi significativa (segundo os autores), no presente trabalho, para dispendir menos tempo nessa etapa, escolheu-se operar com 2 mL min<sup>-1</sup>, com a vazão controlada por meio de uma bomba de HPLC e sob agitação em vórtex (diferentemente de Galisteo-González e Molina-Bolíver).

Estudos afirmam que o volume de glutaraldeído não leva a mudanças significativas de diâmetro das partículas (GALISTEO-GONZÁLEZ; MOLINA-BOLÍVAR, 2014; RAHIMNEJAD; NAJAFPOUR; BAKERI, 2012; TARHINI; GREIGE-GERGES; ELAISSARI, 2017) e que esse agente, por induzir o entrecruzamento na estrutura das proteínas através da ligação de grupos amino livres de lisina ou resíduos de hidroxilisina (TANEJA; SINGH, 2018), proporciona melhor estabilidade para partículas formadas (RAHIMNEJAD; NAJAFPOUR; BAKERI, 2012; TANEJA; SINGH, 2018). No presente trabalho optou-se por solução aquosa de glutaraldeído a 25% (v:v), uma vez que essa diluição é empregada tanto para a obtenção de RAMs quanto para a síntese de nanopartículas em sistemas de *drug delivery* (DE FARIA et al., 2017b; RAHIMNEJAD; NAJAFPOUR; BAKERI, 2012; RODRIGUES, 2014; SANTOS-NETO et al. 2008) e concentrações mais altas e maiores volumes do agente reticulante ajudam a diminuir a dilatação do material sintetizado em água (RAHIMNEJAD; NAJAFPOUR; BAKERI, 2012).

O entrecruzamento da albumina com o glutaraldeído resulta em grupamentos imina (FIGURA 13A), que são facilmente reativos e propensos a sofrer hidrólise. A imina pode ser reduzida a amina com a adição de NaBH<sub>4</sub> (FIGURA 13B), o que proporciona maior estabilidade (MENEZES; FÉLIX, 1998). Devido ao uso das micropartículas em sistemas com solventes aquosos e orgânicos, optou-se por adicionar NaBH<sub>4</sub> (1%) no processo de síntese (diferentemente do que é visto para materiais de *drug delivery*).

Figura 13 – Processo de entrecruzamento da BSA com glutaraldeído (em A) e redução dos grupos imina formados a grupamentos amina (em B).



Fonte: do autor.

Durante a centrifugação, o sobrenadante foi substituído por etanol com o intuito de se remover do meio BSA não entrecruzada e resíduos de reagentes. Para se determinar quantos ciclos seriam necessários, os sobrenadantes retirados foram analisados em espectrofotômetro (255 nm), obtendo-se absorvâncias de 0,054; 0,001 e 0,000, para o primeiro, segundo e terceiro ciclos. Portanto, três lavagens foram o suficiente para não mais se detectar resíduos de síntese.

Com a finalidade de se manter uma maior uniformidade do material para o seu uso como RAM e para os estudos de caracterização, após secas, as micropartículas foram tamisadas em peneiras granulométricas selecionando-se os tamanhos entre 75 e 106  $\mu\text{m}$  (FIGURA 14). Os materiais foram então adicionados em frascos de penicilina e armazenados até o momento do uso.

Figura 14 – BSA (A) e material sintetizado (B).



Fonte: do autor.

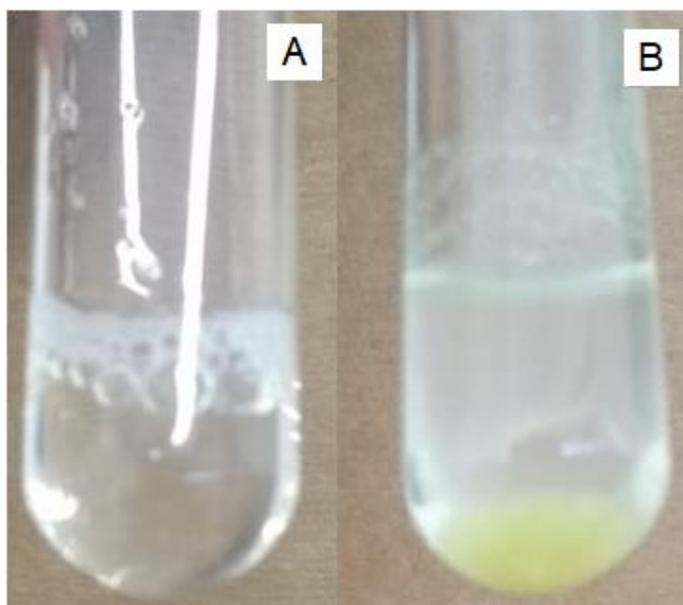
## 5.1.2 Caracterização das micropartículas

As discussões dos testes de caracterização serão apresentadas nos tópicos a seguir.

### 5.1.2.1 Solubilidade

Nas condições avaliadas e para os solventes orgânicos, tanto matéria-prima quanto material sintetizado ficaram majoritariamente ao fundo do tubo de ensaio. Já para água ultrapura, foram observadas diferenças no comportamento dos materiais. Enquanto que a BSA comercial foi totalmente solubilizada, as micropartículas mantiveram-se insolúveis (FIGURA 15), mesmo com o ajuste de pH. Nas condições avaliadas, o comportamento das partículas de BSA pode ser explicado pelo entrecruzamento promovido pelo glutaraldeído, que diminui a hidrossolubilidade do material sintetizado (RAHIMNEJAD; NAJAFPOUR; BAKERI, 2012). Os resultados indicam ainda a possibilidade de uso de diversos solventes, incluindo a água, para a composição das fases móveis utilizadas nas análises sem que haja prejuízos para o material de extração.

Figura 15 - Diferença de solubilidade entre BSA (A) e partículas sintetizadas (B) em água ultrapura.

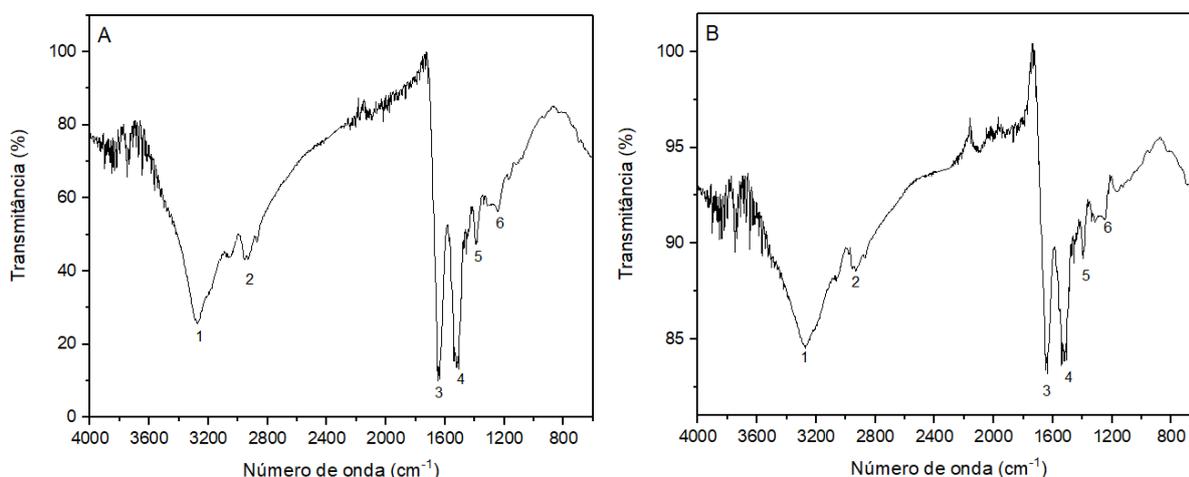


Fonte: do autor.

### 5.1.2.2 Espectroscopia no infravermelho

A Figura 16A mostra o espectro de ATR obtido para a BSA comercial, bandas principais em aproximadamente: (1)  $3274\text{ cm}^{-1}$  (amida, estiramento N-H), (2)  $2954\text{ cm}^{-1}$  (amida, estiramento N-H do íon  $\text{NH}_3^+$ ), (3)  $1634\text{ cm}^{-1}$  (amida, estiramento C=O), (4)  $1521\text{ cm}^{-1}$  (amida, estiramento C-N e dobramento de N-H), (5)  $1389\text{ cm}^{-1}$  (dobramento de grupos  $\text{CH}_2$ ), e (6)  $1240\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-N e dobramento N-H), foram obtidas e elas estão relacionadas à estrutura secundária das proteína (BRONZE-UHLE et al., 2016; RANI, 2016). Para o material sintetizado (FIGURA 16B), o espectro foi bastante semelhante ao do material de partida, indicando uma preservação parcial da configuração da proteína. Ainda é possível perceber um pequeno deslocamento das bandas de amida I (3),  $1640\text{ cm}^{-1}$ , e de amida III (6),  $1250\text{ cm}^{-1}$ , no espectro das micropartículas obtidas. Resultados semelhantes foram obtidos por Bronze-Uhle e coautores (2016).

Figura 16 - Espectros de infravermelho (ATR) para BSA (A) e para o material sintetizado (B).



Fonte: do autor.

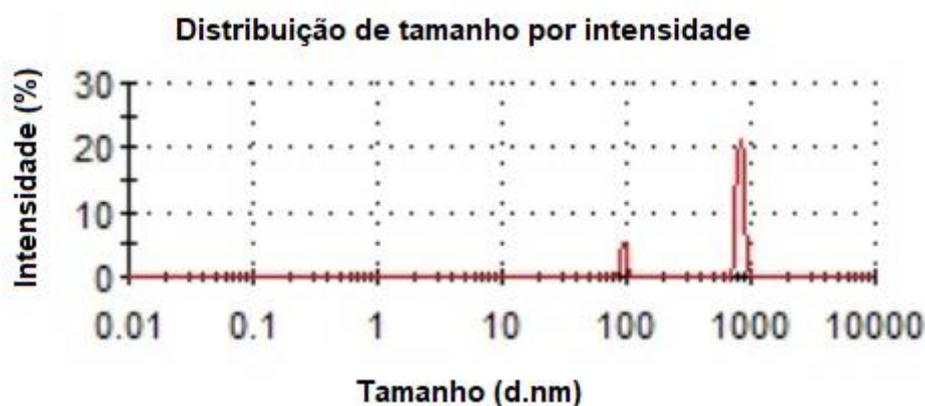
Vale ressaltar que a diminuição da intensidade das bandas para o material sintetizado pode indicar interações diferentes para os grupos após o entrecruzamento (BRONZE-UHLE et al., 2016) ou ainda pode estar relacionado a quantidade de material utilizada e a disposição do mesmo no espectrofotômetro no infravermelho.

### 5.1.2.3 Espalhamento de luz dinâmico

Para minimizar a formação de agregados, a suspensão contendo as partículas de BSA foram sonicadas por 30 min e homogeneizadas previamente às leituras.

Duas populações principais e distintas foram obtidas (FIGURA 17). A primeira com um tamanho de cerca de 140 nm; e a segunda, mais intensa, com diâmetros próximos de 1000 nm. O tamanho médio da população de micropartículas foi calculado como 930 nm.

Figura 17 - Tamanho e distribuição das micropartículas obtidas por meio da técnica de DLS. A amostra foi dispersa em água ultrapura ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e analisada a  $25^\circ\text{C}$ .



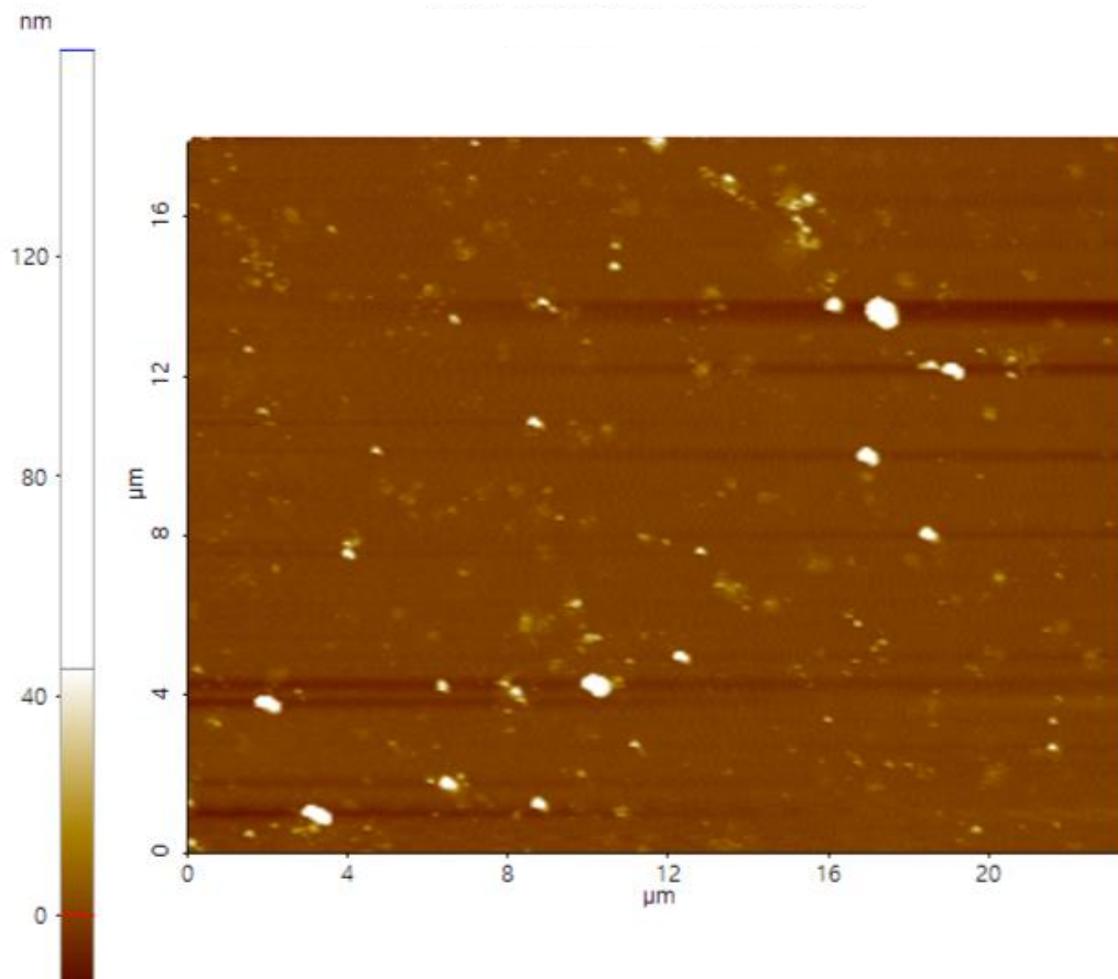
Fonte: do autor.

O índice de polidispersão (PDI) variou entre 0,708 e 1,00. Valores de PDI próximos de 1,0 indicam uma polidispersão do material analisado e fatores como agregação e/ou sedimentação das partículas ou heterogeneidade do material sintetizado contribuem para esse resultado.

### 5.1.2.4 Microscopia de força atômica

A Figura 18 é resultado da AFM para as micropartículas sintetizadas. Por essa imagem foi possível observar uma população de partículas isoladas com forma oval e tamanho (eixo x) médio de 311 nm ( $n=65$  partículas analisadas). Vale ressaltar que esses resultados foram obtidos considerando-se os *clusters* formados, contudo partículas a partir de 184 nm foram observadas.

Figura 18 – Microscopia de força atômica para as partículas sintetizadas. 18 x 23,5 (altura x largura), 258 pxl.

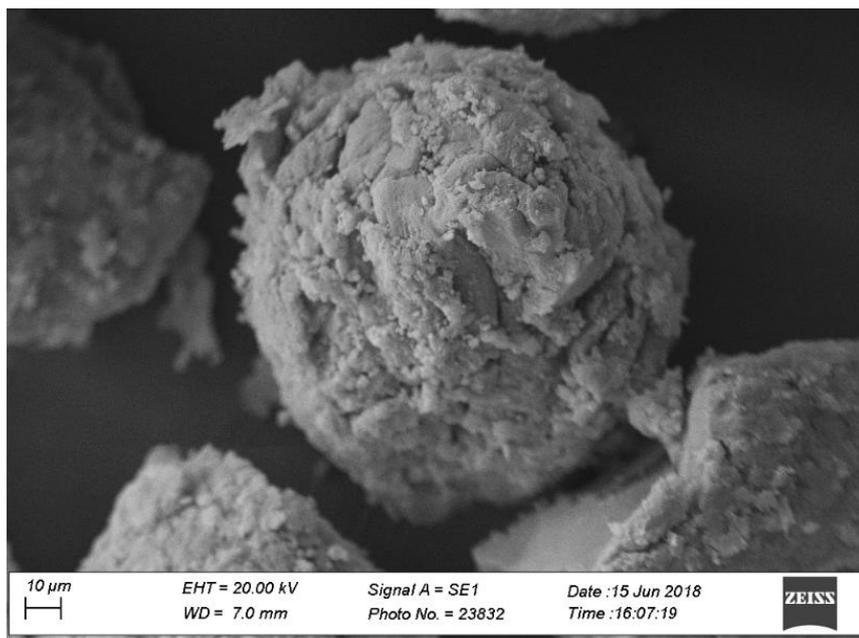


Fonte: do autor.

#### 5.1.2.5 Microscopia eletrônica de varredura

O recobrimento das amostras com ouro foi realizado para aterrar os elétrons que as atingiriam durante a técnica, evitando efeitos de carregamento ou geração de calor (COSTA, 2009). Na Figura 19 tem-se a microscopia para o material sintetizado com aumento de 1000x. A partir da imagem foi possível observar a formação de *clusters* das micropartículas.

Figura 19– SEM para o material sintetizado. Ampliado 1000 vezes.



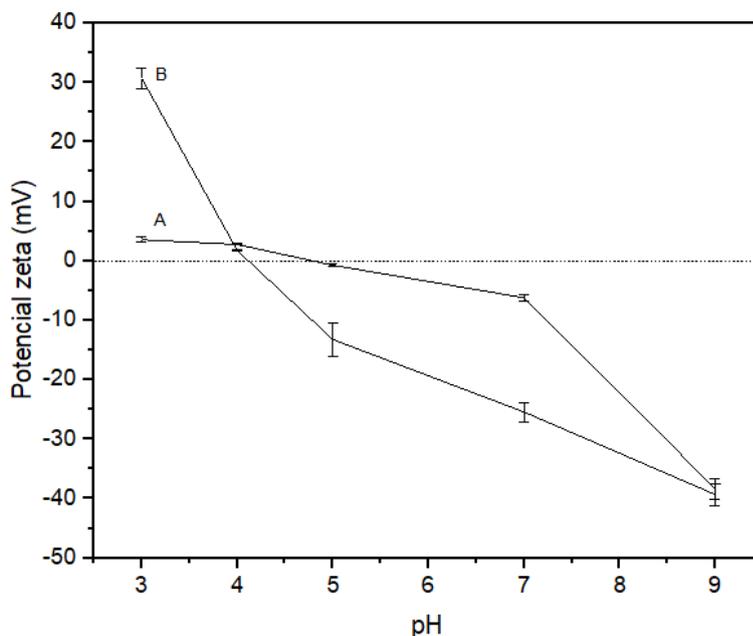
Fonte: do autor.

Ao final das três técnicas realizadas de forma complementar para se estimar o tamanho do material sintetizado (DLS, AFM e SEM), foram percebidas populações heterogêneas, com um diâmetro médio na escala de micrometros e com a característica de formação de aglomerados. A formação dos *clusters* pode também ser explicada pela baixa repulsão eletrostática entre as partículas de BSA no pH em que foi realizado a síntese (pH = 5,00); contudo os maiores diâmetros foram favoráveis para as técnicas de extração nas quais as micropartículas foram utilizadas.

#### 5.1.2.6 Potencial zeta

O potencial zeta reflete a carga superficial de uma amostra e a sua distribuição pode ser influenciada por fatores como: a composição da partícula, o meio dispersante, e o pH e a força iônica da solução (DE MELO et al., 2010). Por meio da Figura 20, é possível perceber que houve uma diferença de inclinação entre as curvas da BSA e das micropartículas sintetizadas. Uma hipótese é que o entrecruzamento promove uma mudança de exposição das cargas (ligações aminas são formadas) assim uma menor variação de pH leva a uma maior diferença de potencial.

Figura 20 - Potencial zeta para a BSA (A) e para as partículas sintetizadas (B). Solução de BSA comercial em água ultrapura e suspensão das micropartículas ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) no mesmo solvente.



Fonte: do autor.

Ainda por essa figura, foi possível obter o pI (potencial de carga igual a zero) da albumina como 4,73 (bastante próximo a valores vistos em literatura) e das micropartículas como 4,06. Para ambos os materiais, o potencial zeta foi positivo abaixo do pI (+ 4 mV; + 30 mV, para BSA comercial e micropartículas, respectivamente) e negativo acima do pI (- 40 mV para ambos os materiais) (FIGURA 20).

Por serem compostos mais básicos ( $pK_a$  acima de 8,8), os analitos em estudo tendem a se manter ionizados positivamente em meios ácidos. Dessa forma, uma melhor sorção é esperada em meios com pH acima do pI do material extrator (micropartículas carregadas negativamente) e abaixo do  $pK_a$  dos fármacos. Uma vez que a atração de cargas poderá favorecer a sorção.

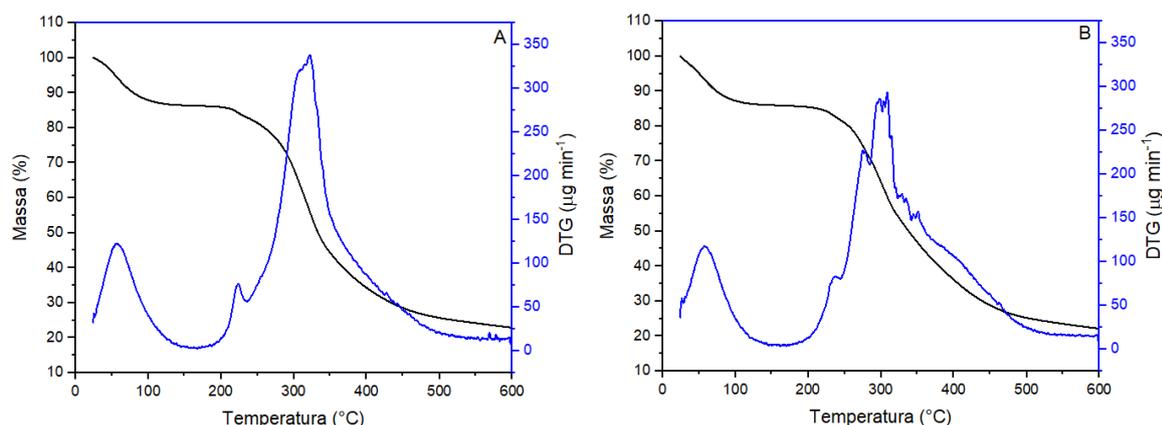
Outro ponto que pode ser observado é a diferença de cargas disponíveis. Segundo Mohanraj e colaboradores (2006) geralmente partículas que apresentam potencial zeta acima de  $|30| \text{ mV}$  têm estabilidade adequada em soluções (MOHANRAJ; CHEN, 2006). Para a BSA, os resultados indicaram baixa estabilidade em meios ácidos, já para as partículas, variação de carga próximas a citada pelos autores foram obtidas.

### 5.1.2.7 Análise termogravimétrica

A Figura 21 apresenta a DTG para a BSA comercial (A) e para a BSA entrecruzada (B), nela três eventos podem ser observados para ambos os materiais.

O primeiro deles, em aproximadamente 75°C, com uma perda de massa de 5,03% para a BSA e 4,25% para o material sintetizado; pode estar correlacionado à desidratação. Um segundo evento ocorre em aproximadamente 225°C, com perda de 15,88% e 15,09%; e um terceiro, e mais importante, ocorre em aproximadamente 315°C, com perdas de 42,80% e 38,51 % para BSA e micropartículas sintetizadas, respectivamente. Ambos podem ser correlacionados à desnaturação das proteínas e a decomposição térmica das mesmas. Além disso, ambas as amostras chegaram ao fim das análises com cerca de 22% da massa inicial.

Figura 21 - DTG ( $\mu\text{g min}^{-1}$ ) e massa (%) para BSA (A) e para BSA entrecruzada (B).



Fonte: do autor.

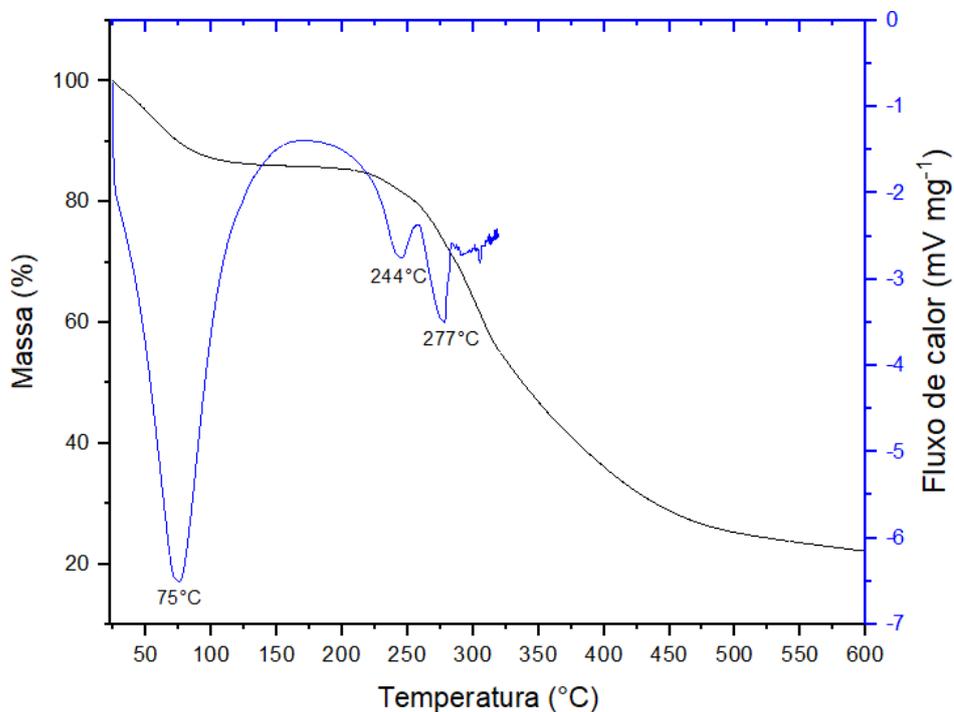
Fonseca e colaboradores (2017) alcançaram resultados semelhantes para nanopartículas de BSA obtidas por meio do processo de coacervação. Contudo, uma maior diferença entre a perda de massa de BSA e das nanopartículas não carregadas com fármaco em estudo pelos autores foi obtida: 38% e 60,7%; respectivamente, para um evento significativo em 312°C (FONSECA; KHALIL; MAINARDES, 2017).

### 5.1.2.8 Calorimetria exploratória diferencial

As análises de DSC foram realizadas para verificar a natureza dos eventos térmicos observados para as micropartículas de BSA. Através da Figura 22 pôde-se confirmar 3

eventos principais (TGA) e endotérmicos, observados pela inflexão da curva causada pela diminuição da temperatura da amostra (BERNAL et al., 2002).

Figura 22 - Decaimento de massa (TG) e DSC em função da temperatura.



Fonte: do autor.

Como descrito anteriormente, o evento com ápice em 75°C possivelmente está relacionado com a dessolvatação da amostra (perda de água e de etanol, utilizados na síntese), enquanto que os eventos seguintes apresentam perfis de inflexão relacionados à fusão seguida de decomposição térmica e podem estar ligados à desnaturação das proteínas. Dessa forma, pôde-se concluir que o material sintetizado é estável até temperaturas próximas de 220°C, mostrando possibilidade de uso em preparo de amostras e técnicas cromatográficas distintas.

#### 5.1.2.9 Análise da área superficial e porosidade

Como pôde ser observado na Tabela 7, valores similares de tamanho do poro e de pressão de saturação (a partir da qual não mais é observada a adsorção física independentemente da pressão aplicada) foram obtidos para os materiais em análise, contudo

o entrecruzamento proporcionou uma maior área superficial (cerca de 3,4 vezes) e um significativo aumento no volume dos poros formados nas micropartículas sintetizadas.

Tabela 7 – Valores de área superficial, volume e tamanho do poro e pressão de saturação.

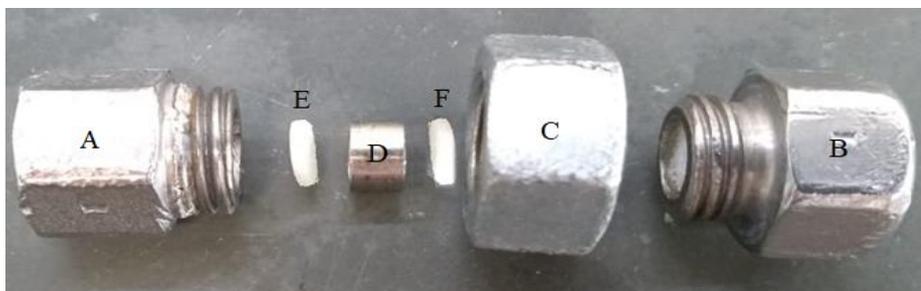
Materiais	Área superficial (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	Volume do poro (cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> )	Tamanho do poro (Å)	Pressão de saturação (kPa)
BSA	0,4110	0,000009	20,213	88,3614
Partículas sintetizadas	1,4112	0,000362	19,705	88,9200

Fonte: do autor.

### 5.1.2.10 Resistência ao fluxo

A partir de colunas de 4,6 mm (d.i.) foi possível montar uma coluna RAM que comportasse quantidades suficientes (cerca de 40 mg) do material sintetizado e que não apresentasse vazamentos quanto submetida à pressão do HPLC (FIGURA 23).

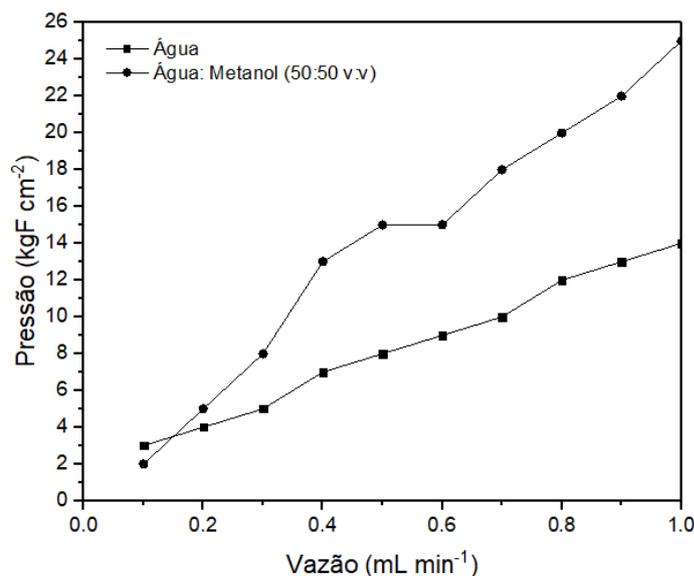
Figura 23- Coluna RAM confeccionada. A e B: saídas de colunas analítica;  
C: rosca comercial; D: compartimento para o material de extração;  
E e F: filtros poliméricos de SPE.



Fonte: do autor.

Água ultrapura e água ultrapura: metanol (50: 50 v:v) foram percolados pela coluna RAM e a pressão foi monitorada. Valores adequados foram observados (FIGURA 24), permitindo a interação da fase com o material extrator, mas sem prejudicar as análises e o sistema analítico. Contudo, para a fase móvel composta apenas por metanol foi percebido que após 15 min mantendo-se a vazão a 1 mL min<sup>-1</sup>, pressões bastante elevadas (cerca de 250 KgF cm<sup>-2</sup>) eram obtidas mesmo a baixas vazões (0,1 mL min<sup>-1</sup>). Ao se retirar o material da coluna RAM, verificou-se que o mesmo se encontrava com aspecto vitrificado, impossibilitando o fluxo de solvente.

Figura 24 - Resistência ao fluxo para as partículas de BSA.



Fonte: do autor.

Conclui-se com esses testes que fases aquosas e fases compostas por até 50% de solvente orgânico podem ser utilizadas na extração *online* (como fases de carregamento, eluição e limpeza) para a determinação dos analitos, enquanto que maiores porcentagens devem ser evitadas.

#### 5.1.2.11 Exclusão de proteínas

A potencialidade das micropartículas em serem utilizadas como RAM foi observada no teste de exclusão de proteínas utilizando a solução de BSA (FIGURA 25) e resultados próximos de 100% de exclusão foram obtidos para esse primeiro ensaio. A influência do pH na exclusão é mostrada na Tabela 8. Vale ressaltar que se optou por manter o mesmo tampão em toda a faixa para que não fosse inserida mais uma variável no sistema.

Tabela 8 – Exclusão de proteínas para uma solução de BSA (44 g L<sup>-1</sup>).

pH	Exclusão (%) ( $\bar{X}$ , n=3, $\pm$ DP)
2,00	91,9 $\pm$ 14,3
3,00	90,0 $\pm$ 1,9
4,00	88,0 $\pm$ 2,9
5,00	90,3 $\pm$ 3,5
6,00	106,6 $\pm$ 2,3
7,00	96,1 $\pm$ 2,6
8,00	99,8 $\pm$ 9,1

Fonte: do autor.

Nota: Tampão fosfato como fase móvel (0,3 mL min<sup>-1</sup>). DP: desvio padrão.

Como pôde ser observado na tabela acima, porcentagens mais baixas de exclusão foram obtidas para os pHs entre 2,00 e 5,00. Esses resultados podem ser explicados pela menor ionização das moléculas de BSA nessa faixa de pH, assim a repulsão eletrostática entre o RAM e a amostra é menor, prejudicando a exclusão de interferentes. A distribuição de cargas é evidenciada no estudo de potencial zeta (FIGURA 20). Além disso, o pI experimental das micropartículas foi aproximadamente 4,0; dessa forma além da baixa ionização da albumina presente na solução, o material sintetizado encontra-se predominantemente desprotonado. A menor repulsão eletrostática ajuda, mais uma vez, a explicar a menor exclusão entre os pHs avaliados. Ainda, o pH=5,00 está muito próximo do pI da albumina (EDRI; REGEV, 2008), levando também a menores taxas de exclusão.

Em pHs acima do pI da BSA e do material RAM (6,00 - 8,00), as proteínas estão com suas superfícies carregadas de modo negativo; portanto, além do impedimento físico, o mecanismo eletrostático se faz mais presente, auxiliando na exclusão (acima de 96%).

Por fim, estudos empregando a matriz não fortificada (*pool* plasma branco, n=3) foram realizados. Vazões distintas foram aplicadas uma vez que poderiam vir a ser utilizadas durante o método cromatográfico para a percolação da amostra através da coluna RAM e fases com pHs mais alcalinos foram escolhidas devido ao caráter mais básico dos fármacos em análise. Como pode ser visto na Tabela 9, resultados de exclusão superiores a 96% foram obtidos, mostrando a capacidade das micropartículas de excluir macromoléculas interferentes presentes na matriz (característica fundamental para serem utilizadas como RAM). Além disso, os resultados mostraram que o maior tempo requerido para a exclusão de interferentes foi 2,75 min, o que não compromete a frequência analítica do método a ser desenvolvido.

Tabela 9 – Porcentagem e tempo para exclusão de interferentes referente a injeção (50  $\mu$ L) de um *pool* (n=3) de plasma branco.

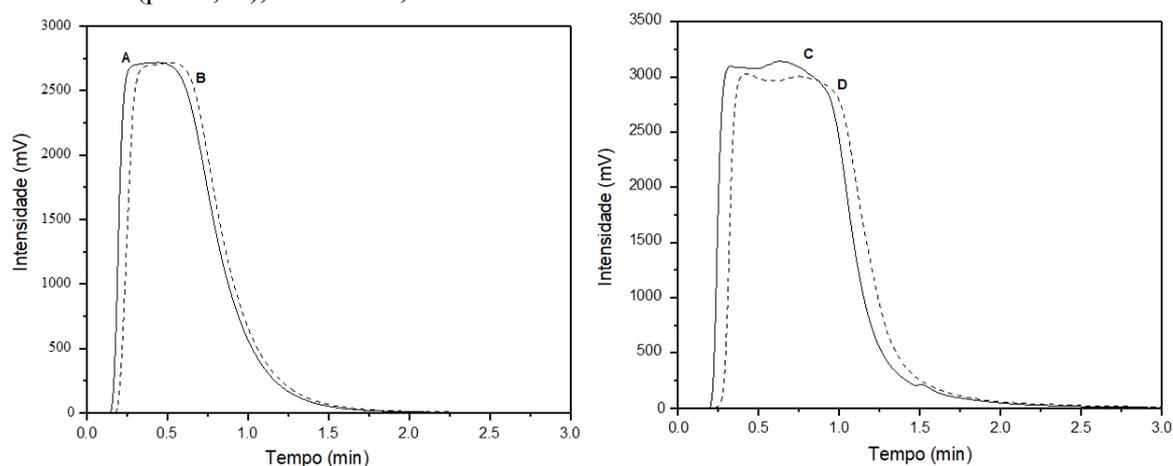
Fase de carregamento	Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	Tempo para exclusão (min)	Exclusão (%) ( $\bar{X}$ , n=3, $\pm$ DP)
Água ultrapura	0,3	2,75	104,9 $\pm$ 1,8
	0,5	2,00	101,4 $\pm$ 6,8
	0,8	1,30	100,6 $\pm$ 2,0
	1,0	1,00	100,1 $\pm$ 7,9
Tampão pH=6,00	0,3	2,50	96,8 $\pm$ 4,1
	0,5	1,75	106,2 $\pm$ 3,4
	0,8	1,30	108,8 $\pm$ 4,7
	1,0	1,00	102,1 $\pm$ 1,2
Tampão pH=7,00	0,3	2,50	106,3 $\pm$ 2,7
	0,5	1,75	96,0 $\pm$ 2,7
	0,8	1,30	98,4 $\pm$ 3,6
	1,0	1,00	106,5 $\pm$ 5,2
Tampão pH=8,00	0,3	2,50	109,8 $\pm$ 2,1
	0,5	1,75	103,5 $\pm$ 5,1
	0,8	1,20	105,3 $\pm$ 3,3
	1,0	1,00	100,7 $\pm$ 4,8

Fonte: do autor.

DP: desvio padrão.

Os sinais analíticos das diferentes de carregamento, quando comparados em mesma vazão, apresentaram perfis bastante próximos, como mostrado na Figura 25 a seguir.

Figura 25- Exclusão de proteínas a partir de solução de BSA (44 g L<sup>-1</sup>): em A, sinal sem a coluna RAM e, em B, com a coluna. Exclusão de interferentes presentes em matriz: em C, sinal sem a coluna RAM e em D, com a coluna. Fase móvel: tampão fosfato 10 mmol L<sup>-1</sup> (pH=7,00), vazão de 0,3 mL min<sup>-1</sup>.



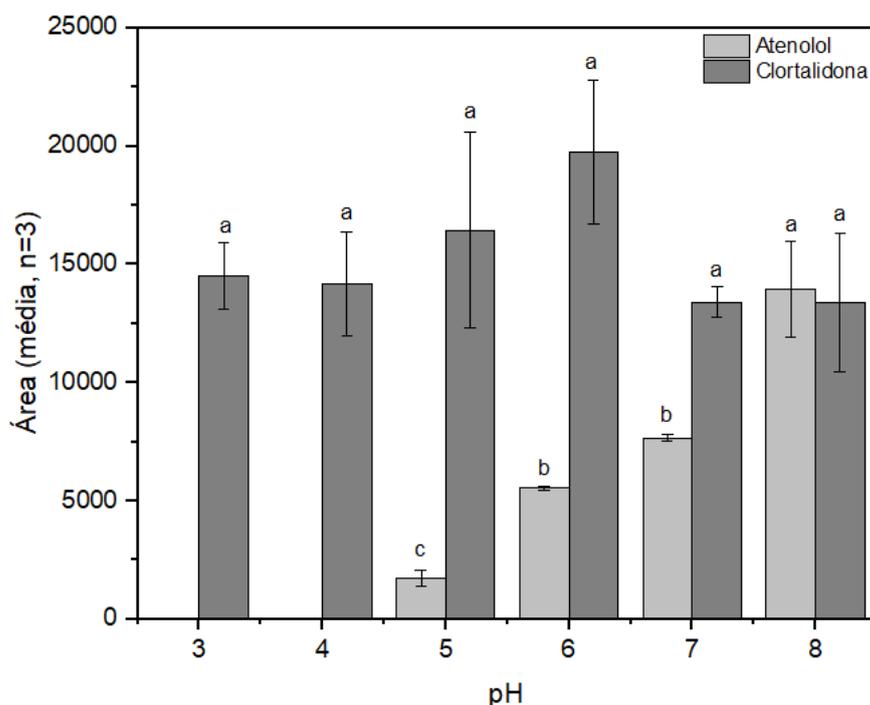
Fonte: do autor.

### 5.1.2.12 Estudo de pH para sorção dos analitos – atenolol e clortalidona

Em função do grupamento amida (pKa próximo de 9,0), atenolol e clortalidona apresentam comportamentos semelhantes quanto à presença de cargas. Em meios ácidos os fármacos estão majoritariamente protonados, e moléculas neutras começam a estar presentes em meios mais alcalinos.

Como pode ser visto na Figura 26, o atenolol não apresentou sinais distinguíveis do ruído quando a fase móvel foi composta por tampão com pH ajustado em 3,00 e em 4,00. Nesses pHs, a albumina encontra-se positivamente carregada, o que pode ter diminuído a sorção dos fármacos devido à repulsão eletrostática entre as cargas. Por outro lado, em pHs mais alcalinos (6,00; 7,00 e 8,00), a BSA está negativamente carregada, contribuindo para a adsorção dos analitos. Já clortalidona, apresentou média estatística igual para toda a faixa em estudo e uma hipótese para as menores áreas obtidas para o atenolol é um equilíbrio bastante rápido entre as micropartículas de BSA e o fármaco, o que poderia levar a perdas durante a etapa de carregamento adotada no estudo.

Figura 26 - Áreas obtidas para os fármacos no estudo de pH de sorção a 25°C.



Fonte: do autor.

Nota: As barras de erro representam o desvio padrão obtido entre as réplicas e letras minúsculas iguais para um mesmo analito referem-se a médias estatísticas iguais (Teste Scott-Knott ao nível de 0,05 de significância).

Vale dizer que os resíduos de teste de ANOVA apresentaram normalidade (valor-p de 0,1764 e de 0,1295) e homogeneidade de variância (valor-p de 0,0686 e de 0,3922; para

atenolol e clortalidona, respectivamente) ao nível de 5% de significância. Como em pH=7,00 foram obtidos valores de sorção adequados para ambos os analitos e menores desvios entre as réplicas, esse foi adotado para os testes de cinética e de isoterma de sorção das micropartículas sintetizadas. pHs maiores que 8,00 não foram avaliados devido aos estudos seguintes serem realizados com coluna analítica, que opera, sem prejuízos à sílica, em pHs de 2,00 a 8,00.

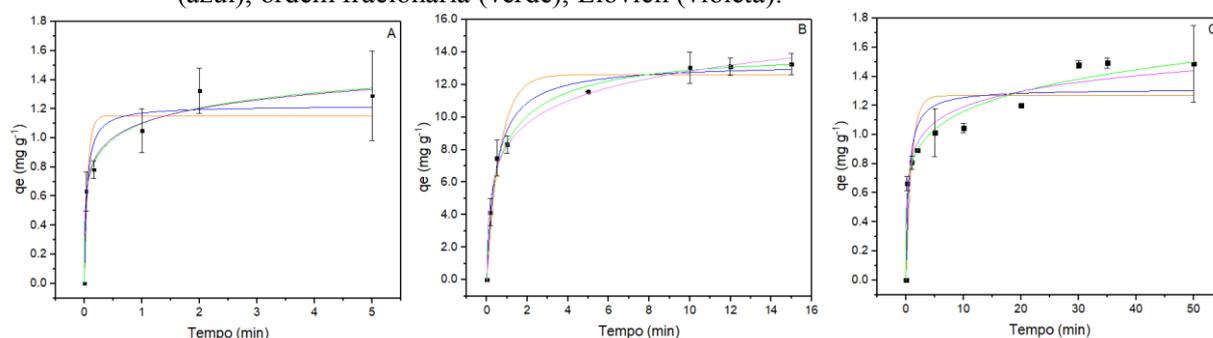
#### 5.1.2.13 Cinéticas de adsorção

Inicialmente a centrifugação (5 min) foi usada para separar o sobrenadante das micropartículas de BSA. No entanto, houve a sua substituição pelo sistema de filtração a vácuo uma vez que foram apresentadas evidências de que o equilíbrio entre as partículas de BSA e o atenolol era atingido rapidamente. Assim, surgiu a hipótese de que durante a centrifugação ainda ocorria interação significativa entre o material extrator e a solução do analito, podendo ser a causa de resultados previamente obtidos. Outros tempos e concentrações da solução de atenolol chegaram a ser estudados (1 mg L<sup>-1</sup> de 0,16 a 20,0 min; 20 mg L<sup>-1</sup> de 0,16 a 45,0 min; 50 mg L<sup>-1</sup> de 0,16 a 60 min e 100 mg L<sup>-1</sup> de 1 a 90 min), sem que fosse percebido variação de *qe* em função dos diferentes tempos de agitação.

Já com a metodologia final empregada (100 mg L<sup>-1</sup> de 0,03 a 5,00 min), foi possível observar uma tendência de crescimento de *qe* em função do tempo (FIGURA 27A) e através da curva obtida pôde-se notar que em 2 min teve-se estabelecido o equilíbrio entre atenolol e material extrator. Vale ressaltar que tempos maiores que 5 min não foram avaliados pois em ensaios anteriores não foi visto mudanças entre 5 e 90 min (já utilizando o sistema de filtração como modo de separação). Esse resultado mostra um equilíbrio bastante rápido entre o fármaco e as micropartículas de BSA, indicando a ocorrência de uma interação quase que instantânea e máxima.

Para o propranolol, foram avaliados tempos de 0,16 a 15,0 min e a Figura 27B mostra um equilíbrio atingido em 10 min. Já para a clortalidona, a metodologia empregada utilizou tempos de 0,16 a 50,0 min e foi observado um equilíbrio atingido em 30 min (FIGURA 27C), evidenciando uma interação mais lenta entre esse fármaco e as partículas de BSA. Na Figura 27 ainda é mostrado o ajuste dos modelos de cinética de adsorção: pseudoprimeira ordem, pseudosegunda ordem, ordem fracionária e Elovich para os três fármacos em estudo.

Figura 27 - Cinética de adsorção para atenolol (A), para propranolol (B) e para clortalidona (C) e ajuste com os modelos: pseudoprimeira ordem (laranja), pseudosegunda ordem (azul), ordem fracionária (verde), Elovich (violeta).



Fonte: do autor.

A partir da comparação do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e do  $f_{\text{error}}$  (TABELA 10), determinou-se qual dos modelos melhor representava as curvas de cinética obtidas.

Tabela 10- Ajustes de modelos para cinética de adsorção dos analitos.

Modelos Cinético	Equação	Parâmetro	Valor obtido		
			Atenolol	Propranolol	Clortalidona
Pseudoprimeira ordem	$q = q_e(1 - \exp^{-kt})$	$q_e$ (mg g <sup>-1</sup> )	1,1525	12,6126	1,2682
		$K_1$ (min <sup>-1</sup> )	16,9784	1,5285	1,0297
		$R^2$	0,8579	0,9543	0,6903
		$F_{\text{error}}$	0,0041	0,4145	0,5914
Pseudosegunda ordem	$q = \frac{k_2 q_e^2 t}{1 + k_2 q_e t}$	$q_e$ (mg g <sup>-1</sup> )	1,2209	13,3215	1,3142
		$K_2$ (g mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	19,0750	0,1676	1,6025
		$R^2$	0,9116	0,9866	0,8004
		$F_{\text{error}}$	0,0008	0,030913	0,6194
Ordem fracionária	$q = q_e \{1 - \exp[(-k_{AV}t)]^{n_{AV}}\}$	$q_e$ (mg g <sup>-1</sup> )	1,7400	13,6473	16,6731
		$K_{AV}$ (min <sup>-1</sup> )	1,0000	0,9219	$1,3743 \cdot 10^{-8}$
		$n_{AV}$	0,2424	0,4768	0,1665
		$R^2$	0,9784	0,9928	0,9744
		$F_{\text{error}}$	5,2898	45,7588	25,2399
Elovich	$q = k \ln(nkt)$	$K$ (g mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	6,9541	0,5016	6,47196
		$n$ (mg g <sup>-1</sup> )	308,1575	124,3216	34,3237
		$R^2$	0,9758	0,9934	0,9583
		$F_{\text{error}}$	$5,17 \cdot 10^{-12}$	$3,86 \cdot 10^{-8}$	0,4370
Difusão intrapartícula	$q = k_{id} \sqrt{t} + C$	$k_{id}$	3,7725	14,3011	0,3289

Fonte: do autor.

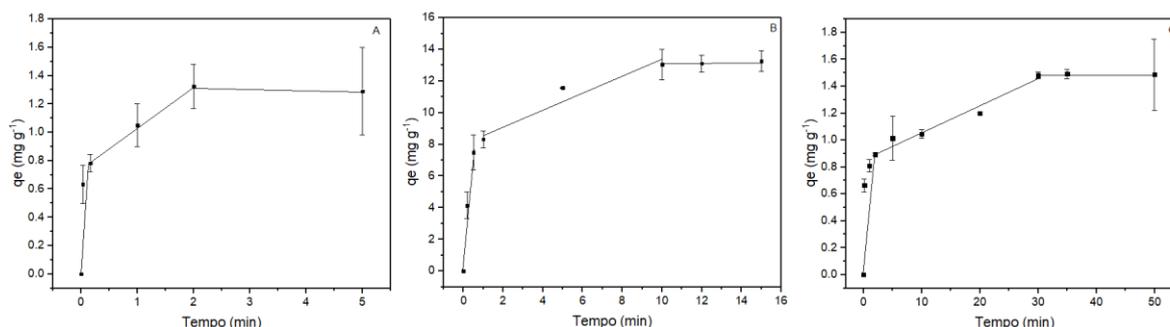
Nota: q: quantidade de analito adsorvido no tempo t;  $q_e$ : quantidade de analito adsorvido no equilíbrio por grama de material; t: tempo de contato;  $K_1$ : constante de velocidade de pseudoprimeira ordem;  $K_2$ : constante de velocidade de pseudosegunda ordem;  $K_{AV}$ : constante cinética de Avrami;  $n_{AV}$ : reação de ordem fracionária (Avrami) relacionada ao mecanismo de adsorção; K: constante do modelo de Elovich (relacionada à extensão da cobertura da superfície de quimissorção); n: taxa inicial de adsorção do modelo de Elovich;  $k_{id}$ : constante de velocidade da difusão intrapartícula. Dados obtidos por meio do *software* Origin®.

O modelo que melhor descreveu o comportamento dos analitos, principalmente devido a erros mais baixos ( $5,17 \cdot 10^{-12}$ ;  $5,86 \cdot 10^{-8}$  e 0,4370; para atenolol, propranolol e clortalidona, respectivamente) foi o de Elovich, que é atribuído sobretudo a sistemas heterogêneos que apresentam a quimissorção como mecanismo principal de sorção.

O modelo de ordem fracionária também obteve bons ajustes para atenolol e para clortalidona ( $R^2 = 0,9784$  e  $0,9744$ ), contudo erros maiores foram obtidos (5,2898 e 25,2399). Esse modelo leva em consideração possíveis mudanças em função da concentração inicial do analito e do tempo de contato entre solução/material extrator, mostrando que durante o contato atuam diferentes mecanismos de sorção.

Por fim, o ajuste de difusão intrapartícula possibilitou compreender a resistência do material sorvente à transferência de massa do sorvato (ROYER et al., 2009). Os resultados para os analitos referem-se a uma difusão multilinear constituída por três regiões (FIGURA 28). Na primeira, a sorção ocorre de forma rápida, mesmo ela sendo a etapa limitante para que o equilíbrio seja atingido ( $k_{id}$ ), assim, os analitos apresentam certa dificuldade para alcançar e adentrar os sítios do sorvente. A segunda se dá de forma bastante rápida, uma vez que a concentração dos fármacos ainda é alta. Já a terceira, se dá pelos poros menores até o estabelecimento do equilíbrio.

Figura 28- Modelo de difusão intrapartícula para atenolol (A), propranolol (B) e clortalidona (C).

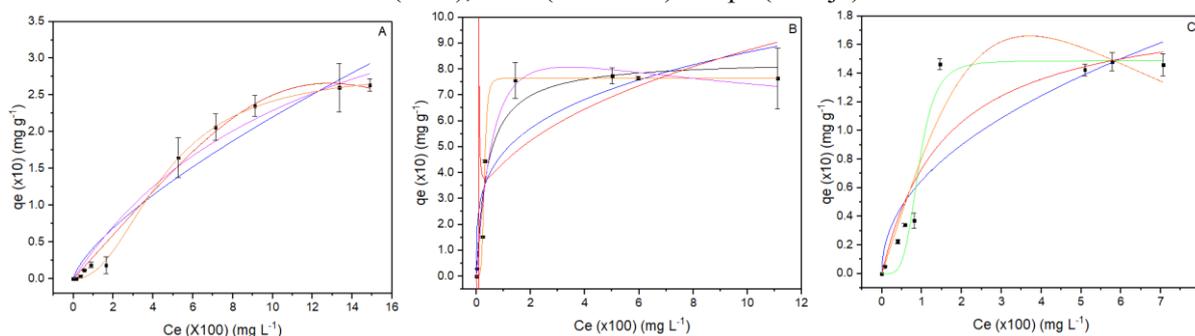


Fonte: do autor.

#### 5.1.2.14 Isotermas de adsorção

Para a construção das curvas de isotermas (análises a  $25^\circ\text{C}$ ) de adsorção foram necessários os cálculos do  $q_e$  ( $\text{mg}$  de analito  $\text{g}^{-1}$  de material extrator) e da concentração dos analitos presentes no sobrenadante no estado de equilíbrio ( $C_e$ ,  $\text{mg L}^{-1}$ ). As curvas foram então ajustadas nos modelos de Langmuir, Freundlich, Khan, Redlich-Peterson, Toth e Sips (FIGURA 29) e os parâmetros obtidos para cada um deles são apresentados na Tabela 11.

Figura 29 - Isotermas de adsorção para atenolol (A), propranolol (B) e clortalidona (C). Ajuste com os diferentes modelos: Langmuir (preto), Freundlich (azul), Khan (verde), Redlich-Peterson (roxo), Toth (vermelho) e Sips (laranja).



Fonte: do autor.

Como pôde ser observado, uma taxa considerável de extração ( $q_e$  próximo a 26 mg g<sup>-1</sup>) foi obtida para o atenolol, mesmo esse sendo o analito que apresenta baixa interação com a albumina plasmática (FIGURA 29A). O propranolol,  $\beta$ -bloqueador com alta taxa de ligação a proteínas, apresentou  $q_e$  mais elevado que o primeiro fármaco (próximo a 76 mg g<sup>-1</sup>) em situação de equilíbrio (FIGURA 29B). Por outro lado, o estudo da clortalidona (que também apresenta alta taxa de ligação albumina) resultou em  $q_e$  de 15 mg g<sup>-1</sup> (FIGURA 29C), evidenciando que o mecanismo de interação biológica não é o único que rege a ligação entre os analitos e as micropartículas de BSA sintetizadas. Em condições fisiológicas os fármacos se ligam a sítios específicos da BSA (MCELNAY; D'ARCY, 1983); após o entrecruzamento e a adição de NaBH<sub>4</sub> houveram mudanças na conformação proteica, o que pôde ter permitido a sorção adequada de atenolol nas partículas sintetizadas.

Tabela 11 - Ajustes de modelos para isoterma de adsorção dos analitos.

Modelo	Equação	Parâmetro	Valor obtido		
			Atenolol	Propranolol	Clortalidona
Langmuir	$q_e = \frac{q_s K_L C_e}{1 + b C_e}$	qs (mg g <sup>-1</sup> )	5,0971	8,3727	1,8969
		K <sub>L</sub> (min L <sup>-1</sup> )	0,0815	2,4949	0,6310
		R <sup>2</sup>	0,9732	0,9443	0,8605
		F <sub>error</sub>	0,1086	0,1128	0,0151
Freundlich	$q_e = K_F C_e^{1/n_F}$	K <sub>F</sub> (mg g <sup>-1</sup> ) (mg L <sup>-1</sup> )	0,4209	4,7806	0,6515
		n <sub>F</sub>	1,3919	3,8846	2,1453
		R <sup>2</sup>	0,9482	0,8169	0,8254
		F <sub>error</sub>	0,1016	0,2403	0,0108
Sips	$q_e = \frac{q_s K_s C_e^{1/n_s}}{1 + b C_e^{1/n_s}}$	qs (mg g <sup>-1</sup> )	2,8364	7,6485	1,4880
		K <sub>S</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	0,0331	672,4402	1,4155
		n <sub>s</sub>	2,2411	5,2468	4,4573
		R <sup>2</sup>	0,9978	0,9984	0,9541
Redlich-Peterson	$q_e = \frac{K_R C_e}{1 + a_R C_e^g}$ onde 0 ≤ g ≤ 1	K <sub>R</sub> (g L <sup>-1</sup> )	0,4160	14,7602	1,1969
		a <sub>R</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	0,0815	1,2121	0,6310
		G	1,0000	1,0000	1,0000
		R <sup>2</sup>	0,9732	0,9581	0,8373
Khan	$q_e = \frac{q_s b_K C_e}{(1 + b_K C_e)^{a_K}}$	F <sub>error</sub>	0,1163	0,0500	0,0165
		qs (mg g <sup>-1</sup> )	4,9349	12,5604	3,3199
		a <sub>K</sub> (L mg <sup>-1</sup> )	3,2452	1,1919	2,1023
		b <sub>K</sub>	0,0607	1,1752	0,4769
Toth	$q_e = \frac{K_T C_e}{(a_K + C_e)^{1/t}}$	R <sup>2</sup>	0,9907	0,9651	0,9094
		F <sub>error</sub>	0,0623	0,0500	0,0271
		K <sub>T</sub> (mg g <sup>-1</sup> )	2506,9572	3,5908	14,6651
		a <sub>T</sub> (L mg <sup>-1</sup> )	8361,3237	-0,1804	17,1412
		t <sub>t</sub>	0,3103	1,5796	0,4769
		R <sup>2</sup>	0,9907	0,6954	0,8943
		F <sub>error</sub>	0,0628	2,7251	0,0272

Nota:  $q_e$ : quantidade adsorvida no equilíbrio por grama de material;  $q_s$ : capacidade de saturação teórica;  $K_L$ : constante de afinidade de Langmuir;  $C_e$ : concentração do analito no equilíbrio;  $K_F$  e  $n_F$ : constante e expoente do modelo de Freundlich;  $K_s$  e  $n_s$ : constante e expoente do modelo de Sips;  $a_K$  e  $b_K$ : constante e expoente do modelo de Khan;  $K_R$  e  $a_R$ : constante e expoente do modelo Redlich-Peterson;  $K_T$  e  $a_T$ : constantes do modelo de Toth;  $t_t$ : expoente do modelo de Toth.

Fonte: do autor.

O modelo de Sips ajustou os resultados com R<sup>2</sup> adequados (0,9978; 0,9984 e 0,9541) e com baixos resultados de F<sub>error</sub> (0,0118; 0,0426 e 0,0442; para atenolol, propranolol e clortalidona, respectivamente) e, por ser um modelo intermediário entre Langmuir e Freundlich, diz que o material extrator responde de forma distinta de acordo com a concentração do analito em solução, reafirmando a característica de heterogeneidade do material predita pela cinética de adsorção de Elovich. Os modelos de Khan e de Toth também ajustaram de forma adequada a isoterma do atenolol e ambos, assim como o de Sips, propõem adsorção em materiais heterogêneos, sendo o de Khan inclusive, aplicado para compostos aromáticos (LIU; LIU, 2008).

## 5.2 PARTE 2: EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA *ONLINE*: ATENOLOL, CLORTALIDONA E HIDROCLOROTIAZIDA

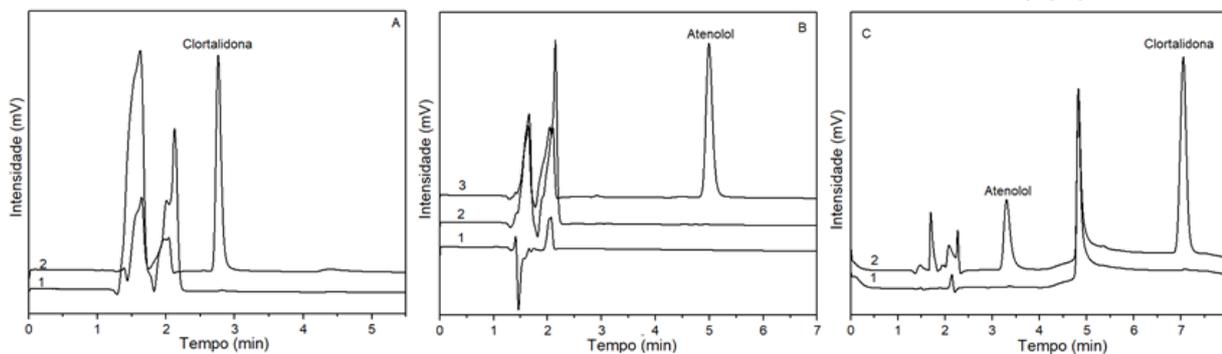
A seguir serão descritos os resultados alcançados com a primeira aplicação proposta para as micropartículas de BSA: a SPE *online* com a técnica de *column switching*.

### 5.2.1 Estudos de fase móvel

Inicialmente água ultrapura: acetonitrila (85:15 e 70:30 v:v) foi avaliada como fase de separação. Mesmo com bons resultados de área de pico para a clortalidona, o atenolol não apresentou sinal analítico distinguível do ruído. Dessa forma, fases com tampão fosfato 10 mmol L<sup>-1</sup> (pH=7,00) em proporções distintas com acetonitrila e com metanol (85:15, 80:20 e 70:30 aquoso: orgânico v:v) foram estudadas conforme visto em literatura.

A fase de maior proporção orgânica (70:30 v:v) não foi capaz de separar de forma eficiente o atenolol do pico de injeção de solvente (FIGURA 30A). Por outro lado, a fase com maior porcentagem aquosa (85:15 v:v) proporcionou a separação do atenolol, com TR (n=3) de 3,80 min; contudo, mesmo após 28 min de análise ainda não se havia obtido o pico referente à clortalidona (FIGURA 30B). Levando em consideração que frequência analítica seria bastante prejudicada, outras duas proporções: 75:25 e 80:20 v:v foram estudadas. Mais uma vez não houve a separação do atenolol e a clortalidona apresentou TR (n=2) de 5,00 e de 9,12 min, respectivamente. Por fim, para obter uma separação adequada dos dois fármacos e uma melhor frequência analítica, optou-se por utilizar duas proporções diferentes de tampão fosfato: acetonitrila 85:15 (FM1) e 70:30 (FM2) v:v. As fases foram trocadas de modo isocrático ao longo da análise para a determinação dos analitos e também para o acondicionamento da coluna cromatográfica (FIGURA 30C). Acetonitrila (viscosidade de 0,34 cP) foi escolhida por proporcionar pressões mais baixas no sistema. Fases que contém metanol (0,55 cP) tendem a apresentar maiores pressões.

Figura 30 - Perfil cromatográfico para os analitos com diferentes fases de separação. Em A: atenolol (1) e clortalidona (2) usando a fase tampão fosfato: ACN (70:30 v:v); em B: água ultrapura (1), clortalidona (2) e atenolol (3) usando a fase tampão fosfato: ACN (85:15 v:v) e, em C: solução contendo atenolol e clortalidona e usando as fases tampão fosfato: ACN (85:15 e 70:30 v:v). Soluções preparadas em água ultrapura a  $10 \text{ mg L}^{-1}$ .



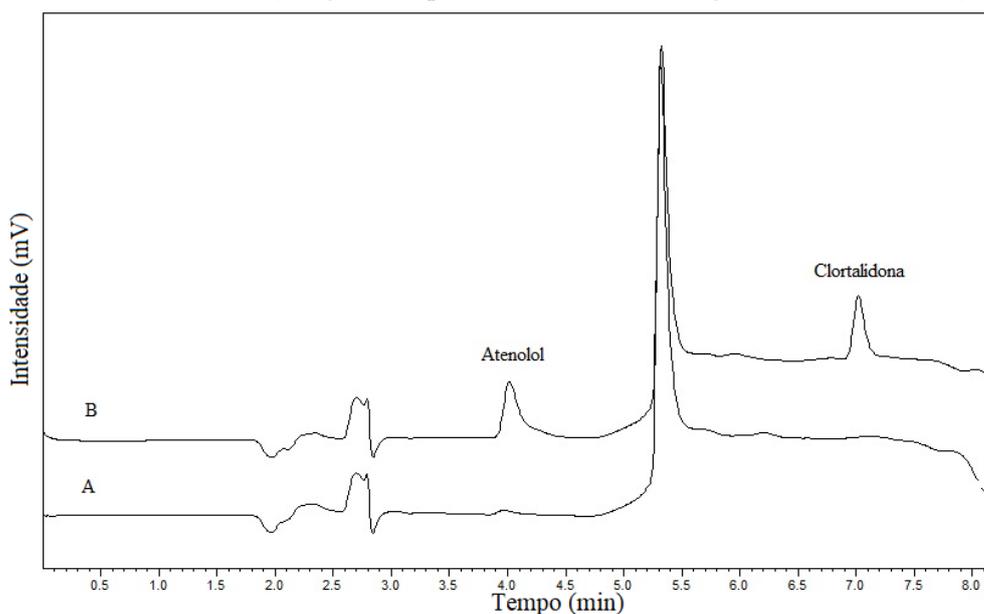
Fonte: do autor.

Nota: *Loop* de  $10 \mu\text{L}$  e vazão de fase de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . ACN = acetonitrila. pH do tampão ajustado em 7,00.

Como pôde ser observado na figura acima, quando há a mudança isocrática de fase móvel o cromatograma apresenta um sinal referente a este evento. Portanto, avaliou-se o tempo para a mudança de FM1 para FM2 e, posteriormente, de FM2 para FM1 (recondicionamento da coluna), para que o sinal obtido não interferisse nos picos dos analitos. Com a separação otimizada, atenolol e clortalidona apresentaram TR de 3,77 e 6,37 min. FM1 foi impulsionada pelo sistema até 2,30 min, sendo seguida por FM2 até 6,20 min e em 8,00 min a análise era encerrada.

O passo seguinte foi verificar a capacidade extrativa das micropartículas de BSA quando  $50 \mu\text{L}$  de soluções aquosas ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) eram injetadas no sistema de *column switching* (FIGURA 1). Inicialmente as seguintes condições foram adotadas: 0,3 min de carregamento dos analitos por meio da coluna RAM (para que os mesmos fossem retidos no material extrator, enquanto que os interferentes eram direcionados para um descarte); 0,5 min de eluição (fase móvel carregando os analitos retidos na coluna RAM para a coluna de separação); e forno cromatográfico (no qual estavam as duas colunas) operando a  $25^\circ\text{C}$ . O cromatograma resultante é mostrado na Figura 31 e como pode ser visto, o material foi capaz de extrair os analitos em solução preparada em água ultrapura.

Figura 31 - Cromatogramas obtidos para o branco (A) e para solução fortificada com os analitos (B). Água ultrapura como fase de carregamento ( $1 \text{ mL min}^{-1}$ ).

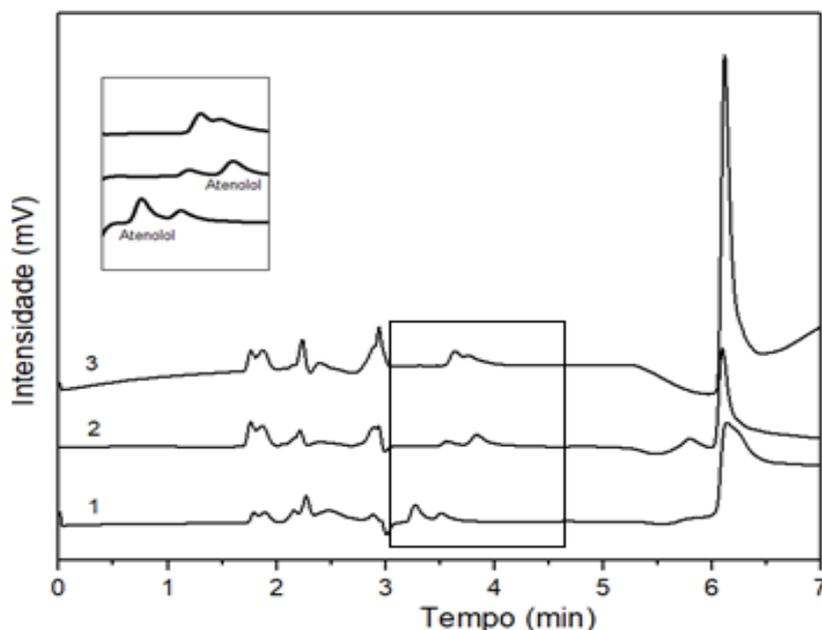


Fonte: do autor.

Plasma fortificado também foi analisado para se verificar o comportamento das micropartículas e do método frente à matriz. Vale ressaltar que a injeção direta da amostra biológica foi possível devido aos resultados de exclusão de interferentes (seção 5.1.2.11), assim as proteínas são direcionadas para um descarte, enquanto que os analitos ficam retidos no material extrator. E os resultados mostraram a segunda característica fundamental do RAM: capacidade de extração de analitos de baixa massa molecular de meios complexos.

A reavaliação do pH da FM1 foi realizada devido a presença de interferentes da matriz próximos ao TR do atenolol. Com pH ajustado em 6,00 e em 8,00, uma separação adequada atenolol/interferente foi observada, ao contrário do que foi obtido para o pH=7,00 (FIGURA 32). Dessa forma, tampão fosfato com pH=8,00 foi escolhido para dar continuidade aos estudos por fornecer maiores áreas em relação ao pH=6,00 (cerca de 8,0%).

Figura 32 – Separação do atenolol empregando como fase móvel tampão com pH=8,00 (1); tampão com pH=6,00 (2) e tampão com pH=7,00 (3): acetonitrila (85:15 v:v).



Fonte: do autor.

Nota: Quadro mostra um zoom na separação do atenolol de interferentes. Loop de 100  $\mu$ L.

### 5.2.2 Estudos de carregamento e de eluição

O estudo de tempo de viragem da válvula de seis pórticos da posição de carregamento para a de eluição (FIGURA 1) e da volta à primeira posição também foi realizado com plasma fortificado ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) e com  $1 \text{ mL min}^{-1}$  como fluxo das fases.

Mantendo-se a eluição por 0,5 min, a variação do tempo de carregamento (0,5 a 1,3 min) não causou influência significativa nas áreas de pico do atenolol ( $n=3$ ). Contudo, áreas mais baixas foram obtidas para a clortalidona a partir de 1,1 min (TABELA 12). Tempos prolongados de carregamento tendem a direcionar os analitos para o descarte, assim os mesmos não são eluídos à coluna para a separação. Por apresentar melhores resultados, 0,7 min foi mantido como tempo para o carregamento dos analitos por meio da coluna RAM.

Os tempos de eluição avaliados (0,3 a 0,8 min) proporcionaram resultados semelhantes ( $n=3$ ) para o atenolol. Já para a clortalidona houve aumento da área nas diferentes condições, com concomitante aumento da pressão da coluna RAM (TABELA 12). Essa observação levou à hipótese de que as diferenças nas áreas poderiam também ser atribuídas à pressão, pois maiores pressões podem permitir melhor interação entre o analito e o material extrator.

Tabela 12 - Estudos de tempo de carregamento e de eluição.

Tempo (min)		Pressão inicial (kgF cm <sup>-2</sup> )		Área ( $\bar{X}$ , n=3) ± DP	
Carregamento	Eluição	Coluna analítica	Coluna RAM	Atenolol	Clortalidona
0,5	0,5	76	192	24965,3 ± 1323,2	19439,5 ± 1244,1
0,7	0,5	77	205	28908,7 ± 289,1	20949,5 ± 2555,8
0,9	0,5	77	220	24892,7 ± 1070,4	15709,0 ± 267,1
1,1	0,5	77	212	24511,7 ± 1764,8	12669,0 ± 1254,2
1,3	0,5	77	155	24129,0 ± 1013,4	11119,7 ± 578,2
0,5	0,3	89	95	22639,7 ± 1969,7	6954,0 ± 674,5
0,5	0,4	88	143	25394,3 ± 939,6	8793,7 ± 1204,7
0,5	0,5	88	210	24839,3 ± 322,9	8545,5 ± 478,6
0,5	0,6	87	234	20386,7 ± 2161,0	10290,0 ± 1389,2
0,5	0,7	86	250	21506,0 ± 903,3	13481,3 ± 876,3
0,5	0,8	86	250	21250,3 ± 2443,8	16963,0 ± 3307,8

Fonte: do autor.

A limpeza da coluna RAM foi realizada, pois pressões acima de 100 kgF começam a inviabilizar às análises. Para garantir melhor confiabilidade, foram adicionados ao método um PI (a hidroclorotiazida) e uma fase de limpeza para a coluna de extração (FM3), composta por água ultrapura: acetonitrila (60:40 v:v), vale dizer que maiores frações orgânicas não foram estudadas devido aos resultados expostos na seção 5.1.2.10. O padrão interno corrige flutuações do preparo de amostras, de efeito da matriz e de leituras instrumentais, enquanto que a fase de limpeza ajuda a eliminar interferentes e analitos que ficaram retidos no material extrator após a etapa de eluição. Ao final, a hidroclorotiazida (TR = 6,0 min) pôde ser determinada juntamente com o atenolol e com a clortalidona seguindo as condições descritas na Tabela 13 abaixo.

Tabela 13 - Eventos para o sistema de *column switching*.

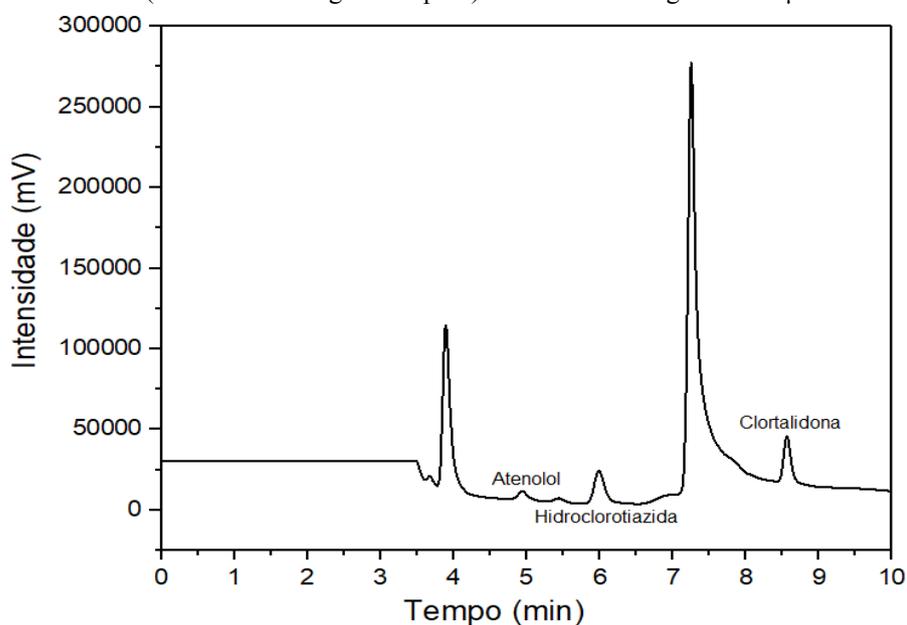
Tempo (min)	Fases	Eventos
0,00 - 0,70	Bomba A: FM1	Condicionamento coluna analítica
	Bomba B: água ultrapura	Carregamento analitos
0,71 - 1,20	Bomba A: FM1	Eluição dos analitos
	Bomba B: água ultrapura	Direcionada ao descarte
1,21 - 2,50	Bomba A: FM1	Separação dos analitos
	Bomba B: água ultrapura	Limpeza da coluna extratora
2,51 - 4,20	Bomba A: FM1	Separação dos analitos
	Bomba B: FM3	Limpeza da coluna extratora
4,21 - 5,50	Bomba A: FM2	Separação dos analitos
	Bomba B: FM3	Limpeza da coluna extratora
5,51 - 7,60	Bomba A: FM2	Separação dos analitos
	Bomba B: água ultrapura	Recondicionamento coluna extratora
7,61 - 9,70	Bomba A: FM1	Recondicionamento coluna analítica
	Bomba B: água ultrapura	Recondicionamento coluna extratora

Fonte: do autor.

### 5.2.3 Diluição do plasma

Mesmo com a adição da fase de limpeza, a pressão da coluna RAM continuou aumentando ao longo das análises. Portanto, estudos de diluição do plasma em água ultrapura foram realizados na tentativa de diminuir os interferentes da matriz. Embora tenha apresentado áreas inferiores (redução de cerca de 40%) para ambos os analitos, a diluição 1:1 (plasma: água ultrapura v:v) foi adotada objetivando-se a preservação das colunas e o perfil cromatográfico resultante é mostrado na Figura 33 abaixo.

Figura 33 - Cromatograma de plasma fortificado após a adição do padrão interno. Plasma (diluído 1:1 em água ultrapura) fortificado a  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ .  $50 \text{ }\mu\text{L}$ .



Fonte: do autor.

Com o uso do PI as áreas relativas apresentaram DPR% inferiores a 15% para as réplicas. No entanto, maiores áreas absolutas eram obtidas em função do aumento da pressão que ocorria ao longo das análises.

### 5.2.4 Temperatura do forno analítico

Um estudo inicial da temperatura do forno do HPLC foi realizado com os fármacos preparados em água ultrapura ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) e analisados sem o sistema de *column switching*. Os resultados, em termos de resolução, mostraram que em todas as temperaturas avaliadas

houve separação adequada (resolução  $\geq 2$ ; FDA, 2013) para atenolol e clortalidona (TABELA 14). Ainda sobre esse estudo, não foram observadas diferenças estatística (teste Tukey, valor-p  $\geq 0,05$ ) entre as diferentes temperaturas para as áreas obtidas para atenolol (cerca de 250000 u.a) e para clortalidona (600000 u.a).

Tabela 14 - Resolução obtida para atenolol e clortalidona em diferentes temperaturas. Água ultrapura fortificada com os analitos.

Temperatura (°C)	Resolução ( $\bar{X} \pm DP$ , n=3)	
	Atenolol	Clortalidona
25	2,7705 $\pm$ 0,2736	13,2195 $\pm$ 1,1072
30	2,0591 $\pm$ 0,0962	15,468 $\pm$ 0,8691
35	2,6980 $\pm$ 0,2010	16,0695 $\pm$ 0,9961
40	2,4780 $\pm$ 0,3278	13,7090 $\pm$ 1,0453
45	2,5267 $\pm$ 0,2887	13,8840 $\pm$ 0,0608
50	2,2380 $\pm$ 0,1174	13,4313 $\pm$ 0,0748

Fonte: do autor.

Nota: a resolução do atenolol foi calculada em comparação a sinais interferentes.

Adicionalmente, foram realizados estudos da temperatura para a extração dos analitos de plasma fortificado (1 mg L<sup>-1</sup>) e melhor separação de atenolol de sinais interferentes empregando a técnica de *column switching*. Os resultados podem ser vistos na Tabela 15.

Tabela 15- Resolução obtida para atenolol e clortalidona em diferentes temperaturas. Plasma fortificado com os analitos

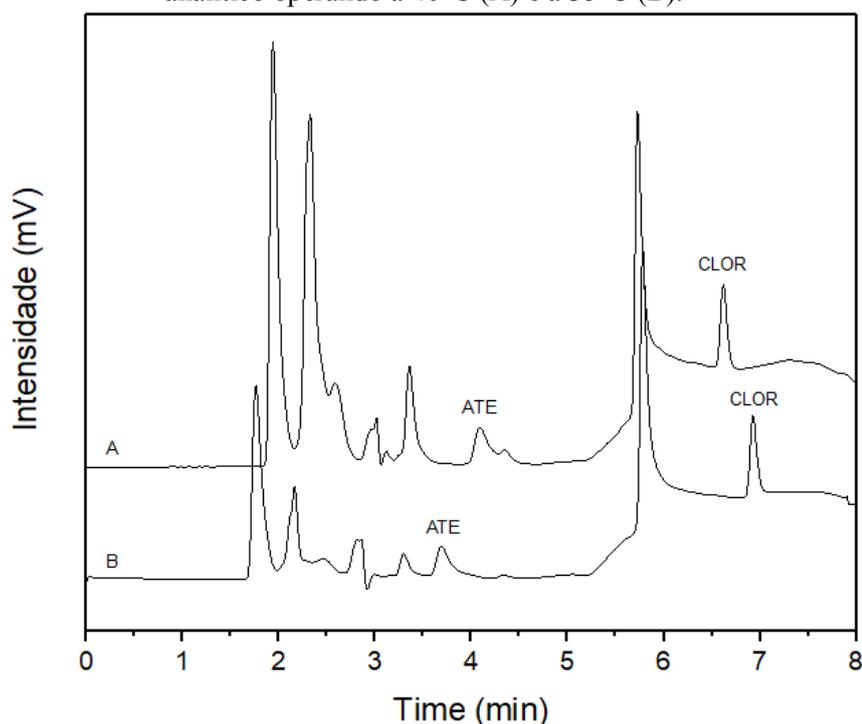
Temperatura (°C)	Resolução ( $\bar{X} \pm DP$ , n=3)	
	Atenolol	Clortalidona
25	-	19,0305 $\pm$ 0,1598
30	1,1323 $\pm$ 0,1390	11,9747 $\pm$ 0,2617
35	2,1250 $\pm$ 0,0288	14,3250 $\pm$ 1,0869
40	2,2067 $\pm$ 0,0704	14,1587 $\pm$ 0,1719
45	1,4197 $\pm$ 0,1414	15,1867 $\pm$ 1,1953
50	0,6083 $\pm$ 0,0208	13,2397 $\pm$ 0,08997

Nota: a resolução do atenolol foi calculada em comparação a sinais interferentes, já a da clortalidona, em relação ao pico do atenolol.

Fonte: do autor.

Como pôde ser visto, resoluções adequadas foram obtidas apenas com a coluna RAM mantida em 35 e em 40°C. Contudo operando-se em 40°C, outros interferentes da matriz se aproximavam (em termos de TR) dos analitos (FIGURA 34). Além disso, áreas de pico adequadas para atenolol (50000 u.a) e para clortalidona (85000 u.a) foram obtidas em 35°C, sendo esta condição escolhida para dar continuidade aos testes de extração dos fármacos da amostra biológica.

Figura 34 – Cromatogramas obtidos para plasma fortificado (5 mg L<sup>-1</sup>) com atenolol (ATE) e clortalidona (CLOR) com o forno analítico operando a 40°C (A) e a 35°C (B).



Fonte: do autor.

### 5.2.5 Conclusões parte 2

Ao longo de todas as etapas para a otimização da metodologia empregando a técnica de *column switching*, duas dificuldades principais e limitantes para o método em desenvolvimento foram encontradas: o aumento da pressão nas colunas e os limites de detecção bastante elevados e inadequados para a determinação dos fármacos.

Após injeções de plasma branco e de plasma fortificado (1 e 5 mg L<sup>-1</sup>), o sistema apresentou aumentos significativos de pressão para a coluna analítica (de 84 para 215 kgF) e para coluna RAM (de 46 para 250 kgF), além de DPR% cada vez mais altos entre as réplicas de uma mesma análise. Mesmo com medidas para evitar esses problemas (diluição do plasma, fase de limpeza durante as análises e limpeza periódica da coluna RAM), eles persistiram durante todo o desenvolvimento do método. A coluna extratora também foi desempacotada e empacotada com materiais recém-sintetizados, mas esta não foi uma solução de duração efetiva.

O outro aspecto referiu-se aos altos limites de detecção que o método foi capaz de fornecer utilizando a extração *online* e o detector UV-VIS, como pôde ser visto na Figura 33 baixa intensidade de picos foram obtidas para plasma fortificado em altas concentrações, o que não permitiria uma faixa de trabalho que abrangesse a janela terapêutica dos analitos.

Nesse cenário, os estudos com o *column switching* foram por hora interrompidos e uma nova metodologia de aplicação das micropartículas de BSA foi proposta: a extração *off-line* por fibras de SPME e a determinação de fármacos por LC-MS/MS (PARTE 3 do trabalho). Vale ressaltar que resultados promissores foram retirados dessa primeira metodologia proposta: a capacidade extrativa das partículas de BSA tanto de fármacos de baixa quanto de alta taxa de ligação a proteínas plasmáticas, e a possibilidade de vários ciclos de análise sem perda de eficiência das mesmas (94 ciclos de injeção de plasma, contando brancos e fortificados com ou sem diluição, sem tratamento prévio).

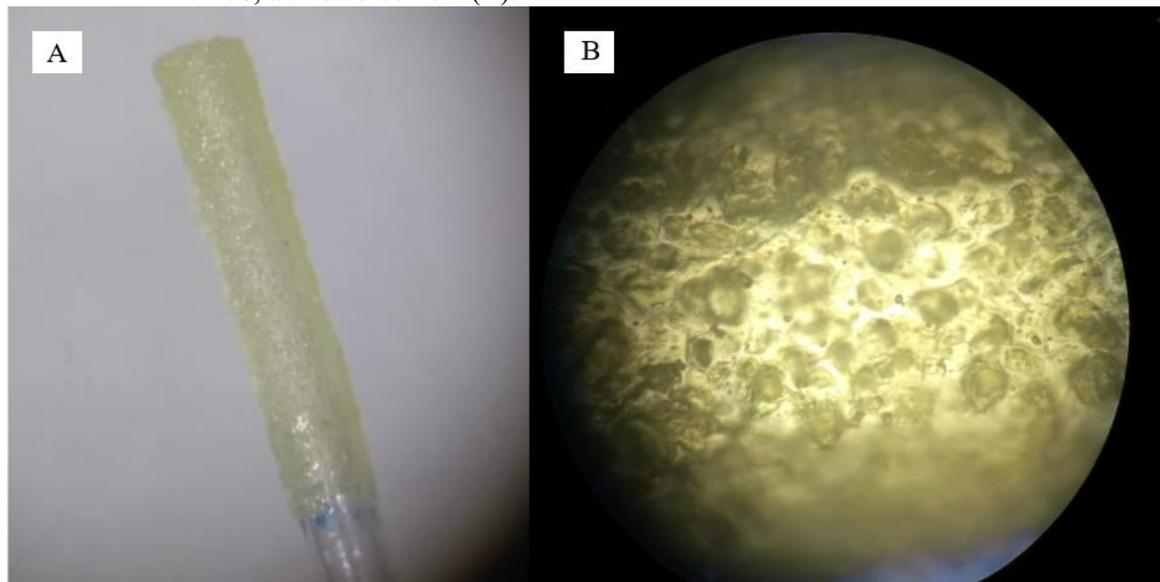
### 5.3 PARTE 3 - FIBRA DE SPME: ATENOLOL, PROPRANOLOL, METOPROLOL E NADOLOL

Nessa parte do projeto serão discutidos os resultados obtidos com o processo de extração *off-line* e determinação dos analitos por UHPLC-MS/MS.

#### 5.3.1 Confeção das fibras de micropartículas de BSA

As fibras confeccionadas (seção 4.5.1) mostraram-se estáveis após a adesão das micropartículas de BSA sobre a camada de cola epóxi sem apresentar perda de material extrator (FIGURA 35A). Complementarmente, o capilar extrator foi analisado com auxílio do microscópio invertido (Nikon® Eclipse TS100) com lente de aumento de 20 vezes, permitindo a observação das partículas aderidas (FIGURA 35B). Vale ressaltar ainda que pouca quantidade de material sintetizado foi usada na confeção das fibras (aproximadamente 4 mg/fibra), obtendo-se assim, um baixo custo final por unidade (estimado em R\$ 0,20), considerando os reagentes de síntese e o capilar de vidro.

Figura 35 – Extremidade da fibra recoberta com as partículas (A) e visão da fibra em microscópio invertido, aumento de 20X (B).



Fonte: do autor.

### 5.3.2 Padrão de fragmentação dos analitos

Em relação aos analitos, houveram mudanças da **Parte 2** para a **Parte 3** do trabalho e isso foi devido à não fragmentação da clortalidona com intensidade suficiente para atingir o limite de quantificação aceitável (que abrangesse a concentração esperada do fármaco em plasma). Diversas fases (metanol: formiato de amônio (pH=4,16), acetonitrila: formiato de amônio (pH=4,16), metanol com 0,1% de ácido fórmico: formiato de amônio (pH=4,16) com 0,1% de ácido fórmico, e metanol: acetato de amônio (pH=7,50), em proporções de 95: 5, 90: 10, 85:15, 70: 30, 60: 40 e 55: 45 orgânico: aquoso v:v) foram testadas, além de diferentes vazões (0,45; 0,40; 0,30 e 0,20 mL min<sup>-1</sup>) e volumes de injeção (10, 20 e 50 µL). A mudança veio então com o uso de dois outros β-bloqueadores: o metoprolol e o propranolol, que também são comumente usados para tratamentos de hipertensão e apresentarem taxas distintas de ligação a proteínas plasmáticas (12% para o MET e > 90% para o PROP). Para essa nova metodologia, o NAD foi utilizado como PI, devido à maior semelhança com os analitos em estudo.

O espectrômetro de massas operou com ionização por ESI em modo positivo de acordo com o que foi visto em literatura (GONZALEZ et al., 2010; KHUROO et al., 2008; MAZZARINO; TORRE, 2008; SANTOS et al., 2015; TRENHOLM; VANDERFORD;

SNYDER, 2009) e três otimizações referentes a fragmentação dos fármacos foram realizadas:

- a) *Scan*: no intervalo de 200 a 350  $m/z$  (intervalo que abrangeu as massas esperadas para os precursores);
- b) SIM (*Selected ion monitoring*): realizado para verificar os fragmentos de maior abundância a partir de uma massa específica. O fragmento de maior intensidade foi selecionado para a quantificação do analito, enquanto que outros dois foram utilizados para a qualificação do mesmo (ver Tabela 3);
- c) MRM (*Multiple reaction monitoring*): reação de fragmentação em que o íon precursor é selecionado no primeiro quadrupolo e os fragmentos monitorados são selecionados no terceiro.

### 5.3.3 Otimização do preparo de amostras

Os ensaios para a otimização foram realizados com o plasma fortificado com atenolol (menor taxa de ligação a proteínas plasmáticas) na concentração de 1 mg L<sup>-1</sup> em triplicata, sem a presença do PI e com o uso da coluna ACE<sup>®</sup> 5 C18, (150 x 4,6 mm, 5 µm). A temperatura foi mantida a 25°C e as variáveis do preparo foram avaliadas individualmente (na ordem apresentada nos tópicos a seguir). 10 µL do eluato foram injetados no UHPLC.

A análise de variância e o teste de Scott-Knott (ao nível de 5% de significância) foram utilizados para comparar as respostas (áreas relativas) entre as condições testadas em cada ensaio de otimização. Vale ressaltar que os testes de Shapiro Wilk e de Barlett foram utilizados e, para todos os ensaios, foram obtidos valores-p > 0,08, mostrando que os resíduos apresentaram normalidade e a homogeneidade de variância.

#### 5.3.3.1 Composição da fase de eluição

Metanol foi escolhido para compor a fase de eluição devido a sua afinidade com os analitos (KIKIC et al., 2006) e a porcentagem desse solvente foi avaliada com o intuito de se recuperar o máximo dos fármacos previamente extraídos. Os resultados (FIGURA 36A) mostraram que a fase 70:30 (metanol: água ultrapura v:v) proporcionou melhores áreas

quanto comparada a fase 50:50 (v:v). Porções mais orgânicas e fases contendo ácido fórmico não foram avaliadas, pois causavam prejuízos às fibras (principalmente em relação à cola epóxi). Dessa forma, metanol: água ultrapura (70:30 v:v) foi escolhido para dar prosseguimento às otimizações.

### 5.3.3.2 Tempo de extração e tempo de eluição

O tempo de contato entre fibra e matriz é uma variável importante para a eficiência do processo extrativo. Um baixo tempo de interação pode não permitir extrações adequadas, enquanto que tempos elevados prejudicam a frequência da análise, tornando o processo moroso. Os resultados obtidos (FIGURA 36B) mostraram que em 10 min obteve-se as melhores áreas para ATE, com média estatística não diferente ao tempo de 15 min. Esse resultado está de acordo com os que foram obtidos nos ensaios de cinética do atenolol (2 min) e do propranolol (10 min para o equilíbrio). Assim, 10 min foi escolhido para prosseguir as análises por manter a maior capacidade extrativa em um menor tempo de preparo.

Já para a eluição, deve-se proporcionar um tempo suficiente para garantir a recuperação dos analitos. Como é possível observar na Figura 36C, não houve diferença significativa entre as médias do menor e do maior tempo em análise, mostrando que 2 min já foram suficientes para a dessorção do fármaco do material extrator.

### 5.3.3.3 Diluição do plasma

A diluição do plasma é um recurso muitas vezes adotado em sistemas de LC-MS por atribuir vantagens ao método, entre elas: diminuir a intensidade de alguns interferentes da matriz, minimizando o efeito de supressão iônica; e diminuir o volume de matriz biológica utilizado por análise (SANTOS et al., 2016). As áreas obtidas para ATE após a extração de plasma fortificado sem diluição e de plasma fortificado e diluído em água ultrapura (1:0,25; 1:0,5 e 1:1 v:v) foram comparadas e melhores resultados foram obtidos com a diluição 1:0,25 (plasma: água), sendo esta escolhida para dar continuidade. A partir da diluição 1:1 (v:v) um decréscimo (cerca de 67%) do sinal cromatográfico foi observado (FIGURA 36D).

Para avaliar o efeito de *salting out*, que pode melhorar a disponibilidade do analito para o material extrator, a matriz foi diluída (1:0,25 v:v) com NaCl (1, 10 ou 100 mmol L<sup>-1</sup>)

e os resultados mostraram que a concentração de  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  proporcionava menores desvios entre as réplicas (FIGURA 36E) e, por isso, foi escolhido para a continuação das análises.

Vale ressaltar que o pH da amostra não foi avaliado devido aos resultados obtidos na seção 5.1.2.12. As micropartículas de BSA apresentaram mesma capacidade sortiva entre os pHs 6,00 e 8,00; faixa em que se encontra o plasma humano.

#### 5.3.3.4 Volume de eluição e volume de extração

Para a fase de eluição foram avaliados 200 e 400  $\mu\text{L}$  devido a disponibilidade de *inserts* de vidro que comportassem as fibras e volumes maiores não foram testados para que não se perdesse a característica de microextração. Como observado na Figura 36F, não houve diferença estatística entre as médias obtidas. Dessa forma, o volume de 200  $\mu\text{L}$  foi adotado por gerar um menor consumo de solvente durante a etapa de preparo das amostras.

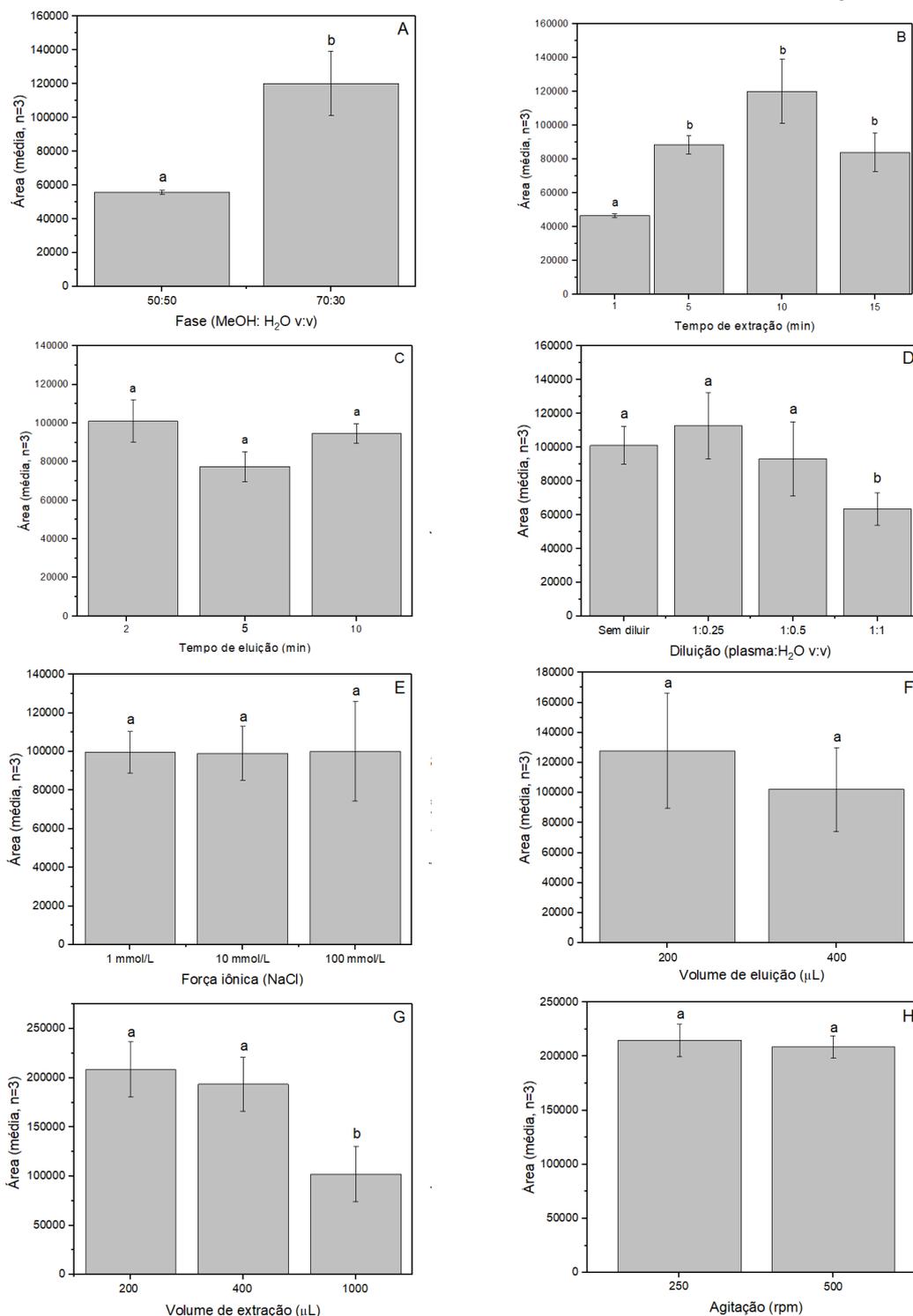
Para avaliar o volume de extração, o plasma foi colocado em *inserts* (200 e 400  $\mu\text{L}$ ) ou em *vials* (1000  $\mu\text{L}$ ) de vidro. Volumes menores não foram avaliados pela necessidade de se manter uma altura de matriz adequada para a fibra, enquanto que aqueles maiores que 1000  $\mu\text{L}$  seriam inviáveis para as características da técnica empregada. Como resultado, 200 e 400  $\mu\text{L}$  levaram a áreas estatisticamente iguais para ATE (FIGURA 36G); enquanto que 1000  $\mu\text{L}$  proporcionou menores áreas. Uma hipótese é a maior proximidade da fibra com o plasma, talvez nos *vials* o contato entre a matriz e a parte extratora da fibra fosse por vezes perdido durante a agitação. Assim, para manter os melhores resultados e permitir que menores volumes de amostras de pacientes fossem coletados, 200  $\mu\text{L}$  foi escolhido para dar prosseguimento a otimização. Vale dizer que a quantidade de plasma empregado teoricamente não deveria interferir na capacidade extrativa da SPME, uma vez que o volume da amostra é considerado muito maior que o volume de recobrimento da fibra (VALENTE; AUGUSTO, 2000).

#### 5.3.3.5 Velocidade de agitação

A agitação foi avaliada uma vez que a mesma pode melhorar a transferência de massa entre o plasma que contém os analitos e as micropartículas de BSA. Os resultados obtidos para as velocidades de agitação analisadas (250 e 500 rpm) são mostrados na Figura 36H. Vale ressaltar que velocidades mais baixas não permitiram a agitação eficiente das fibras,

enquanto que mais altas dificultavam a permanência do capilar de vidro nos *vials* durante as etapas do preparo. As áreas obtidas não apresentaram diferenças significativas. Portanto, 250 rpm foi mantido por permitir uma agitação mais uniforme das fibras contidas nos *vials*.

Figura 36 – Variáveis otimizadas. A: fase de eluição; B e C: tempo de extração e de eluição, D: diluição; E: força iônica, F e G: volume extração e de eluição, e H: velocidade de agitação.



Fonte: do autor.

Nota: letras minúsculas iguais para uma mesma variável indicam médias estatísticas iguais (valor-p  $\geq$  0,05).

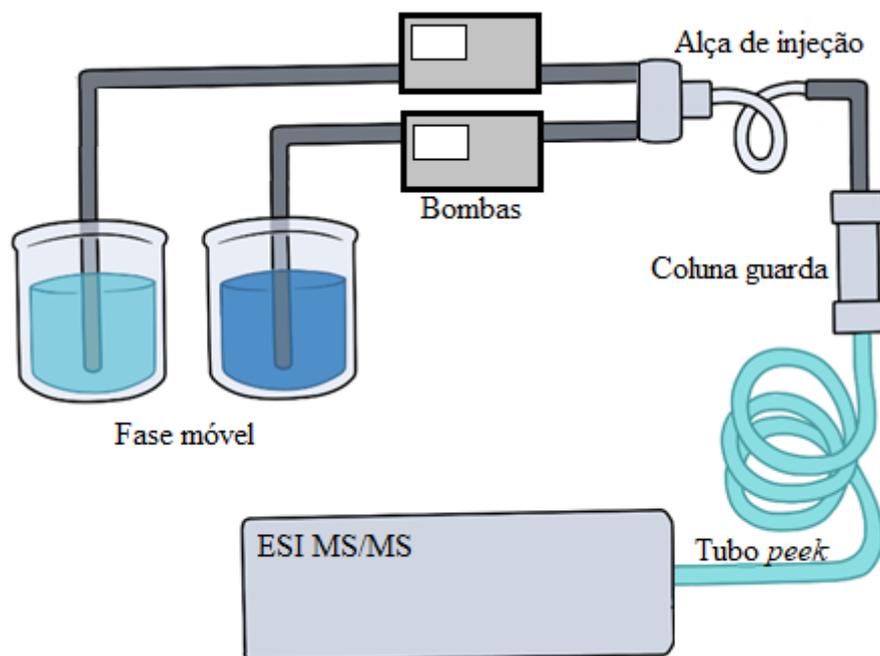
### 5.3.4 Sistema cromatográfico empregado e otimização do método

Para se alcançar a configuração final do sistema de UHPLC- MS/MS (seção 4.5.3), foram realizadas avaliações em termos de composição e de vazão da fase móvel e do uso ou não de coluna de separação. Para os estudos iniciais, soluções dos analitos foram preparadas em metanol na concentração baixa de cada um deles (100, 80 e 15  $\mu\text{g L}^{-1}$ , para ATE, MET e PROP) e 10  $\mu\text{L}$  foi injetado no sistema com a fase móvel metanol: ácido fórmico 0,1%, 90:10 v:v a uma vazão de 0,45  $\text{mL min}^{-1}$  conforme visto em literatura (SANTOS et al., 2015), utilizando uma coluna de separação C18 (ACE<sup>®</sup>, 150 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ).

Em relação à separação dos fármacos, colunas de fase reversa C18 foram avaliadas: ACE<sup>®</sup> (150 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); Supelco<sup>®</sup> (150 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); Chromosphere<sup>®</sup> (150 x 4,6 mm, 3  $\mu\text{m}$ ); XTerra<sup>®</sup> (150 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); Acquity<sup>®</sup> (75 mm x 2,1 mm, 1,8  $\mu\text{m}$ ) e Macherey-Nagel<sup>®</sup> (250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ). Com as colunas de 150 mm não houve a separação dos analitos e do PI (TR próximos de 2,40 min), além da obtenção de picos ruidoso para ATE e para PROP. A co-eluição também foi vista na coluna de 75 mm, além da mesma proporcionar pressões mais elevadas para o sistema. Já com coluna de 250 mm, não foram observados sinais cromatográficos mesmo após 30 min de análise e, para não prejudicar a frequência analítica, seu uso foi descontinuado.

Como não houve separação efetiva dos fármacos, um estudo com plasma branco fortificado nas menores concentrações e injetado diretamente no espectrômetro de massas foi realizado, resultando em picos com tempo de permanência próximos de 0,13 min. Contudo, com o intuito de se aumentar o tempo de permanência dos analitos no sistema e para prevenir que resquícios de matriz (caso existentes) fossem diretamente direcionadas ao espectrômetro de massas, foram colocadas no sistema uma extensão de tubo *peek* (2,23 m, 0,25 mm de diâmetro interno) e uma pré-coluna (Acquity<sup>®</sup> C18, 2,1 mm x 5 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ ) conforme mostra a Figura 37.

Figura 37 - Esquema do sistema cromatográfico para as análises.



Fonte: do autor.

Metanol: ácido fórmico 0,1% em diferentes composições (95:05, 90:10, 80:20 e 70:30 v:v) foram avaliados como fase móvel. A fase 90:10 (v:v) proporcionou melhores resultados para os analitos, em termos de área e de perfil cromatográfico. Fases mais aquosas resultaram em quebras nos picos, enquanto que a fase 95:5 v:v levou a uma diminuição das áreas obtidas (cerca de 20%). Por fim, vazões de 0,20; 0,30; 0,45 e 0,6 mL min<sup>-1</sup> foram avaliadas. Fluxos menores resultaram em picos alargados e quebrados, enquanto que 0,6 mL min<sup>-1</sup> levou a áreas mais baixas (redução de aproximadamente 23%), possivelmente devido a uma menor ionização.

A configuração adotada soma vantagens ao sistema como o não uso de coluna analítica (maior simplicidade) e menor tempo de análise, tempos de permanências próximos de 0,42 min para todos os analitos (maior frequência analítica e menor uso de solventes). Vale ressaltar que não houveram aumentos de pressão que inviabilizassem a continuação dos estudos.

### 5.3.5 Comparação entre diferentes sínteses

Nas análises realizadas com fibras de três diferentes lotes, as áreas relativas dos analitos (atenolol, metoprolol e propranolol) apresentaram DPR% inferiores a 10%

(TABELA 16). Esses resultados indicam que houve uma uniformidade na síntese e que fibras de diferentes lotes podem ser empregadas no processo de preparo de amostras sem prejuízos ao método. Em relação às áreas absolutas, um DPR% mais alto já era esperado por se tratar de um procedimento *off-line* (TABELA 16).

Tabela 16 - Comparação entre diferentes lotes de fibras para a extração dos analitos.

<b>Analito</b>	<b>DPR% área absoluta</b>	<b>DPR% área relativa</b>
Atenolol (n = 3)	15,6 <sup>a</sup>	9,9 <sup>a</sup>
	12,1 <sup>b</sup>	3,5 <sup>b</sup>
	9,1 <sup>c</sup>	3,1 <sup>c</sup>
Metoprolol (n = 3)	22,3 <sup>a</sup>	8,3 <sup>a</sup>
	21,1 <sup>b</sup>	9,5 <sup>b</sup>
	19,2 <sup>c</sup>	8,4 <sup>c</sup>
Propranolol (n = 3)	17,1 <sup>a</sup>	8,7 <sup>a</sup>
	13,0 <sup>b</sup>	6,2 <sup>b</sup>
	18,7 <sup>c</sup>	9,5 <sup>c</sup>
Nadolol (n = 3)	17,7	-

Fonte: do autor.

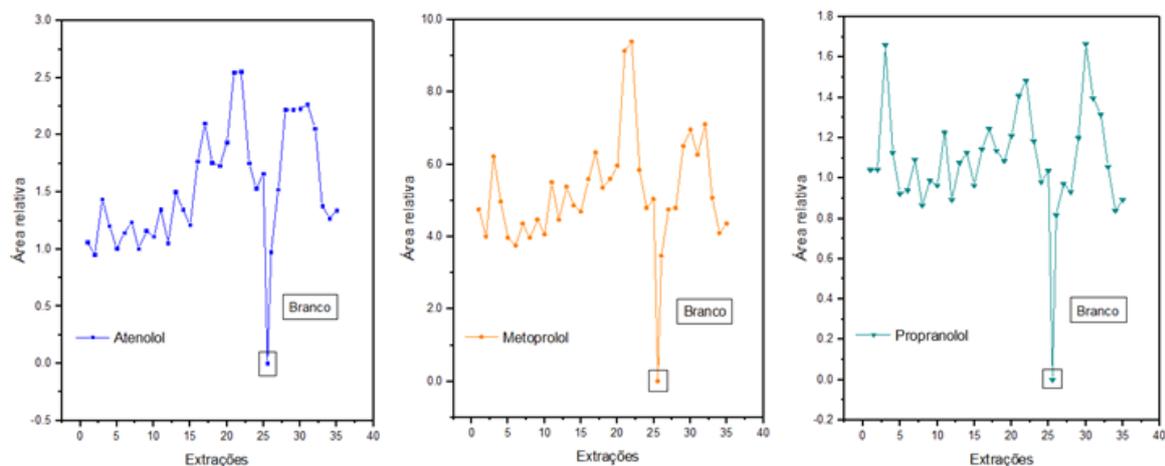
Nota: <sup>a</sup> concentração baixa; <sup>b</sup> concentração média e <sup>c</sup> concentração alta.

### 5.3.6 Reuso das fibras

Para o estudo de reuso das fibras, uma nova etapa no processo de preparo de amostras foi adicionada: a limpeza da fibra em água ultrapura por 30 s (sob agitação) entre a etapa de eluição de um ciclo e de extração do seguinte. Esse procedimento foi realizado para que o metanol remanescente nas micropartículas de BSA não interferisse de forma negativa na extração dos analitos do plasma em uma análise seguinte. 25 extrações sequenciais de plasma fortificado foram realizadas, seguidas pela análise de um plasma branco e por uma limpeza da fibra extratora em água ultrapura por 15 min (sob agitação).

Finalmente, mais 10 extrações de matriz dopada foram feitas, com a lavagem da fibra após 5<sup>a</sup> e o preparo de um branco ao final do processo. Os resultados, em termos de área relativa, são mostrados na Figura 38 a seguir.

Figura 38 - Área relativa para atenolol, metoprolol e propranolol nas diferentes extrações.



Fonte: do autor.

Como pôde ser observado, as áreas relativas mantiveram-se próximas entre si até a 15<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup> e 32<sup>a</sup> extrações para ATE, MET e PROP, respectivamente. Após essas análises, maiores desvios foram obtidos, sobretudo por um aumento nas áreas absolutas dos analitos, indicando o acúmulo de fármacos nas fibras após várias extrações.

Ainda na Figura 38, a extração do primeiro branco é identificada como zero para as áreas relativas e tal fato foi devido a não obtenção de sinal cromatográfico para o NAD. Contudo, os analitos apresentaram picos quantificáveis, o que reafirma o efeito de memória (acúmulo de fármacos não desorvidos na fibra) após 25 extrações seguidas. Os DPR% das áreas absolutas também foram avaliados e os resultados são mostrados na Tabela 17.

Tabela 17- Comparação entre as diferentes extrações sequenciais com uma mesma fibra.

<b>Analito</b>	<b>DPR% área absoluta</b>	<b>DPR% área relativa</b>
Atenolol (até 15 <sup>a</sup> análise)	20,6	13,8
Metoprolol (até 21 <sup>a</sup> análise)	30,3	16,2
(até 15 <sup>a</sup> análise)	18,6	14,8
Propranolol (até 32 <sup>a</sup> análise)	28,3	18,9
(até 15 <sup>a</sup> análise)	15,2	18,2
Nadolol (até 35 <sup>a</sup> análise)	28,3	-
(até 15 <sup>a</sup> análise)	19,9	-

Fonte: do autor.

Vale ressaltar que desvios mais altos para o PROP (área relativa, n=15) e para o NAD (área absoluta, n=15) foram devido a uma área mais baixa para o PI na terceira extração. Desconsiderando-se essa análise, são obtidos DPR% de 16, 2 e de 10, 1% para NAD e PROP, respectivamente. Esses resultados mostram que 15 extrações sequenciais são possíveis com uma mesma fibra utilizando a etapa de limpeza com água ultrapura (por 30s) entre elas.

### 5.3.7 Estabilidade

O estudo foi realizado considerando as possibilidades de armazenamento das amostras em rotinas de análise. Dessa forma, matriz fortificada foi deixada sobre a bancada ou congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$ ; a possibilidade do armazenamento do eluato (obtido após a etapa de dessorção dos analitos) em geladeira também foi verificada. Os resultados são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 - Dados sobre a estabilidade da matriz e do eluato.

Condição	DPR% ( $\bar{X}$ , n=3)			E% ( $\bar{X}$ , n=3)		
	ATE	MET	PROP	ATE	MET	PROP
Bancada	3,6 <sup>a</sup>	4,1 <sup>a</sup>	10,4 <sup>a</sup>	-15,5 <sup>a</sup>	-11,1 <sup>a</sup>	8,4 <sup>a</sup>
	11,3 <sup>b</sup>	1,2 <sup>b</sup>	4,6 <sup>b</sup>	-3,9 <sup>b</sup>	-13,2 <sup>b</sup>	-14,3 <sup>b</sup>
	7,8 <sup>c</sup>	5,0 <sup>c</sup>	11,0 <sup>c</sup>	6,8 <sup>c</sup>	7,7 <sup>c</sup>	-14,2 <sup>c</sup>
Freezer	13,7 <sup>a</sup>	6,1 <sup>a</sup>	16,7 <sup>a</sup>	-9,9 <sup>a</sup>	-14,5 <sup>a</sup>	-9,2 <sup>a</sup>
	4,0 <sup>b</sup>	13,1 <sup>b</sup>	10,6 <sup>b</sup>	-11,9 <sup>b</sup>	2,4 <sup>b</sup>	2,6 <sup>b</sup>
	7,8 <sup>c</sup>	5,2 <sup>c</sup>	7,9 <sup>c</sup>	-6,6 <sup>c</sup>	-2,4 <sup>c</sup>	7,3 <sup>c</sup>
Geladeira	8,4 <sup>a</sup>	10,0 <sup>a</sup>	9,9 <sup>a</sup>	8,6 <sup>a</sup>	-13,2 <sup>a</sup>	1,0 <sup>a</sup>
	8,5 <sup>b</sup>	2,3 <sup>b</sup>	8,9 <sup>b</sup>	4,8 <sup>b</sup>	10,6 <sup>b</sup>	3,0 <sup>b</sup>
	0,1 <sup>c</sup>	4,0 <sup>c</sup>	8,6 <sup>c</sup>	12,6 <sup>c</sup>	13,2 <sup>c</sup>	0,3 <sup>c</sup>

Fonte: do autor.

Nota: <sup>a</sup> concentração baixa, <sup>b</sup> concentração média e <sup>c</sup> concentração alta.

Segundo o guia de validação do FDA (2013), a amostra armazenada é considerada estável se apresenta exatidão de até 15% quando comparada com amostras recém preparadas. Como observado na tabela acima, o plasma pôde ser mantido a temperatura ambiente por até 4h (tempo suficiente para a extração de mais de 100 amostras) e a  $-20^{\circ}\text{C}$  por até 25 dias sem prejuízos ao mesmo. O eluato também se manteve estável a  $6^{\circ}\text{C}$ , proporcionando que o preparo das amostras fosse realizado no dia anterior a suas análises.

### 5.3.8 Validação analítica

Nos tópicos seguintes será discutida a validação analítica do método proposto.

### 5.3.8.1 Efeito Matriz

Esse estudo foi realizado para verificar a influência do plasma na determinação dos analitos. Água ultrapura foi usada por ser um solvente mais próximo da matriz em análise. Os coeficientes angulares das curvas construídas em cada um dos meios (solvente e matriz) e os valores- p do teste t de Student (5% de significância) são mostrados na Tabela 19. Além da comparação das médias, os testes de Shapiro Wilk e de Barlett foram aplicados evidenciando a normalidade e a homogeneidade de variância dos resíduos (valor-p > 0,31).

Tabela 19 – Comparação entre os coeficientes angulares das curvas em solvente e em matriz.

<b>Analito</b>	<b><math>\beta_1</math> em matriz (<math>\bar{X}</math>, n=3)</b>	<b><math>\beta_1</math> em solvente (<math>\bar{X}</math>, n=3)</b>	<b>Valor-p*</b>
ATE	0,0024 ± 0,00012	0,0017 ± 0,00030	0,0145
MET	0,00773 ± 0,00610	0,00803 ± 0,00127	0,7304
PROP	0,00837 ± 0,00055	0,00907 ± 0,00150	0,2912

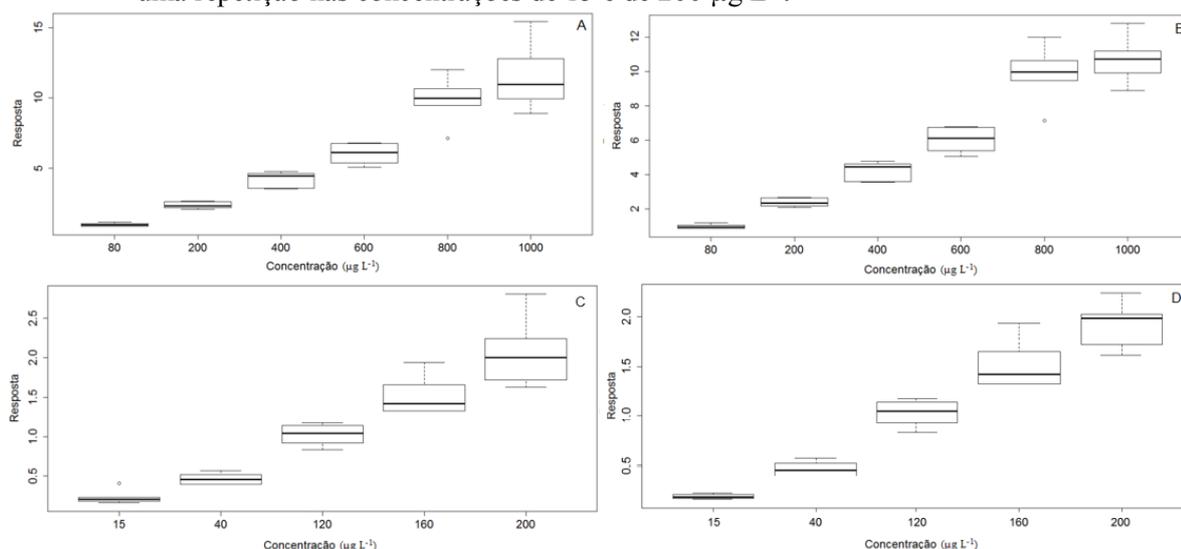
Fonte: do autor.

Os resultados indicam que a matriz não interfere de forma significativa na determinação de MET e de PROP (valor-p > 0,05). Por outro lado, diferenças estatisticamente significativas foram obtidas entre os coeficientes das curvas construídas para ATE (valor-p < 0,05). Sendo assim, a curva de calibração e os ensaios de validação foram realizados com plasma branco fortificado.

### 5.3.8.2 Linearidade e tratamento estatístico das curvas

As curvas de calibração foram construídas por meio das áreas relativas em função da concentração dos analitos. Para assegurar um DPR% adequado, foram desconsideradas umas das réplicas feitas (n=6) nas concentrações de 800 e de 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o MET e uma réplica nas concentrações de 15 e de 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o PROP. Os *boxplots* das áreas relativas obtidas para MET e PROP em função da concentração analisada são mostras na Figura 39 a seguir.

Figura 39- *Boxplots* dos dados para o MET antes (A) e depois (B) da retirada de uma repetição nas concentrações de 800 e de 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  e para o PROP antes (C) e após (D) a retirada de uma repetição nas concentrações de 15 e de 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ .



Fonte: do autor.

As curvas foram ajustadas utilizando-se a função *lm*, disponível no pacote *stats* (*software R*<sup>®</sup>) e, para todos os analitos, obtiveram-se curvas de regressão linear simples com coeficientes angulares ( $\beta_1$ ) significativos. A Tabela 20 apresenta a estimativa de cada parâmetro associado à curva, seus respectivos desvios-padrão, intervalos de confiança e sua significância (valor-p).

Tabela 20 - Estimativas dos parâmetros das curvas ajustadas, desvios padrão, intervalos de confiança e valores-p para cada um dos analitos.

Analito	Parâmetro	Estimativas	DP	L.I.	L.S.	Valor-p
ATE	$\beta_0$	0,0653	0,0638	-0,112	0,2427	0,3640
	$\beta_1$	0,0028	<0,0001	0,0025	0,0031	< 0,0001
MET	$\beta_0$	0,0430	0,3550	-0,9425	1,0285	0,9090
	$\beta_1$	0,0109	0,0008	0,0092	0,0125	< 0,0001
PROP	$\beta_0$	0,0517	0,0643	-0,1529	0,2563	0,4800
	$\beta_1$	0,0091	0,0005	0,0075	0,0107	0,0004

Fonte: do autor.

Nota: DP: desvio padrão; L.I.: limite inferior; L.S.: limite superior.

Ainda sobre os resultados obtidos nenhuma das pressuposições da análise de regressão (normalidade, independência e homocedasticidade de variância) foi violada para as curvas ajustadas (TABELA 21), visto que os valores-p não foram significativos ( $\leq 0,05$ ). Assim, as conclusões obtidas a partir das mesmas foram válidas. Observa-se também que todas as curvas foram significativas, como evidenciado pela ANAVA e apresentaram valores de coeficiente de correlação ( $r$ ) maiores que 0,99; conforme as exigências dos guias de validação para assegurar a linearidade do método.

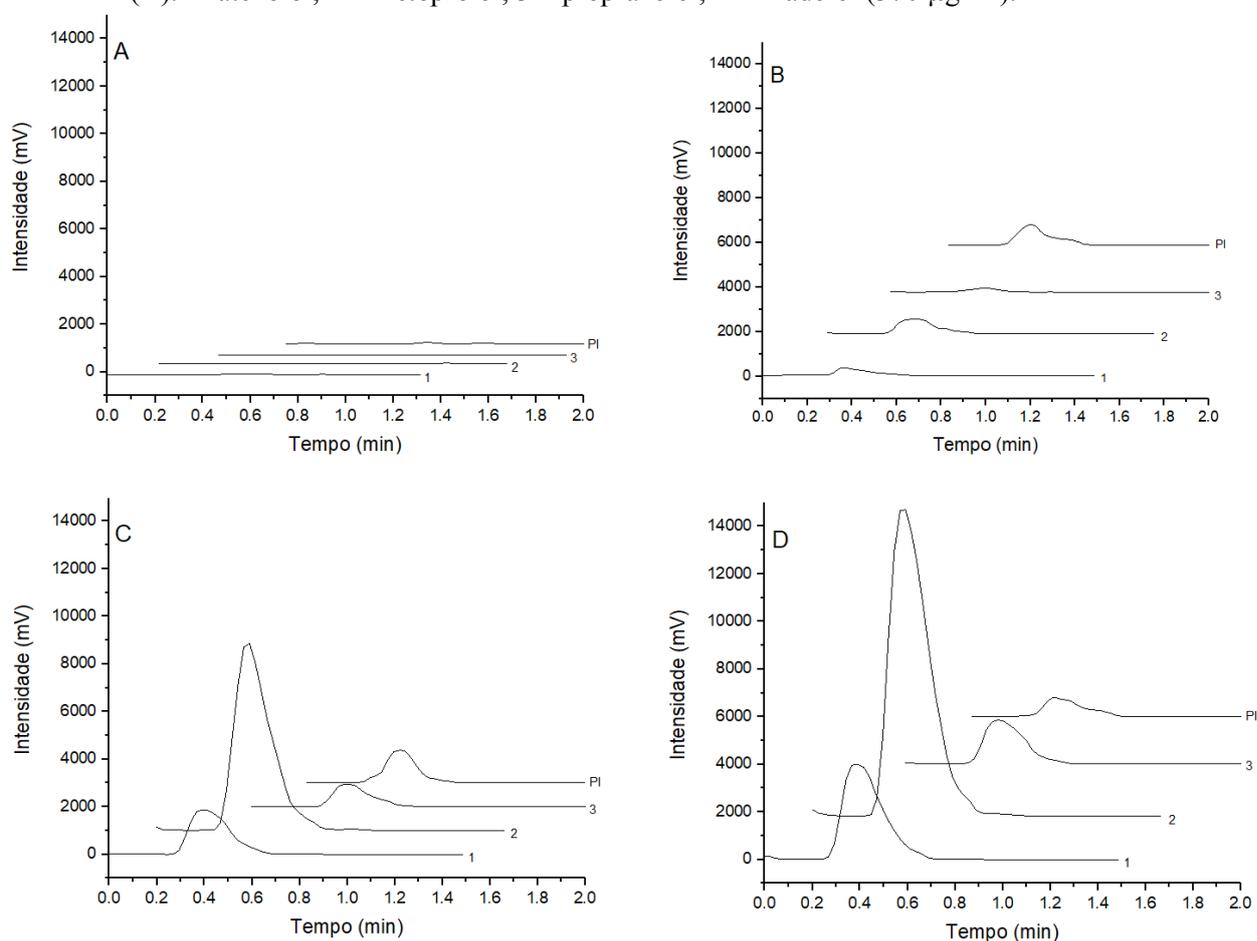
Tabela 21: Análise das pressuposições das curvas ajustadas.

Analito	Valor-p dos testes			r ajustado	Valor-p (teste F)
	Shapiro - Wilk	Box - Pearce	Breusch - Pagan		
ATE	0,9171	0,0589	0,7575	0,9970	< 0,0001
MET	0,8059	0,2053	0,2237	0,9928	< 0,0001
PROP	0,1111	0,4267	0,7694	0,9939	< 0,0004

Fonte: do autor.

Os cromatogramas referentes ao branco (plasma não fortificado) e aos pontos baixo, médio e alto após o processo de extração com as fibras são mostrados na Figura 40 a seguir.

Figura 40- Cromatogramas para plasma branco (A) e plasma fortificado nas concentrações baixa (100, 80, 15  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (B); média (C) (600, 600, 120  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e alta (1200, 100, 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (D). 1- atenolol; 2 – metoprolol; 3 – propranolol; PI – nadolol (370  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).



Fonte: do autor.

### 5.3.8.3 Precisão e exatidão

Para a precisão intra e inter dia, os desvios obtidos estiveram de acordo com que é predito pelos guias de validação (TABELA 22), obtendo-se valores de até 20% para as menores concentrações e de até 15% para as demais. Já para os resultados de exatidão intra e inter dia, valores de  $\pm 15\%$  foram obtidos para todos os ensaios. Esses resultados estão de acordo com os preditos pelos guias de validação e mostram que o método proposto fornece resultados confiáveis para a quantificação dos analitos.

Tabela 22 – Precisão e exatidão para os fármacos em estudo.

	<b>ATE</b>	<b>MET</b>	<b>PROP</b>
<b>DPR% dia 1 (<math>\bar{X}</math>, n = 5)</b>	18,45 <sup>a</sup>	14,14 <sup>a</sup>	13,80 <sup>a</sup>
	12,92 <sup>b</sup>	12,45 <sup>b</sup>	13,20 <sup>b</sup>
	14,53 <sup>c</sup>	13,60 <sup>c</sup>	12,94 <sup>c</sup>
<b>DPR% dia 2 (<math>\bar{X}</math>, n = 8)</b>	13,09 <sup>a</sup>	14,31 <sup>a</sup>	15,89 <sup>a</sup>
	14,96 <sup>b</sup>	14,39 <sup>b</sup>	6,67 <sup>b</sup>
	13,58 <sup>c</sup>	12,62 <sup>c</sup>	8,67 <sup>c</sup>
<b>DPR% dia 3 (<math>\bar{X}</math>, n = 11)</b>	14,84 <sup>a</sup>	12,73 <sup>a</sup>	20,23 <sup>a</sup>
	14,97 <sup>b</sup>	14,79 <sup>b</sup>	12,80 <sup>b</sup>
	7,93 <sup>c</sup>	12,16 <sup>c</sup>	12,32 <sup>c</sup>
<b>E% dia 1 (<math>\bar{X}</math>, n = 5)</b>	14,25 <sup>a</sup>	6,56 <sup>a</sup>	4,36 <sup>a</sup>
	-7,13 <sup>b</sup>	-8,15 <sup>b</sup>	-9,09 <sup>b</sup>
	-0,53 <sup>c</sup>	-1,90 <sup>c</sup>	4,83 <sup>c</sup>
<b>E% dia 2 (<math>\bar{X}</math>, n = 8)</b>	-10,90 <sup>a</sup>	-15,24 <sup>a</sup>	-13,35 <sup>a</sup>
	6,90 <sup>b</sup>	-2,47 <sup>b</sup>	-7,27 <sup>b</sup>
	2,93 <sup>c</sup>	14,33 <sup>c</sup>	13,49 <sup>c</sup>
<b>E% dia 3 (<math>\bar{X}</math>, n = 11)</b>	0,47 <sup>a</sup>	14,02 <sup>a</sup>	14,55 <sup>a</sup>
	13,87 <sup>b</sup>	13,30 <sup>b</sup>	8,83 <sup>b</sup>
	2,12 <sup>c</sup>	2,19 <sup>c</sup>	-14,04 <sup>c</sup>

Fonte: do autor.

Nota: <sup>a</sup> concentração baixa, <sup>b</sup> concentração média e <sup>c</sup> concentração alta.

### 5.3.8.4 Limites de detecção e limites de quantificação

Para uma maior confiabilidade, os LQs foram mantidos como os menores pontos da curva de calibração quantificados com precisão e exatidão adequadas, ou seja: 100, 80 e 15  $\mu\text{g L}^{-1}$ , para ATE, MET e PROP, respectivamente. Já os LDs foram calculados e valores de 25,6 (ATE); 14,6 (MET) e 3,8 (PROP) foram obtidos.

Vale ressaltar que os LQs são menores que as concentrações esperadas dos fármacos no plasma e que o LD para o MET cobre a concentração mínima da faixa terapêutica por

vezes apresentada em literatura, 35  $\mu\text{g L}^{-1}$  (SCHULZ, M.; SCHMOLDT, 2003; SILVA GRACIA et al., 2017).

#### 5.3.8.5 Seletividade e efeito de memória

Por meio do cromatograma obtido a partir de plasma branco (Figura 40A) é possível observar a ausência de sinais nos tempos de permanências dos analitos e do PI, mostrando a seletividade do método proposto.

Picos cromatográficos de baixa intensidade foram observados na injeção de segundo branco após a análise da matriz fortificada com o ponto alto dos analitos. No entanto, as áreas obtidas foram referentes a 0,07; 2,02; 0,21 e 0,46% (para ATE, MET, PROP e NAD, respectivamente) dos valores obtidos com os LQs. Dessa forma, pôde-se dizer que o método não apresentou efeito de memória.

#### 5.3.8.6 Recuperação absoluta

Os resultados de recuperação absoluta para cada um dos fármacos estão dispostos na Tabela 23 a seguir. Já a recuperação relativa foi calculada por meio da exatidão (4.5.7.4).

Tabela 23 – Recuperação absoluta dos analitos.

Analito	Recuperação (%)
Atenolol	5,3 <sup>a</sup>
	4,5 <sup>b</sup>
	4,8 <sup>c</sup>
Metoprolol	5,7 <sup>a</sup>
	6,1 <sup>b</sup>
	4,7 <sup>c</sup>
Propranolol	2,9 <sup>a</sup>
	3,2 <sup>b</sup>
	2,7 <sup>c</sup>
Nadolol	3,2

Fonte: do autor.

Nota: <sup>a</sup> concentração baixa, <sup>b</sup> concentração média e <sup>c</sup> concentração alta.

Mesmo com os baixos valores obtidos para a recuperação absoluta, o método apresentou exatidão adequada, o que indica a confiabilidade do mesmo. Vale ressaltar que

recuperações absolutas mais baixas podem ser observadas em SPME LC-MS devido a fatores como a competição por sítios de sorção e a supressão iônica por interferentes da matriz (SANTOS-NETO et al., 2008b; SANTOS et al., 2016). Além disso, a capacidade extrativa do preparo de amostras foi suficiente para proporcionar LQs necessários para os fármacos em estudo.

### 5.3.8.7 Robustez

Realizou-se uma ANAVA para comparar a média dos ensaios e as médias obtidas e os valores-p do teste F são mostradas na Tabela 24 abaixo. Vale ressaltar que nenhuma das pressuposições da ANAVA (normalidade e homocedasticidade) foi violada (valor-p  $\leq 0,05$ ).

Tabela 24- Médias para os diferentes ensaios do teste de robustez.

Teste	Média (n=3) $\pm$ DP		
	ATE	MET	PROP
<i>a</i>	1,20 $\pm$ 0,22	7,13 $\pm$ 0,62	1,43 $\pm$ 0,24
<i>b</i>	1,13 $\pm$ 0,09	6,40 $\pm$ 0,79	1,53 $\pm$ 0,25
<i>c</i>	1,29 $\pm$ 0,40	7,39 $\pm$ 0,34	1,86 $\pm$ 0,60
<i>d</i>	1,29 $\pm$ 0,05	6,84 $\pm$ 0,85	1,28 $\pm$ 0,16
<i>e</i>	1,15 $\pm$ 0,10	7,23 $\pm$ 1,18	1,17 $\pm$ 0,09
<i>f</i>	1,29 $\pm$ 0,11	7,31 $\pm$ 0,65	1,49 $\pm$ 0,03
<i>g</i>	1,12 $\pm$ 0,09	5,97 $\pm$ 0,042	1,05 $\pm$ 0,11
<i>h</i>	1,03 $\pm$ 0,08	6,53 $\pm$ 1,13	1,49 $\pm$ 0,10
Valor-p	0,0785	0,3560	0,3441

Fonte: do autor.

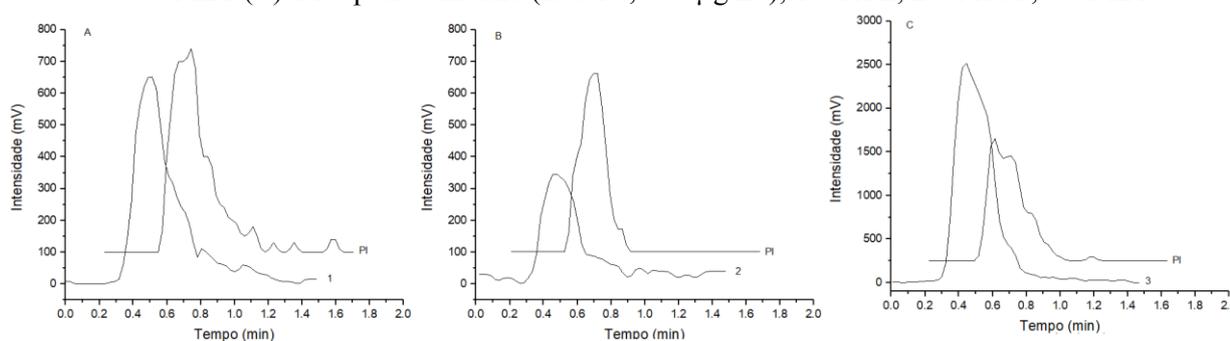
Como pôde ser observado pelos valores-p ( $\geq 0,07$ ), as médias não podem ser consideradas diferentes. Dessa forma, pôde-se dizer que pequenas variações para: volume de extração e de eluição; tempo de extração e de eluição, composição e fluxo da fase móvel; e composição da fase de eluição, não alteraram de forma significativa o preparo de amostra e o método de determinação proposto para ATE, MET, PROP e NAD por UHPLC-MS/MS, assegurando sua robustez.

## 5.4 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS

Cerca de 5 mL de amostras de sangue de voluntários que faziam uso rotineiro de ATE, MET ou PROP foram coletadas. Nenhum dos voluntários relatou uso de NAD. O sangue total de cada um dos voluntários foi centrifugado e o plasma foi fortificado com o PI ( $370 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e diluído com NaCl previamente à etapa de extração ( $n=3$ ).

As análises foram realizadas separadamente para cada fármaco e os cromatogramas resultantes da análise de amostra de três voluntários chamados de A (uso de atenolol), B (uso de metoprolol) e C (uso de propranolol) são mostrados na Figura 41 a seguir.

Figura 41 - Cromatogramas de amostras de voluntários que relataram uso de ATE (A), PROP (B) e MET (C). PI – padrão interno (nadolol,  $370 \mu\text{g L}^{-1}$ ); 1 – ATE; 2 – PROP; 3 – MET.



Fonte: do autor.

Como visto, as micropartículas de BSA foram capazes de extrair os três analitos de amostras reais e valores quantificáveis dos fármacos foram obtidos, com concentrações contidas nas faixas de trabalho aplicadas (TABELA 25).

Tabela 25 – Concentração dos fármacos encontrados em plasma de voluntários.

Analito	Concentração ( $\bar{X} \pm DP, n = 3$ ) $\mu\text{g L}^{-1}$
ATE	$396,16 \pm 24,34$
MET	$138,06 \pm 19,36$
PROP	$131,16 \pm 20,27$

Fonte: do autor.

As concentrações plasmáticas encontraram-se dentro das janelas terapêuticas sugeridas pela literatura (SCHULZ, M.; SCHMOLDT, 2003), indicando uma terapia eficiente com os fármacos. Mesmo a concentração do PROP estar um pouco acima das que são ditas como efetivas ( $50 - 100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (MANSUR et al., 1998), leves tóxicos são associados a valores acima de  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  (SCHULZ, M.; SCHMOLDT, 2003).

## 6 CONCLUSÕES

As micropartículas de BSA mostraram capacidade de excluir macro interferentes e de extrair analitos de baixa massa molecular de amostras de plasma (matriz complexa), podendo então ser utilizadas como material RAM para o preparo de amostras, aplicação inédita do material. A síntese das partículas de BSA foi otimizada e reproduzível.

Os ensaios de sorção indicaram diferenças na capacidade do material proposto em extrair fármacos de alta (maiores *qe*) e de baixa taxa de ligação a proteínas plasmáticas (principalmente HSA), contudo as micropartículas foram capazes de interagir de forma eficiente com ambos. Ademais, os estudos de caracterização (IV, TGA, DSC, BET, potencial zeta, DLS, MFA e MEV) foram realizados e os dados obtidos, quando pertinentes, estiveram de acordo com os encontrados na literatura.

Os testes com o *column switching* não apresentaram, até o presente momento, viabilidade para o uso do material sintetizado em SPE *online*. Entretanto, sinalizaram a capacidade das micropartículas em extrair os analitos de matriz complexa; além de indicarem elevada vida útil do material extrator.

Já na extração *off-line*, as fibras preparadas proporcionaram um novo modelo de preparo de amostras miniaturizado (empregando baixos volumes de amostras de pacientes e de solventes orgânicos), rápido, reproduzível, de fácil manuseio e com portabilidade. O custo acessível para a confecção das fibras e a possibilidade de reuso das mesmas indicam a viabilidade do processo proposto. Ainda, os resultados obtidos após a otimização e a validação do método reafirmaram a capacidade de extração dos fármacos, com limites de detecção e quantificação adequados para o método desenvolvido. A retirada da coluna de separação permitiu um sistema mais simples e mais rápido. A etapa de preparo de amostras consumiu cerca de 15 min; contudo até 10 amostras podiam ser preparadas em um único momento. Já para a quantificação dos fármacos, 3 min eram necessários, permitindo elevada frequência analítica e análise sequencial de amostras em um método que apresentou linearidade, precisão e exatidão adequadas, além de robustez para as 7 variáveis testadas.

A metodologia desenvolvida foi eficaz para a extração de atenolol, de metoprolol e de propranolol de amostras de plasma de voluntários que os utilizavam em suas rotinas e os valores obtidos estavam dentro das concentrações esperadas. Por ter mostrado capacidade de interação tanto com fármacos de alta quanto com os de baixa taxa de ligação a proteínas plasmáticas, as micropartículas de BSA apresentam-se como material promissor para o preparo de amostras complexas, com diversas possibilidades de aplicação.

## REFERÊNCIAS

ABD-TALIB, N.; MOHD-SETAPAR, S. H.; KHAMIS, A. K. The benefits and limitations of methods development in solid phase extraction: Mini review. **Jurnal Teknologi (Sciences and Engineering)**, Malásia, v. 69, n. 4, p. 69–72, 2014.

AFSHARAN, H. et al. Interaction of some cardiovascular drugs with bovine serum albumin at physiological conditions using glassy carbon electrode: A new approach. **Materials Science and Engineering C**, Holanda, v. 65, p. 97–108, 2016.

ANDRADE-EIROA, A. et al. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, Holanda, v. 80, p. 641–654, 2016.

BARBOSA, A. F. et al. Restricted access carbon nanotubes for direct extraction of cadmium from human serum samples followed by atomic absorption spectrometry analysis. **Talanta**, Holandda, v. 131, p. 213–220, 2015.

BARBOSA, V. M. P. et al. Direct extraction of lead ( II ) from untreated human blood serum using restricted access carbon nanotubes and its determination by atomic absorption spectrometry. **Talanta**, Holanda, v. 147, p. 478–484, 2016.

BATISTON, W. P. **Quimiometria aplicada à cromatografia líquida multidimensional capilar hifenada a espectrometria de massas sequencial para proteômica shotgun**. 2015. 120f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

BENFIELD, P.; CLISSOLD, S. P.; BROGDEN, R. N. Metoprolol: An updated review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy, in hypertension, ischaemic heart disease and related cardiovascular disorders. **Drugs**, Reino Unido, v. 31, n. 5, p. 376–429, maio 1986.

BENGTSSON, C.; JOHNSON, G.; REGÅRDH, C.-G. Plasma levels and effects of metoprolol on blood pressure and heart rate in hypertensive patients after an acute dose and between two doses during long-term treatment. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, Estados Unidos, v. 17, n. 4, p. 400–408, abr. 1975.

BERNAL, C. et al. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais - DSC. **Química Nova**, Brasil, v. 25, n. 5, p. 849–855, 2002.

BORGES, K. B.; PEREIRA, A. C.; MANO, V. Introdução ao preparo de amostras. In: BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C. **Preparo de Amostras para Análise de Compostos Orgânicos**. Rio de Janeiro: Rio de Janeiro: LTC, 2015. p. 2–8.

BOSCARI, C. N. et al. Molecularly imprinted probe for solid-phase extraction of hippuric and 4-methylhippuric acids directly from human urine samples followed by MEKC analysis. **Electrophoresis**, Reino Unido, v. 38, n. 7, p. 1083–1090, 2017.

BRONZE-UHLE, E. S. et al. Synthetic nanoparticles of bovine serum albumin with entrapped salicylic acid. **Nanotechnology, Science and Applications**, Nova Zelandia, v. 10, p. 11–21, 2016.

CASSIANO, N. M. et al. Development of restricted-access media supports and their application to the direct analysis of biological fluid samples via high-performance liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Alemanha, v. 384, n. 7–8, p. 1462–1469, 15 abr. 2006.

CHITTURI, C.; NOVAK, J. E. Diuretics in the management of cardiorenal syndrome. **Advances in Chronic Kidney Disease**, Reino Unida, v. 25, n. 5, p. 425–433, 2018.

COSTA, T. C. D. C. **Obtenção e caracterização de nanopartículas de argilominerais**. 2009. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais) - Centro de Ciências Exatas da Terra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2009.

DASTKHOON, M. et al. Cu@SnS/SnO<sub>2</sub> nanoparticles as novel sorbent for dispersive micro solid phase extraction of atorvastatin in human plasma and urine samples by high-performance liquid chromatography with UV detection: Application of central composite design (CCD). **Ultrasonics Sonochemistry**, Holanda, v. 36, p. 42–49, 2017.

DE FARIA, H. D. et al. New advances in restricted access materials for sample preparation: A review. **Analytica Chimica Acta**, Holanda, v. 959, p. 43–65, 2017a.

DE FARIA, H. D. et al. Direct extraction of tetracyclines from bovine milk using restricted access carbon nanotubes in a column switching liquid chromatography system. **Food Chemistry**, Holanda, v. 225, p. 98–106, 2017b.

DE FARIA, H. D. et al. Online extraction of antihypertensive drugs and their metabolites from untreated human serum samples using restricted access carbon nanotubes in a column switching liquid chromatography system. **Journal of Chromatography A**, Holanda, v. 1528, p. 41–52, dez. 2017d.

DE LIMA, M. M. et al. On-line restricted access molecularly imprinted solid phase

extraction of ivermectin in meat samples followed by HPLC-UV analysis. **Food Chemistry**, Holanda, v. 197, p. 7–13, 2016.

DE MELO, N. F. S. et al. Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de poli (L-lactídeo) contendo benzocaína. **Química Nova**, Brasil, v. 33, n. 1, p. 65–69, 2010.

DE PAULA, F. C. C. R.; DE PIETRO, A. C.; CASS, Q. B. Simultaneous quantification of sulfamethoxazole and trimethoprim in whole egg samples by column-switching high-performance liquid chromatography using restricted access media column for on-line sample clean-up. **Journal of Chromatography A**, Holanda, v. 1189, n. 1–2, p. 221–226, 2008.

DING, D. et al. Ototoxic effects and mechanisms of loop diuretics. **Journal of Otology**, Reino Unido, v. 11, n. 4, p. 145–156, 2016.

DRUGBANK. **Chlortalidone**. Disponível em:  
<<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00310>>. Acesso em: 05 maio 2019a.

DRUGBANK. **Hydrochlorothiazide**. Disponível em:  
<<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00999>>. Acesso em: 05 maio 2019b.

DRUGBANK. **Atenolol**. Disponível em:  
<<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00335>>. Acesso em: 05 maio 2019c.

DRUGBANK. **Metoprolol**. Disponível em:  
<<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00264>>. Acesso em: 05 maio 2019d.

DRUGBANK. **Propranolol**. Disponível em:  
<<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00571>>. Acesso em: 05 maio 2019e.

DRUGBANK. **Nadolol**. Disponível em:  
<<https://www.drugbank.ca/drugs/DB01203>>. Acesso em: 05 maio 2019f.

EDRI, E.; REGEV, O. pH Effects On BSA-dispersed carbon nanotubes studied by spectroscopy-enhanced composition evaluation techniques. **Analytical Chemistry**, Estados Unidos, v. 80, n. 11, p. 4049–4054, 2008.

EL-GINDY, A.; SALLAM, S.; ABDEL-SALAM, R. A. HPLC method for the simultaneous determination of atenolol and chlorthalidone in human breast milk. **Journal of Separation Science**, Reino Unido, v. 31, n. 4, p. 677–682, 2008.

ELGAWISH, M. S.; MOSTAFA, S. M.; ELSHANAWANE, A. A. Simple and rapid HPLC method for simultaneous determination of atenolol and chlorthalidone in spiked human plasma. **Saudi Pharmaceutical Journal**, Arabia Saudita, v. 19, n. 1, p. 43–49, 2011.

FARHADI, K.; FIRUZI, M.; HATAMI, M. Stir bar sorptive extraction of propranolol from plasma samples using a steel pin coated with a polyaniline and multiwall carbon nanotube composite. **Microchimica Acta**, Alemanha v. 182, n. 1–2, p. 323–330, 2015.

FARRUGIA, A. Albumin Usage in Clinical Medicine: Tradition or Therapeutic? **Transfusion Medicine Reviews**, Reino Unido, v. 24, n. 1, p. 53–63, 2010.

FONSECA, D. P.; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R. M. Bovine serum albumin-based nanoparticles containing resveratrol: Characterization and antioxidant activity. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, França, v. 39, p. 147–155, 2017.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Metoprolol**. Disponível em: <<https://www.drugs.com/pro/metoprolol.html>>. Acesso em: 05 maio 2019.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) - U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. p. 34, 2013.

GALISTEO-GONZÁLEZ, F.; MOLINA-BOLÍVAR, J. A. Systematic study on the preparation of BSA nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Holanda, v. 123, p. 286–292, 2014.

GARAVAGLIA, J. et al. A new method for rapid screening of ester-producing yeasts using in situ HS-SPME. **Journal of Microbiological Methods**, Holanda, v. 103, p. 1–2, 2014.

GHIASVAND, A. R.; NOURIASL, K.; YAZDANKHAH, F. Comparison of the atmospheric- and reduced-pressure HS-SPME strategies for analysis of residual solvents in commercial antibiotics using a steel fiber coated with a multiwalled carbon nanotube/polyaniline nanocomposite. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Alemanha, v. 410, n. 2, p. 361–371, 2018.

GILMAN, A.; GOODMAN, L. **Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro, 2010.

GONZALEZ, O. et al. Optimization and validation of a SPE-HPLC-PDA-fluorescence method for the simultaneous determination of drugs used in combined cardiovascular therapy in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**,

Holanda, v. 50, p. 630–639, 2009.

GONZALEZ, O. et al. LC – MS / MS method for the determination of several drugs used in combined cardiovascular therapy in human plasma. **Journal of Chromatography B**, Holanda, v. 878, n. 28, p. 2685–2692, 2010.

GORYŃSKI, K.; KIEDROWICZ, A.; BOJKO, B. Development of SPME-LC–MS method for screening of eight beta-blockers and bronchodilators in plasma and urine samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Holanda, v. 127, p. 147–155, 2016.

HAGINAKA, J. et al. Uniform-sized molecularly imprinted polymer for ( S ) -naproxen selectively modified with hydrophilic external layer. **Journal of Chromatography A**, Holanda, v. 849, p. 331–339, 1999.

HAN, J. et al. Simultaneous determination of doxorubicin and its dipeptide prodrug in mice plasma by HPLC with fluorescence detection. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, Holanda, v. 6, n. 3, p. 199–202, 2016.

HEMMATI, M. et al. Rapid determination of some beta-blockers in complicated matrices by tandem dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Alemanha, v. 408, n. 28, p. 8163–8176, 2016.

HU, X. et al. Preparation and evaluation of propranolol molecularly imprinted solid-phase microextraction fiber for trace analysis of  $\beta$ -blockers in urine and plasma samples. **Journal of Chromatography A**, Holanda, v. 1216, n. 2, p. 190–197, 2009.

HUA, K. et al. Surface hydrophilic modification with a sugar moiety for a uniform-sized polymer molecularly imprinted for phenobarbital in serum. **Acta Biomaterialia**, Holanda, v. 7, n. 8, p. 3086–3093, 2011.

INUKAI, T.; KAJI, S.; KATAOKA, H. Analysis of nicotine and cotinine in hair by on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry as biomarkers of exposure to tobacco smoke. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, Holanda, v. 156, p. 272–277, 2018.

KAKRAN, M. et al. Fabrication of quercetin nanoparticles by anti-solvent precipitation method for enhanced dissolution. **Powder Technology**, Holanda, v. 223, p. 59–64, 2012.

KATAOKA, H.; SAITO, K. Recent advances in column switching sample preparation in bioanalysis. **Bioanalysis**, Reiono Unido, v. 4, n. 7, p. 809–832, abr. 2012.

KATAYAMA, M. et al. Determination of  $\beta$ -blockers by high performance liquid chromatography coupled with solid phase microextraction from urine and plasma samples. **Analytical Letters**, Estados Unidos, v. 34, n. 1, p. 91–101, 2001.

KAWANO, S. et al. Direct analysis of drugs in plasma by column-switching liquid chromatography–mass spectrometry using a methylcellulose-immobilized reversed-phase pretreatment column. **Journal of Chromatography B Technology Biomedical Life Science**, Holanda, v. 792, n. 1, p. 49–54, 15 jul. 2003.

KHUROO, A. et al. Simultaneous determination of atenolol and chlorthalidone by LC – MS – MS in human plasma. **Chromatographia**, Alemanha, v. 68, n. 9, p. 721–729, 2008.

KIKIC, I. et al. Supercritical antisolvent precipitation of atenolol: The influence of the organic solvent and of the processing approach. **Journal of Supercritical Fluids**, Holanda, v. 38, p. 434–441, 2006.

KIM, M. et al. Determination of panduratin A in rat plasma by HPLC–MS/MS and its application to a pharmacokinetic study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Holanda, v. 137, p. 151–154, abr. 2017.

LANZILLOTTI, P. F. **Sistema para a liberação modificada de fármacos**. 2012. 117f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) -Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2012.

LEONETTI, G. et al. Time-course of the anti-hypertensive action of atenolol: Comparison of response to first dose and to maintained oral administration. **European Journal of Clinical Pharmacology**, Alemanha, v. 18, n. 5, p. 365–374, 1980.

LISKA, I. Fifty years of solid-phase extraction in water analysis – historical development and overview. **Journal of Chromatography A**, Holanda, v. 885, p. 3–16, 2000.

LIU, Y. et al.  $\beta$ -Cyclodextrin molecularly imprinted solid-phase microextraction coatings for selective recognition of polychlorophenols in water samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Alemanha, v. 410, n. 2, p. 509–519, 2018.

LIU, Y.; LIU, Y. J. Biosorption isotherms, kinetics and thermodynamics. **Separation and Purification Technology**, Reino Unido, v. 61, n. 3, p. 229–242, 2008.

LO, M.; RIEGELMAN, S. Determination of propranolol and its major metabolites in plasma and urine by high-performance liquid chromatography without solvent extraction. **Journal of Chromatography**, Holanda, v. 183, p. 213–220, 1980.

LORD, H.; PAWLISZYN, J. **Evolution of solid-phase microextraction technology.** **Journal of Chromatography A**, Holanda, v.885, n.1-2, p. 153-193, 2000.

MALTA, D. C. et al. Prevalence of high blood pressure measured in the Brazilian population, National Health Survey, 2013. **São Paulo Medical Journal**, Brasil, v. 134, n. 2, p. 163–170, 2016.

MANSUR, A. P. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of propranolol in hypertensive patients after sublingual administration: systemic availability. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Brasil, v. 31, n. 5, p. 691–696, maio 1998.

MARTÍNEZ, A. et al. Synthesis and characterization of thiolated alginate-albumin nanoparticles stabilized by disulfide bonds. Evaluation as drug delivery systems. **Carbohydrate Polymers**, Reino Unido, v. 83, n. 3, p. 1311–1321, 2011.

MARTINS, I. Precipitação de proteínas e hidrólise de conjugados. In: BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C. (Ed.). **Preparo de Amostras para Análise de Compostos Orgânicos**. Rio de Janeiro: Rio de Janeiro: LTC, 2015. p. 15–18.

MAZZARINO, M.; TORRE, X. DE. A screening method for the simultaneous detection of glucocorticoids, diuretics, stimulants, anti-oestrogens, beta-adrenergic drugs and anabolic steroids in human urine by LC-ESI-MS / MS. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, Alemanha, v. 392, n. 4, p. 681–698, 2008.

MCELNAY, J. C.; D'ARCY, P. F. Protein Binding Displacement Interactions and their Clinical Importance. **Drugs**, Reino Unido, v. 25, n. 5, p. 495–513, 1983.

MELANDER, A.; DANIELSON, K.; WAHLIN, E. Enhancement of the bioavailability of propranolol and metoprolol by food. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, Estados Unidos, v. 22, n. 1, p. 108–112, 1977.

MENEZES, M. L.; FÉLIX, G. On line extraction and separation of bendiocarb, methomyl, methylparathion, and pentachlorophenol pesticides from raw milk. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, Estados Unidos, v. 21, n. 18, p. 2863–2871, 1998.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles - A review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, Nigeria, v. 5, n. 1, p. 561–573, 2006.

MOLINER-MARTÍNEZ, Y. et al. Magnetic in-tube solid phase microextraction. **Analytical Chemistry**, Estados Unidos, v. 84, n. 16, p. 7233–7240, 2012.

MORAES, G. DE O. I. et al. A new restricted access molecularly imprinted polymer capped with albumin for direct extraction of drugs from biological matrices : the case of chlorpromazine in human plasma. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, Alemanha, v. 405, n. 24, p. 7687–7696, 2013.

NAMASIVAYAM, S. K. R.; ROBIN, A. T. G. Preparation, optimization and characterization of biocompatible nanoalbumin-ofloxacin (bsanp-of) conjugate and evaluation of control release, antibacterial activity against clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, India, v. 6, n. 3, p. 235–239, 2013.

NETO, A. J. S.; LOPES, B. R.; CASS, Q. B. Preparo de amostras empregando meios de acesso restrito (RAM). In: BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C. (Ed.). **Preparo de Amostras para Análise de Compostos Orgânicos**. Rio de Janeiro: Rio de Janeiro: LTC, 2015. p. 97–105.

NSUBUGA, H. et al. Sol-gel based biogenic silica composite as green nanosorbent for chemometric optimization of micro-solid-phase extraction of beta blockers. **Journal of Chromatography A**, Holanda, v. 1554, p. 16–27, 2018.

OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, C. D. 96/23/EC. **Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results**, 2002.

OLIVEIRA, F. M.; SEGATELLI, M. G.; TARLEY, C. R. T. Preparation of a new restricted access molecularly imprinted hybrid adsorbent for the extraction of folic acid from milk powder samples. **Analytical Methods**, Reino Unido, v. 8, n. 3, p. 656–665, 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Hipertensão Arterial**. Disponível em: <[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=3045:relatorios-de-gestao-dos-termos-de-cooperacao&Itemid=806](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=3045:relatorios-de-gestao-dos-termos-de-cooperacao&Itemid=806)>. Acesso em: 05 maio 2019.

ORMSBY, M. Analysis of laminated documents using solid-phase microextraction. **Journal of the American Institute for Conservation**, Reino Unido, v. 44, n. 1, p. 13–26, 2005.

OUYANG, G. et al. Sampling-rate calibration for rapid and nonlethal monitoring of organic contaminants in fish muscle by solid-phase microextraction. **Environmental Science and Technology**, Estados Unidos, v. 45, n. 18, p. 7792–7798, 2011.

PINTO, M. A. L.; DE SOUZA, I. D.; QUEIROZ, M. E. C. Determination of drugs in plasma samples by disposable pipette extraction with C18-BSA phase and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Holanda, v. 139, p. 116–124, 2017.

PIRI-MOGHADAM, H.; ALAM, M. N.; PAWLISZYN, J. Review of geometries and coating materials in solid phase microextraction: Opportunities, limitations, and future perspectives. **Analytica Chimica Acta**, Holanda, v. 984, p. 42–65, 2017.

PLÓTKA-WASYLKA, J. et al. Modern trends in solid phase extraction: New sorbent media. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 77, p. 23–43, 2016.

POOLE, C. F. et al. Determination of kinetic and retention properties of cartridge and disk devices for solid-phase extraction. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, Holanda, v. 689, n. 1, p. 245–259, 1997.

QI, Y. et al. Selective extraction of low molecular weight proteins by mesoporous silica particles with modified internal and external surfaces. **Analytical and Bionalytical Chemistry**, Alemanha, v.398, p. 1715–1722, 2010.

QUEIROZ, R. G. et al. Radiation-synthesized protein-based drug carriers: Size-controlled BSA nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, Holanda, v. 85, p. 82–91, 2015.

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

RAHIMNEJAD, M.; NAJAFPOUR, G.; BAKERI, G. Investigation and modeling effective parameters influencing the size of BSA protein nanoparticles as colloidal carrier. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Holanda, v. 412, p. 96–100, 2012.

RANI, K. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) spectral analysis of BSA Nanoparticles (BSA NPs) and Egg Albumin Nanoparticles (EA NPs). **Research Journal of Chemical Sciences**, India, v. 6, n. 2, p. 29–36, 2016.

REN, D. et al. Determination of pyrethroids in tea brew by GC-MS combined with SPME with multiwalled carbon nanotube coated fiber. **International Journal of Analytical Chemistry**, Egito, v. 2018, 2018.

RODRIGUES, N. F. **Avaliação da resposta imunológica humoral em camundongos swiss imunizados com nanopartículas de albumina sérica bovina associadas aos antígenos totais de pseudomonas aeruginosa**. 2014. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, 2014.

ROSA, M. A.; DE FARIA, H. D.; FIGUEIREDO, E. C. A novel, simple and robust method for the analysis of sulfonamides in fish farming water samples using column switching liquid chromatography. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, Suíça, v. 98, n. 7, p. 593–605, 2018.

ROYER, B. et al. Applications of Brazilian pine-fruit shell in natural and carbonized forms as adsorbents to removal of methylene blue from aqueous solutions-Kinetic and equilibrium study. **Journal of Hazardous Materials**, Holanda, v. 164, n. 2–3, p. 1213–1222, 2009.

RUDOLPHI, A.; BOOS, K. S. The use of Restricted-Access Media in HPLC, Part 1- Classification and Review. **LC-GC**, p. 602–611, 1997.

SADÍLEK, P.; DALIBOR, S.; SOLICH, P. Using restricted-access materials and column switching in high-performance liquid chromatography for direct analysis of biologically-active compounds in complex matrices. **TrAC- Trends in Analytical Chemistry**, Holanda, v. 26, n. 5, p. 375–384, 2007.

ŠAFAŘÍKOVÁ, M.; ŠAFAŘÍK, I. Magnetic solid-phase extraction. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, Holanda, v. 194, n. 1–3, p. 108–112, 1999.

SANTOS-NETO, A. J. et al. Fluoxetine and norfluoxetine analysis by direct injection of human plasma in a column switching liquid chromatographic system. **Journal of Separation Science**, Reino Unido, v. 31, n. 1, p. 78–85, 2008a.

SANTOS-NETO, A. J. et al. Simultaneous analysis of five antidepressant drugs using direct injection of biofluids in a capillary restricted-access media-liquid chromatography – tandem mass spectrometry system. **Journal of Chromatography A**, Holanda, v. 1189, p. 514–522, 2008b.

SANTOS, M. G. et al. Direct doping analysis of beta-blocker drugs from urinary samples by on-line molecularly imprinted solid-phase extraction coupled to liquid chromatography/mass spectrometry. **The Analyst**, Reino Unido, v. 140, n. 8, p. 2696–2703, 2015.

SANTOS, M. G. et al. Analysis of tricyclic antidepressants in human plasma using online-restricted access molecularly imprinted solid phase extraction followed by direct mass spectrometry identification/quantification. **Talanta**, Holanda, v. 163, p. 8–16, 2016.

SARAFRAZ-YAZDI, A.; ABEDI, M. R.; ES'HAGHI, Z. Pre-concentration and determination of  $\beta$ -blockers using carbon nanotube-assisted pseudo-stirbar hollow fiber solid-/liquid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, Estados Unidos, v. 36, n. 6, p. 750–769, 2013.

SCHULZ, M. et al. Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 800 drugs and other xenobiotics. **Pharmazie**, Alemanha, v. 58, n. 7, p. 447–474, 2003.

SEGER, C. et al. A rapid HPLC-MS/MS method for the simultaneous quantification of cyclosporine A, tacrolimus, sirolimus and everolimus in human blood samples. **Nature Protocols**, Reino Unido, v. 4, n. 4, p. 526–534, 2009.

SHANKAR, K. R.; AMETA, R. K.; SINGH, M. Preparation of BSA nanoparticles using aqueous urea at T = 308.15, 313.15 and 318.15 K as a function of temperature. **Journal of Molecular Liquids**, Holanda, v. 216, p. 808–813, 2016.

SILVA GRACIA, M. et al. Development and validation of an HPLC-UV method for the simultaneous determination of the antipsychotics clozapine, olanzapine and quetiapine, several beta-blockers and their metabolites. **Biomedical Chromatography**, Estados Unidos, v. 31, n. 10, p. 1–11, 2017.

SNICKET, L. **Desventuras em série: Mau começo**. São Paulo: Schawarcz S.A., 1999.

SWEETMAN, S. **Martindale – The Complete Drug Reference**. London: Pharmaceutical Press, 2006.

TAGHVIMI, A.; HAMISHEHKAR, H. Carbon coated magnetic nanoparticles as a novel magnetic solid phase extraction adsorbent for simultaneous extraction of methamphetamine and ephedrine from urine samples. **Journal of Chromatography B**, Holanda, v. 1041, p. 113–119, 2017.

TAN, Y. L.; HO, H. K. Navigating albumin-based nanoparticles through various drug delivery routes. **Drug Discovery Today**, Holanda, v. 23, n. 5, p. 1108–1114, 2018.

TANEJA, N.; SINGH, K. K. Rational design of polysorbate 80 stabilized human serum albumin nanoparticles tailored for high drug loading and entrapment of irinotecan. **International Journal of Pharmaceutics**, Holanda, v. 536, n. 1, p. 82–94, 2018.

TARHINI, M.; GREIGE-GERGES, H.; ELAISSARI, A. Protein-based nanoparticles: From preparation to encapsulation of active molecules. **International Journal of Pharmaceutics**, Holanda, v. 522, n. 1–2, p. 172–197, 2017.

THIRUPATHI KUMARA RAJA, S.; PRAKASH, T.; GNANAMANI, A. Redox responsive albumin autogenic nanoparticles for the delivery of cancer drugs. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Holanda, v. 152, p. 393–405, abr. 2017.

TRENHOLM, R. A.; VANDERFORD, B. J.; SNYDER, S. A. On-line solid phase extraction LC – MS / MS analysis of pharmaceutical indicators in water : A green alternative to conventional methods. **Talanta**, Holanda, v. 79, p. 1425–1432, 2009.

ULLAH, N. et al. Restricted access- activated carbon clothes-based lead extraction from human serum: skipping the sample preparation step for biological media. **Journal of Environmental Chemistry**, Suíça, v. 96, p. 1048–1058, 2016.

UMEZAWA, H. et al. Simultaneous determination of  $\beta$  - blockers in human plasma using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, Estados Unidos, v. 22, n. 7, p. 702–711, jul. 2008.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. MICROEXTRAÇÃO POR FASE SÓLIDA. **Química Nova**, Brasil, v. 23, n. 4, p. 523–530, 2000.

VARCA, G. H. C.; QUEIROZ, R. G.; LUGÃO, A. B. Irradiation as an alternative route for protein crosslinking: Cosolvent free BSA nanoparticles. **Radiation Physics and Chemistry**, Reino Unido, v. 124, p. 111–115, 2016.

VILELA, F.; LOURDES, Z. DE. Amostragem de compostos orgânicos voláteis no ar utilizando a técnica de microextração em fase sólida. **Química Nova**, Brasil, v. 28, n. 4, p. 646–654, 2005.

WU, H. et al. Site-selective probe for investigating the asynchronous unfolding of domains in bovine serum albumin. **Talanta**, Holanda, v. 84, n. 3, p. 881–886, 2011.

YAMAMOTO, E. et al. Methylcellulose-immobilized reversed-phase precolumn for direct analysis of drugs in plasma by HPLC. **Analytical Sciences**, Japão, v. 17, n. 10, p. 1155–1159, 2001.

YEDOMON, B.; FESSI, H.; CHARCOSSET, C. Preparation of Bovine Serum Albumin (BSA) nanoparticles by desolvation using a membrane contactor: A new tool for large scale production. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Holanda, v. 85, n. 3 PART A, p. 398–405, 2013.