

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

RODRIGO CAMPOS DOS SANTOS

**EMPREGO DE NANOTUBOS DE CARBONO DE ACESSO RESTRITO NA
EXTRAÇÃO DIRETA DE FÁRMACOS ANTICONVULSIVANTES SEGUIDO DE
ANÁLISE POR HPLC**

Alfenas/MG

2016

RODRIGO CAMPOS DOS SANTOS

**EMPREGO DE NANOTUBOS DE CARBONO DE ACESSO RESTRITO NA
EXTRAÇÃO DIRETA DE FÁRMACOS ANTICONVULSIVANTES SEGUIDO DE
ANÁLISE POR HPLC**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG. Área de concentração: Química Analítica.
Orientador: Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo.

Alfenas/MG

2016

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

Santos, Rodrigo Campos dos

Emprego de nanotubos de carbono de acesso restrito na extração direta de fármacos anticonvulsivantes seguido de análise por HPLC / Rodrigo Campos dos Santos. -- Alfenas/MG, 2016.
90 f.

Orientador: Eduardo Costa de Figueiredo.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2016.

Bibliografia.

1. Nanotubos de carbono. 2. Cromatografia líquida.
3. Anticonvulsivantes. I. Figueiredo, Eduardo Costa de. II. Título.

CDD-543

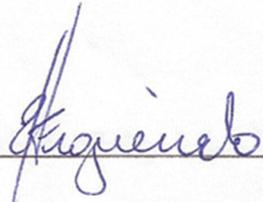
Rodrigo Campos dos Santos

“Emprego de nanotubos de carbono de acesso restrito na extração direta de fármacos anticonvulsivantes seguido de análise por HPLC”

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Analítica.

Aprovado em: 22/09/2016

Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Jaine Honorata Hortolan Luiz
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto
Instituição: Universidade de São Paulo

Assinatura: 

Dedico esta dissertação a minha família (meu pai Júlio, minha mãe Ana Lúcia e minha irmã Ana Elisa), que em nenhum momento mediram esforços para a realização dos meus sonhos, que me guiaram pelos caminhos corretos, me ensinaram a fazer as melhores escolhas, me mostraram que a honestidade e o respeito são essenciais à vida, e que devo sempre lutar pelo que quero. A eles devo a pessoa que me tornei.

AGRADECIMENTOS

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; Não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”

Chico Xavier

Ao **Programa de Pós-graduação em Química (PPGQ)** da Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade de concluir mais etapa da minha vida acadêmica.

A **Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF)** da Universidade Federal de Alfenas pela infraestrutura disponibilizada no Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos (LATF) durante a execução dos experimentos.

Ao **Hospital das Clínicas de São Paulo (HC) - Instituto do Coração (INCOR)** que nas pessoas do **Prof. Dr. Paulo Caleb Júnior** e de sua aluna **Carolina Tosin Bueno** auxiliaram na coleta de amostras de pacientes acometidos com doenças mentais.

Aos meus pais, **Júlio César dos Santos** e **Ana Lúcia Campos da Silva Santos**, e a minha irmã, **Ana Elisa Campos dos Santos**, por sempre me apoiarem nos estudos e me acolherem em seus braços nas horas mais difíceis desta jornada.

Ao **Professor Dr. Eduardo Costa de Figueiredo** pela orientação ao longo deste período, pelo companheirismo, amizade e confiança depositada em mim no desenvolvimento deste projeto.

A equipe do **Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos (LATF)** – **Patrícia, Márcia e Luzia** – pela paciência e inúmeras ajudas dispensadas a mim ao longo deste período.

Aos **colegas de grupo e de laboratório** pelos bons momentos de aprendizagens e descontração que passamos juntos e principalmente pelo apoio dado nos momentos de dificuldades.

A **Adriana Kakazu Kaori** pela lealdade, amizade, companheirismo, por ser o meu braço direito no desenvolvimento das atividades experimentais e principalmente por não me deixar desanimar frente a um resultado indesejado.

Aos **integrantes da Turma de Quinta – Carolina Nasser, Andressa Vasques, Poliana Machado, Raphael Gomes, Fernanda Olímpio, Cinthia Aguiar, Jonathan Balduino** – pela amizade, companheirismo, carinho e atenção dispensados a mim em todos os momentos desta jornada que foi dura e longa, mas que agora chega ao fim. Saibam que vocês foram essenciais durante este tempo.

A **todos os meus amigos e familiares** por estarem sempre ao meu lado comemorando as vitórias e me ensinando a levantar nas derrotas.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para o resultado deste trabalho.

Muito obrigado!

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória nem derrota.”

Theodore Roosevelt

RESUMO

Os anticonvulsivantes são fármacos bastante utilizados no tratamento da epilepsia. Todavia, sua periculosidade é elevada, visto que há uma grande proximidade entre a faixa terapêutica e a dose tóxica. Assim sendo, a avaliação do perfil cinético dessa classe de substâncias é imprescindível. Entretanto, analisar substâncias em fluidos biológicos não é uma tarefa trivial visto que os analitos estão imersos em matrizes complexas, sendo necessária uma preparação da amostra para retirada de interferentes. Uma opção interessante para realizar extrações diretas é trabalhar com materiais que possuam a capacidade de reter compostos de baixo peso molecular e ao mesmo tempo excluam proteínas da amostra, como é o caso dos nanotubos de carbono de acesso restrito (RACNTs). Neste trabalho, foi realizada a síntese dos RACNTs por meio do recobrimento dos CNTs comercial com albumina de soro bovino (BSA) para posteriormente utilizá-los como adsorventes (coluna extratora) em um sistema de Cromatografia Líquida multidimensional em modo *column switching*, para análise direta de fenobarbital, carbamazepina e primidona em plasma sanguíneo humano. Os modelos de quimissorção e Sips foram os que melhores se ajustaram aos dados experimentais nos estudos cinéticos e de equilíbrio, respectivamente. A análise dos cromatogramas obtidos permitiu identificar todos os compostos de interesse devido aos bons valores obtidos de resolução de pico. A faixa analítica testada foi de 2 e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($R^2 > 0,99$). O limite de quantificação foi de 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para todos os fármacos, ao passo que o limite de detecção assumiu um valor igual a 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Com relação à precisão (intra e intercorrida) e exatidão (intra e intercorrida) os analitos apresentaram valores inferiores a 15% e entre -15 e 15%, respectivamente. O método proposto mostrou-se eficiente na extração e separação de fármacos anticonvulsivantes em amostras reais, o que sinaliza sua possível utilização na monitorização terapêutica.

Palavras-chaves: Nanotubos de carbono. Materiais de acesso restrito. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Anticonvulsivantes.

ABSTRACT

Anticonvulsants are drugs often used in the treatment of the epilepsy. However, their danger is high, whereas there is a close proximity between the therapeutic range with the toxic dose. Therefore, the evaluation of the kinetic profile of this class of drugs is essential. But, analyze substances in biological fluids is not a trivial task because the analytes are immersed in complex matrices, making it necessary to sample preparation for removal of interfering. An interesting option to make direct extractions is to work with materials that having the capacity to retain low molecular weight while excluding the sample proteins, such as the restricted access carbon nanotubes (RACNTs). In this work, was made the synthesis of RACNTs by recoating of CNTs commercial with bovine serum albumin (BSA) to subsequently use them as adsorbents (extraction column) in a multidimensional Liquid Chromatography system in column switching mode for direct analysis of phenobarbital, carbamazepine and primidone from human blood plasma. The models of chemisorption and Sips were the best fitted to the experimental data in kinetic studies and equilibrium, respectively. It was possible to identify all compounds of interest in the obtained chromatograms, due to the good values of peak resolution. The analytical curve ranges from 2 to 40 mg L⁻¹ ($R^2 > 0.99$) for all the analytes. The limit of quantitation was of 2 mg L⁻¹ for all drugs, while the limit of detection assumed values equal to 0.1 µg mL⁻¹. Concerning precision (within and between-day) and accuracy (within and between-day) the analytes presented values less than 15% and between -15 and 15%, respectively. Additionally, the proposed method was efficient in the extraction and separation of anticonvulsants drugs from real samples, being possible its use in therapy monitoring.

Key words: Carbon nanotubes. Restricted Access Materials. High Performance Liquid Chromatography. Anticonvulsants.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	- Amostrador Manual
BSA	- Albumina de Soro Bovino
CAR	- Carbamazepina
CG	- Cromatografia Gasosa
CNT	- Nanotubos de Carbono
ER	- Erro relativo
FEN	- Fenobarbital
GABA	- Ácido α - aminobutírico
HID	- Hidantoína
HPLC	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HSA	- Albumina de Soro Humano
LD	- Limite de Detecção
LLE	- Extração Líquido-líquido
LQ	- Limite de Quantificação
MIP	- Polímeros de Impressão Molecular
MWCNT	- Nanotubos de Carbono de Parede Múltipla
PI	- Padrão Interno
PRI	- Primidona
RACNT	- Nanotubos de Carbono de Acesso Restrito
RAM	- Materiais de Acesso Restrito
RSD	- Desvio Padrão Relativo

SNC - Sistema Nervoso Central

SPE - Extração em fase sólida

SWCNT - Nanotubos de Carbono de Parede Simples

UV - Ultravioleta

VC - Válvula de comutação eletrônica de seis vias

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Etapas da extração em fase sólida. (a) condicionamento, (b) introdução da amostra, (c) lavagem do sorvente, (d) dessorção dos analitos	20
Figura 2 - Estrutura de nanotubos de carbono. (a) nanotubos de parede simples, (b) nanotubos de parede múltipla	21
Figura 3 - Geometrias dos nanotubos de carbono de camada simples. (a) armchair, (b) zig-zag, (c) chiral.....	22
Figura 4 - Mecanismos de exclusão de macromoléculas pelos RAMs: (a) barreira física, (b) barreira química, (c) recobrimento com proteínas	24
Figura 5 - Síntese dos nanotubos de carbono de acesso restrito	25
Figura 6 - Mecanismo de exclusão de proteínas pelos nanotubos de carbono de acesso restrito	26
Figura 7 - Modos de operação do sistema de column switching (a) <i>backflush</i> e (b) <i>foreflush</i> , usando uma válvula seletora de seis vias e duas posições....	36
Figura 8 - Estrutura química do fenobarbital	38
Figura 9 - Estrutura química da carbamazepina.....	39
Figura 10 - Estrutura química da primidona	40
Figura 11 - Síntese dos RACNTs	46
Figura 12 - Sistema cromatográfico em <i>column switching</i> . (a) os analitos são retidos e as macromoléculas serão eliminadas, (b) os fármacos são eluídos a partir da coluna de RACNTs e (c) os analitos são separados pela coluna analítica C ₁₈	49
Figura 13 - Fortificação do <i>pool</i> de amostras de plasma sanguíneo humano (n = 6).....	52
Figura 14 - Revestimento dos CNTs comercial com BSA	56
Figura 15 - Redução de iminas a aminas pela ação do borohidreto de sódio	56
Figura 16 - Teste de eliminação de proteínas usando colunas empacotadas com CNTs e RACNTs	57
Figura 17 - Simulação dos estudos cinéticos de adsorção da primidona em RACNTs a partir de soluções aquosas de acordo com os métodos de ajustes não lineares.....	58

Figura 18 - Difusão intrapartículas da primidona em RACNTs a partir de soluções aquosas.....	60
Figura 19 - Isoterma de adsorção da primidona adsorvida pelos RACNTs obtida a partir de soluções aquosas com seus respectivos ajustes	61
Figura 20 - Cromatogramas da solução aquosa de CAR na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ obtidos em diferentes comprimentos de onda. (a) 200 nm, (b) 210 nm, (c) 254 nm e (d) 284 nm.....	64
Figura 21 - Cromatogramas das soluções aquosas de padrões na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ obtidos no comprimentos de onda de 210 nm. (a) PRI, (b) FEN, (c) CAR e (d) HID	65
Figura 22 - Cromatogramas da solução aquosa contendo o mix de padrões na concentração $20 \mu\text{g mL}^{-1}$. (a) condições cromatográficas idênticas àquelas utilizadas para soluções aquosas contendo os analitos isolados e (b) condições cromatográficas otimizadas para solução aquosa contendo o mix de padrões	66
Figura 23 - Cromatogramas para uma solução aquosa contendo um mix de padrões a $2 \mu\text{g mL}^{-1}$. (a) ocorrência de <i>carry over</i> e (b) ausência de <i>carry over</i> ..	67
Figura 24 - Cromatogramas indicando a ausência/presença de interferentes para uma solução aquosa contendo um mix de padrões $2 \mu\text{g mL}^{-1}$. (a) fase de limpeza metanol : água ultra pura (90:10) e (b) fase de limpeza acetonitrila : água ultra pura : álcool isopropílico (75:15:10)	68
Figura 25 - Cromatograma da solução aquosa contendo o mix de padrões na concentração $2 \mu\text{g mL}^{-1}$	69
Figura 26 - Cromatogramas das amostras de plasma diluídas e dopadas com padrões na concentração $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Diluições nas proporções de (a) 1:1, (b) 1:2 e (c) 1:3	70
Figura 27 - Cromatograma da amostra de plasma diluída (1:1) e fortificada com padrões na concentração $20 \mu\text{g mL}^{-1}$	71
Figura 28 - Curvas de calibração para os fármacos (a) FEN, (b) CAR e (c) PRI, usando HID como padrão interno (n = 5)	72
Figura 29 - Cromatograma da amostra de plasma diluída (1:1) e fortificada com padrões na concentração $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$	75
Figura 30 - Cromatograma da amostra real de plasma sanguíneo humano diluída (1:1)	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Modelos cinéticos de adsorção	28
Tabela 2 - Modelos de isoterma de adsorção	31
Tabela 3 - Parâmetros cromatográficos	44
Tabela 4 - Etapas de extração e separação cromatográfica pelo sistema <i>column switching</i>	50
Tabela 5 - Capacidade adsortiva dos CNTs cru, aquecidos e oxidados frente aos analitos FEN, CAR, PRI e HID	55
Tabela 6 - Parâmetros cinéticos da adsorção da primidona em RACNTs	59
Tabela 7 - Parâmetros das isotermas da primidona adsorvida nos RACNTs	62
Tabela 8 - Precisão e exatidão para FEN, CAR e PRI contidos em plasma humano extraídos pelos RACNTs (n = 3)	73
Tabela 9 - Comparação entre os valores de limites de detecção para FEN, CAR e PRI encontrados na literatura e aqueles obtidos neste trabalho.....	74

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)	19
2.2	NANOTUBOS DE CARBONO (CNTs)	21
2.3	MATERIAIS DE ACESSO RESTRITO (RAMs)	23
2.3.1	Nanotubos de carbono de acesso restrito (RACNTs)	25
2.4	ESTUDOS DE ADSORÇÃO	26
2.4.1	Cinética de adsorção	27
2.4.1.1	Pseudoprimeira ordem	29
2.4.1.2	Pseudosegunda ordem	29
2.4.1.3	Quimissorção	29
2.4.1.4	Ordem fracionária	30
2.4.1.5	Difusão intrapartículas	30
2.4.2	Isotermas de adsorção	30
2.4.2.1	Isoterma de Langmuir	32
2.4.2.2	Isoterma de Freundlich	32
2.4.2.3	Isoterma de Sips	32
2.4.2.4	Isoterma de Khan	33
2.4.2.5	Isoterma de Redlich-Peterson	33
2.4.2.6	Isoterma de Toth	33
2.5	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)	34
2.5.1	<i>Column switching</i>	35
2.6	ANTICONVULSIVANTES	36
2.6.1	Fenobarbital	37
2.6.2	Carbamazepina	38
2.6.3	Primidona	39
3	OBJETIVOS	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1	EQUIPAMENTOS	42
4.2	REAGENTES, PADRÕES E SOLVENTES	43
4.3	PREPARO DE SOLUÇÕES	43

4.4	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DOS TESTES DE CINÉTICA E ADSORÇÃO	44
4.5	EFEITO DO TRATAMENTO DOS CNTs NA RESPOSTA ANALÍTICA.....	45
4.6	SÍNTESE DOS RACNTs	45
4.7	TESTE DE ELIMINAÇÃO DE PROTEÍNAS	46
4.8	ESTUDOS CINÉTICOS DE ADSORÇÃO	47
4.9	CONSTRUÇÃO DAS ISOTERMAS DE ADSORÇÃO	47
4.10	MONTAGEM DO SISTEMA <i>COLUMN SWITCHING</i>	48
4.11	AMOSTRAS	51
4.12	VALIDAÇÃO.....	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1	SÍNTESE DOS RACNTs	54
5.1.1	Efeito do tratamento dos CNTs na resposta analítica.....	54
5.1.2	Revestimento dos CNTs com BSA	55
5.2	TESTE DE ELIMINAÇÃO DE PROTEÍNAS	56
5.3	ESTUDOS CINÉTICOS DE ADSORÇÃO	58
5.4	ISOTERMAS DE ADSORÇÃO.....	60
5.5	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	64
5.6	PREPARO DE AMOSTRA AUTOMATIZADO.....	66
5.7	VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DO MÉTODO	71
6	CONCLUSÃO	76
	REFERÊNCIAS.....	77
	ANEXO.....	90

1 INTRODUÇÃO

Analisar substâncias em fluidos biológicos não é uma tarefa trivial visto que os analitos estão imersos em matrizes complexas, sendo, portanto, necessário uma preparação da amostra antes da efetivação da análise para retirada de interferentes, como por exemplo, proteínas (XU et al., 2010). Entretanto, o processo de preparo de amostras, por envolver etapas anteriores à análise que vão desde uma simples diluição até a solubilização parcial ou total, é responsável pelo aumento do erro experimental, além de contribuir para a baixa repetibilidade e alta frequência analítica (OLIVEIRA, 2003). Dessa forma, o ideal em um protocolo analítico é que se realizem análises diretas de amostras não tratadas.

Neste contexto, os materiais de acesso restrito (RAMs) surgem como uma alternativa. Estes materiais, por sua vez, são porosos e permitem a passagem de pequenas moléculas que ficam retidas em uma camada interna da coluna cromatográfica enquanto as maiores são excluídas pela camada externa (VINTILOIU et al., 2005). Visando a melhoria das extrações diretas, o trabalho em conjunto dos RAMs com nanotubos de carbono (CNTs) em sistemas cromatográficos do tipo *column switching* tem-se se mostrado bastante promissor.

Sabe-se que os CNTs possuem elevada capacidade adsortiva, sendo, portanto, frequentemente utilizados em extrações em fase sólida (SPE) (WEN et al., 2014). Recentemente, os CNTs de camadas múltiplas foram modificados pela inserção de uma camada de albumina bovina entrecruzada, resultando em nanotubos de carbono de acesso restrito (RACNTs) (BARBOSA et al., 2015). Esses materiais foram capazes de extrair cádmio diretamente da amostra não tratada, e ao mesmo tempo excluir as macromoléculas da mesma.

Dessa forma, acredita-se que o emprego de RACNTs em sistemas *column switching* pode ser eficiente e vantajoso na análise direta e simultânea dos fármacos fenobarbital (FEN), carbamazepina (CAR) e primidona (PRI) a partir de plasma sanguíneo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta revisão aborda aspectos relacionados a técnica de extração em fase sólida, bem como alguns dos principais adsorventes por ela utilizados, tais como os nanotubos de carbono e os materiais de acesso restrito. Além disso, é relatada a síntese de um novo sorvente denominado de nanotubos de carbono de acesso restrito, assim como sua caracterização físico-química, podendo este ser aplicado na separação de analitos orgânicos, como os anticonvulsivantes, em sistemas *column switching* por meio da cromatografia líquida de alta eficiência.

2.1 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)

Em alguns procedimentos analíticos o preparo de amostras é considerado um ponto crucial para se obter uma análise eficiente, partindo-se do pressuposto que estas etapas objetivam a eliminação de algum interferente, uma pré-concentração do analito ou sua conversão em uma espécie de mais fácil detecção (CAMINO-SÁNCHEZ et al., 2014; WEN et al., 2014). Neste contexto, a técnica de SPE tem sido utilizada frequentemente em substituição ao método clássico de extração líquido-líquido (LLE) (RAYNIE, 2010).

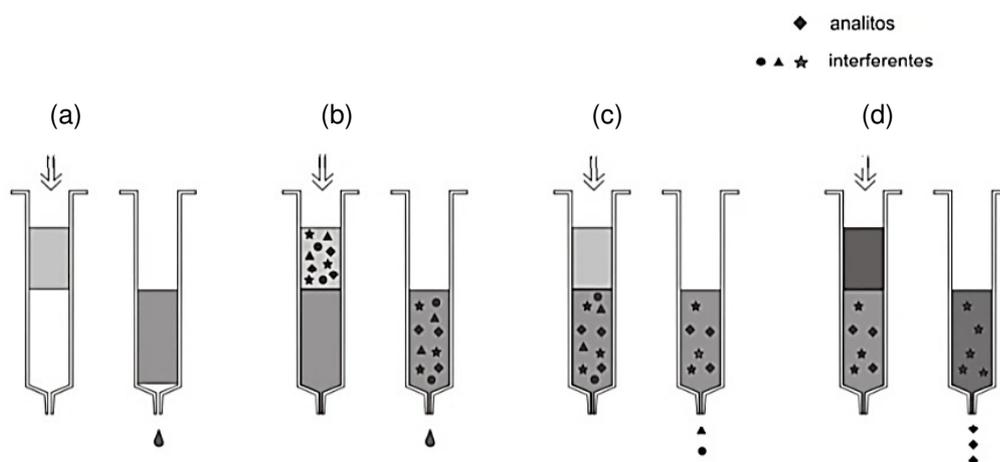
Um dos fundamentos da SPE é a partição do analito entre uma fase estacionária e uma matriz líquida (PAN et al., 2014). Esse método é mais vantajoso se comparado às extrações clássicas por ser mais simples, rápido, econômico no que tange o consumo de solventes orgânicos e seletivo (FAN et al., 2012; FARAJI et al., 2012).

De acordo com Jardim (2010), para se efetivar a SPE são necessárias as seguintes etapas:

- a) Condicionamento do cartucho de SPE: a primeira etapa a ser realizada é a ativação do material da fase sólida contido no cartucho de SPE. Para isso, deve ser feita a passagem de um pequeno volume de solvente apropriado para umedecer o sorvente e garantir uma interação consistente entre analito(s) e fase sólida (Figura 1a);

- b) Aplicação da amostra: a amostra deve ser percolada pelo sorvente contido no cartucho de SPE em uma vazão pequena, otimizada e constante (Figura 1b);
- c) Lavagem do sorvente (*clean up*): nesta etapa os interferentes retidos na fase sólida são retirados por um solvente que tem o poder de dissolução suficiente para desorver materiais fracamente sorvidos, mas não espécies fortemente sorvidas (Figura 1c);
- d) Dessorção dos analitos: ao final do processo deve-se percolar o menor volume de solvente que garanta uma dessorção dos analitos quantitativa (Figura 1d).

Figura 1 – Etapas da extração em fase sólida. (a) condicionamento, (b) introdução da amostra, (c) lavagem do sorvente, (d) dessorção dos analitos.



Fonte: JARDIM, 2010 (Adaptado).

A eficácia da SPE está diretamente relacionada ao tipo de sólido utilizado como sorvente, sendo este o motivo dos inúmeros esforços dedicados ao desenvolvimento e caracterização de novos materiais adsorptivos (AUGUSTO et al., 2013). No passado, era comum se trabalhar com colunas cromatográficas recheadas com C_8 , C_{18} , materiais que apresentavam um equilíbrio hidrofílico-lipofílico etc. (ALBERTI et al., 2012). Entretanto, atualmente usam-se polímeros de impressão molecular (MIP), biosorventes, nanopartículas e CNTs (IBRAHIM et al., 2014).

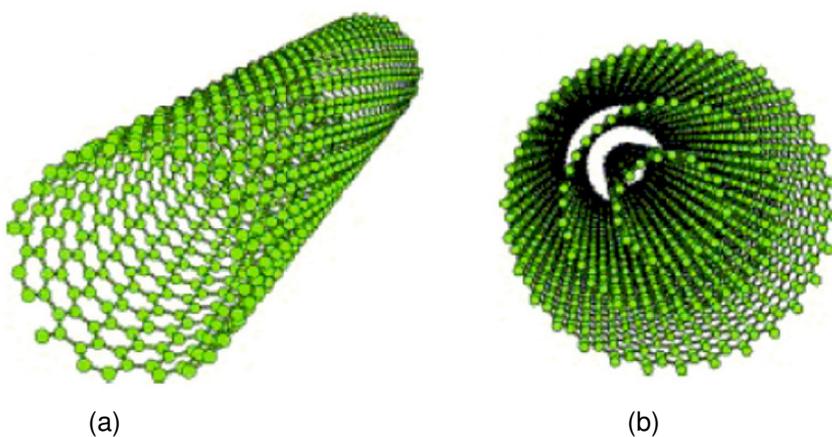
2.2 NANOTUBOS DE CARBONO (CNTs)

Almejando-se obter o controle sobre os processos industriais em nível atômico e molecular, vários estudos têm sido desenvolvidos ao longo das últimas décadas, culminando no surgimento de um novo ramo da Ciência: a nanotecnologia (HERBST; MACÊDO; ROCCO, 2004). Várias são as possibilidades de materiais nanométricos, mas um dos principais exemplos são os nanotubos de carbono (FILHO; FAGAN, 2007).

Em 1985, Kroto, Smalley e Curl descobrem os fulerenos (KROTO et al., 1985). Seis anos depois, em 1991, Iijima (1991) por meio da pirólise de grafite em plasma sob atmosfera controlada de hélio sintetiza pela primeira vez os CNTs. Estes novos materiais se mostraram altamente versáteis, transpondo barreiras e cruzando fronteiras de várias áreas, tais como, Física, Química, Biologia, Ciência dos Materiais e Farmacologia (FILHO; FAGAN, 2007).

Os CNTs são caracterizados pelo enrolamento concêntrico de uma ou várias folhas de grafeno (arranjo bidimensional de átomos de carbono sp^2 em forma de hexágonos), apresentando uma cavidade oca (Figura 2) (SAITO; DRESSELHAUS; DRESSELHAUS, 1998; ZARBIN, 2007). Normalmente eles possuem um diâmetro variando de poucos angstroms a dezenas de nanômetros, podendo ter comprimento de alguns centímetros (DAI; MAU, 2001).

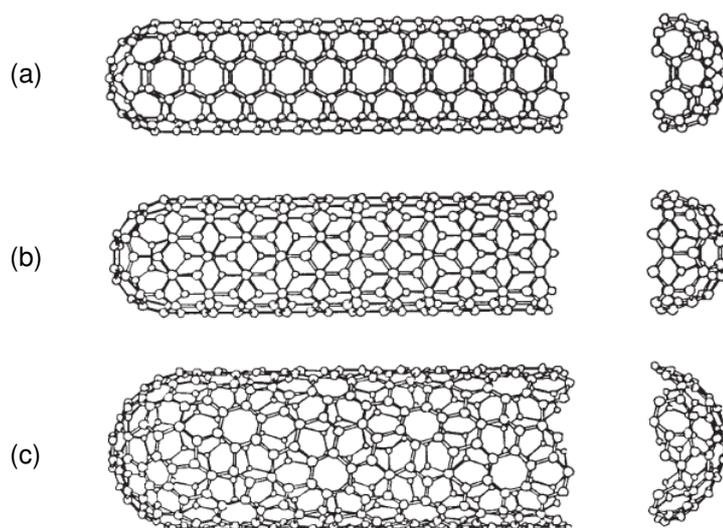
Figura 2 – Estrutura de nanotubos de carbono. (a) nanotubos de parede simples, (b) nanotubos de parede múltipla.



Fonte: ZARBIM, 2007.

Estruturalmente pode-se dividir os CNTs em duas categorias: os nanotubos de carbono de camada única (SWCNT – “*single-walled carbon nanotubes*”) (Figura 2a) e os nanotubos de carbono de camadas múltiplas (MWCNT – “*multi-walled carbon nanotubes*”) (Figura 2b) (ZARBIN, 2007). Os SWCNTs são formados por uma folha de grafeno enrolada onde há coincidência entre dois sítios cristalográficos equivalentes da rede hexagonal, sendo suas propriedades dependentes do diâmetro e ângulo quiral ou ângulo de helicidade, Φ (HERBST; MACÊDO; ROCCO, 2004; FILHO; FAGAN, 2007). Simetricamente, os SWCNT podem ter três estruturas quirais diferentes: “*armchair*”, “*zig-zag*” e “*chiral*” (Figura 3) (TERRONES, 2001). Por outro lado, os MWCNTs, que apresentam de 2 a 40 camadas concêntricas com diâmetro variando de 10 a 50 nm e comprimento maiores que 10 micrômetros, têm suas propriedades relacionadas à quantidade de camadas e diâmetro interno (ZARBIN, 2007). Essas variações estruturais apresentadas pelos CNTs faz com que estes possuam algumas propriedades diferenciadas, como maior módulo de elasticidade, transporte de elétrons distintos, alta estabilidade térmica e grande área superficial (CAI et al., 2003).

Figura 3 – Geometrias dos nanotubos de carbono de camada simples (SWCNT). (a) *armchair*, (b) *zig-zag*, (c) *chiral*.



Fonte: EKLUND; HOLDEN; JISHI, 1995.

Atualmente, os CNTs, principalmente os MWCNTs, têm sido usados como sorventes em SPE por possuírem elevada capacidade adsortiva (WEN et al., 2014). Esse fato se justifica por sua elevada área superficial, habilidade

em estabilizar as interações do tipo $\pi - \pi$ e excelentes estabilidades química, mecânica e térmica (LIANG et al., 2014). Ainda de acordo com os autores supracitados, estas características apresentadas pelos CNTs expandem sua aplicabilidade para SPE tanto para compostos apolares (caso se trabalhe com CNTs não-funcionalizados) quanto para compostos polarizados (caso haja uma funcionalização dos CNTs).

Yu et al. (2014), por exemplo, desenvolveram um nanosorvente a base de polietileno glicol modificado magneticamente com CNTs para ser empregado em SPE, objetivando identificar metilprednisolona em plasma de ratos, por meio de duas etapas: a primeira consistindo no preparo do nanosorvente e a segunda na análise biológica.

Nota-se que embora os CNTs sejam eficientes na análise de fármacos, os mesmos têm sua aplicabilidade limitada em extrações a partir de fluidos proteicos, como sangue total, soro e plasma sanguíneos pelo simples fato de que eles podem ser bloqueados pelas proteínas existentes na amostra (ZHOU et al., 2013). Nesse sentido, uma alternativa para se analisar amostras biológicas sem qualquer interferência negativa de macromoléculas é se utilizar de materiais de acesso restrito (SOVERAIN; RUDAZ; VEUTHEY, 2004).

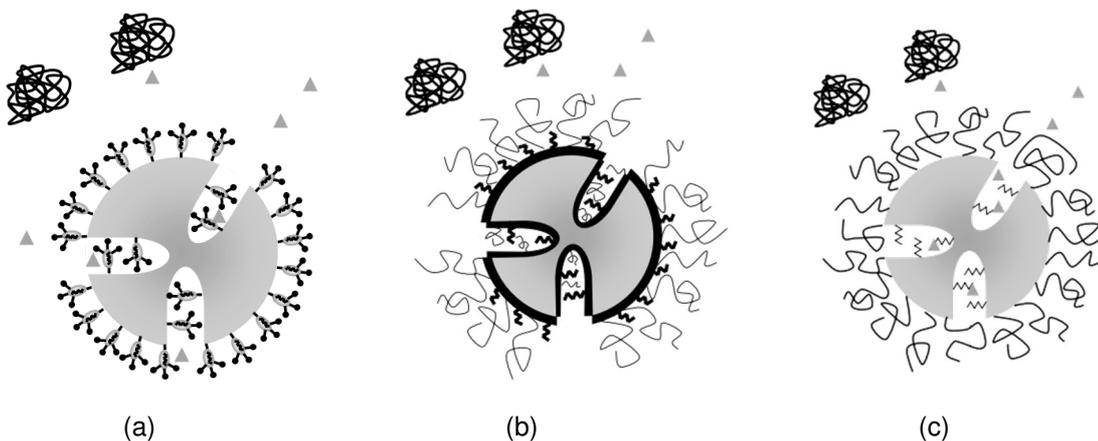
2.3 MATERIAIS DE ACESSO RESTRITO (RAMs)

A análise de substâncias contidas em fluidos biológicos não é uma tarefa simples visto que os analitos estão dispersos em matrizes complexas, sendo, portanto, necessária uma preparação da amostra para retirada de interferentes como, por exemplo, proteínas antes da efetivação do procedimento (XU et al., 2010). Nesse sentido, há aproximadamente três décadas foram reportados na literatura científica os primeiros estudos, realizados por Hagestam e Pinkertom (1985), utilizando-se de adsorventes denominados de materiais de acesso restrito que extraem moléculas de baixo peso molecular e eliminam as moléculas de alto peso molecular (SADÍLEK; SATÍNSKÝ; SOLICH, 2007).

Os RAMs possuem poros que permitem a passagem de pequenas moléculas que ficam retidas em uma camada interna da coluna cromatográfica constituída por grupamentos hidrofóbicos ou outros grupos funcionais enquanto que as maiores são excluídas pela camada externa do mesmo que normalmente é composta por grupos hidrofílicos (LEON-GONZALEZ et al., 2005; VINTILOIU et al., 2005). O tamanho dos poros varia de 6 a 8 nm (SOVERAIN; RUDAZ; VEUTHEY, 2004; BOOS; GRIMM, 1999).

A exclusão dessas macromoléculas pelos RAMs pode ser explicada por dois fatores: por uma barreira física, ou seja, o seu tamanho ser superior ao do poro ou por uma barreira química, podendo esta ser formada por uma rede polimérica hidrofílica ou por proteínas (HU et al., 2014; WANG et al., 2014) (Figura 4). Segundo Sadílek, Satínský e Solich (2007) há cinco tipos de RAMs que são agrupados de acordo com a natureza da barreira e da estrutura superficial do adsorvente: fases funcionais mistas e materiais de zona dupla, empacotamento de fase reversa da superfície interna, fase hidrofóbica protegida, superfícies semipermeáveis e materiais poliméricos.

Figura 4 – Mecanismos de exclusão de macromoléculas pelos RAMs: (a) barreira física, (b) barreira química, (c) recobrimento com proteínas.



Fonte: SOVERAIN; RUDAZ; VEUTHEY, 2004.

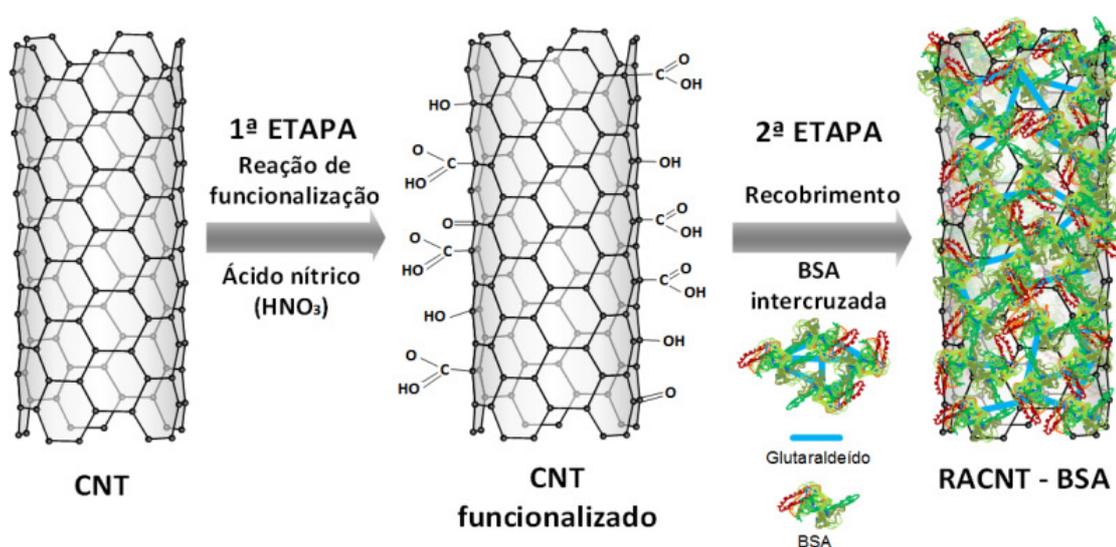
Devido as suas excelentes propriedades extratoras, os RAMs estão sendo utilizados amplamente em análises cromatográficas para amostras biológicas pré-tratadas (WANG et al., 2014). Hu et al. (2014), por exemplo, analisaram peptídeos do soro humano; Sato et al. (2008) determinaram drogas básicas em plasma; Song et al. (2014) verificaram a presença de pesticidas em leite e também distinguiram

enantiômeros em uma mistura racêmica de fármacos em plasma humano. Contudo, há de se destacar que estes adsorventes quando empregados em sistemas *online* permitem a injeção direta de amostras biológicas não tratadas (RIEUX et al., 2007). Nessa perspectiva, o trabalho em conjunto dos RAMs com os CNTs mostra-se bastante promissor na análise de amostras complexas (GOMES et al., 2016).

2.3.1 Nanotubos de carbono de acesso restrito (RACNTs)

Tentando otimizar extrações em fluidos biológicos, Figueiredo et al. (2014) conseguiram sintetizar um novo adsorvente denominado nanotubos de carbono de acesso restrito (RACNTs), onde houve a unificação dos benefícios dos CNTs e dos RAMs. Basicamente a síntese deste material consiste em recobrir CNTs funcionalizados com camadas de proteínas, no caso, a albumina de soro bovino (BSA), utilizando glutaraldeído que, nesta circunstância, atua como um agente de ligação cruzada (BARBOSA et al., 2015) (Figura 5).

Figura 5 – Síntese dos nanotubos de carbono de acesso restrito.

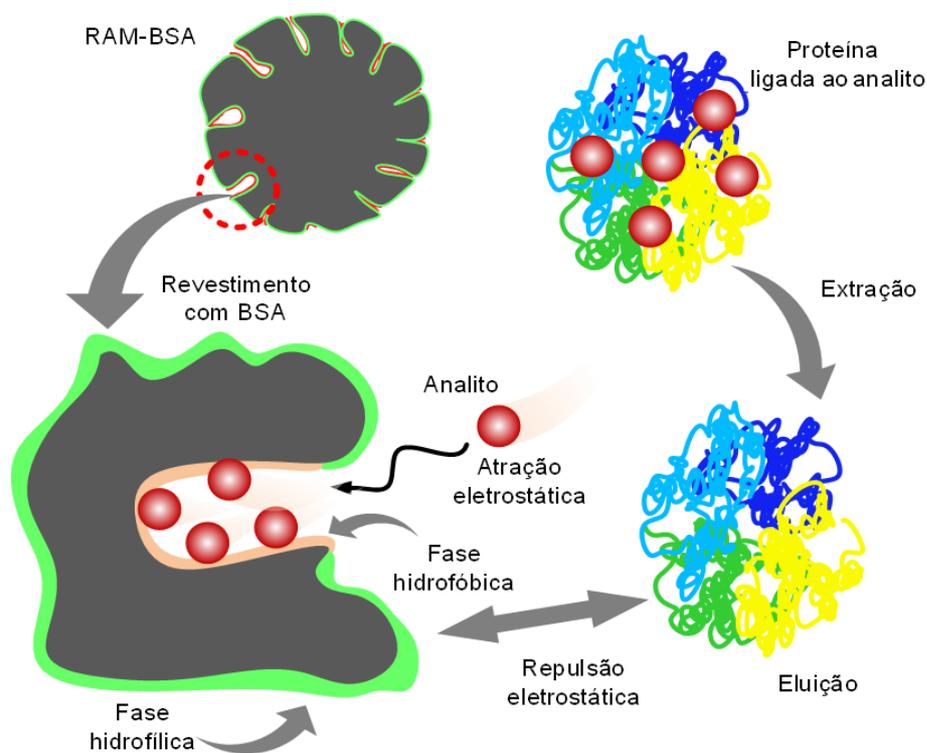


Fonte: GOMES, 2016.

O mecanismo de exclusão das macromoléculas contidas nos fluidos biológicos se dá por meio da repulsão eletrostática, visto que tanto a amostra quanto a camada de BSA estão carregadas negativamente (GOMES et al., 2016) (Figura 6).

Por ser um material adsorvente novo, a literatura reporta sua aplicabilidade a compostos inorgânicos contidos em soro sanguíneo humano, como por exemplo, Cd^{2+} e Pb^{2+} (BARBOSA et al., 2015; BARBOSA et al., 2016). Contudo, segundo os autores supracitados, a utilização destes materiais pode ser estendida, porém estudos de adsorção sobre os mesmos são necessários uma vez que a natureza do analito interfere diretamente na capacidade adsortiva dos RACNTs.

Figura 6 – Mecanismo de exclusão de proteínas pelos nanotubos de carbono de acesso restrito.



Fonte: GOMES, 2016.

2.4 ESTUDOS DE ADSORÇÃO

O processo físico-químico no qual tem-se a transferência de um determinado composto (adsorvato) disperso em um meio fluido, podendo este ser líquido ou gasoso, para uma superfície sólida (adsorvente) é denominado de adsorção (SANTOS et al., 2015). Esta pode se dá de duas maneiras: **i)** quando há formação de interações do tipo não covalente entre adsorvato-adsorvente a adsorção é física, **ii)** porém quando as forças envolvidas são do tipo

covalentes a adsorção é química e, neste caso, as energias envolvidas são tão elevadas quanto a de uma ligação química (DABROWSKI, 2001; CORNÉLIO, FERRUA; GUERREIRO, 2004).

A adsorção por ser um fenômeno superficial efetiva-se quando o adsorvato migra do meio fluido, estando este numa concentração maior que a do adsorvente, até a interface fluido-sólido, onde a partir dali haverá sua difusão por entre os poros do material até encontrar os sítios ativos (MCCABE; SMITH; HARRIOTT, 1993). Entretanto, a área superficial, porosidade, concentração inicial do analito, temperatura, pH, polaridade e natureza do adsorvato/adsorvente são fatores que influenciam diretamente na eficiência dos processos de adsorção (GOTTIPATI; MISHRA, 2010; TERZYK, 2001).

Nesse sentido, de acordo com Foo e Hamedd (2010) para se ter uma melhor compreensão deste processo é imprescindível que estudos cinéticos e de equilíbrio sejam efetivados.

2.4.1 Cinética de adsorção

Os estudos cinéticos de adsorção para sólidos porosos são realizados com o intuito de verificar o tempo necessário para que o equilíbrio adsorvato-adsorvente seja alcançado (MORENO-CASTILHA, 2004). Após o mesmo ser atingido, calcula-se a parcela de analito adsorvida pelo material de acordo com a equação 1 (DOS SANTOS et al., 2012):

$$q = \frac{(C_o - C_f) \cdot V}{m} \quad (1)$$

onde q (mg g^{-1}) é a quantidade de adsorvato retida por grama de material, C_o (mg L^{-1}) a concentração de adsorvato inicial em solução, C_f (mg L^{-1}) a concentração final de adsorvato em solução, V (L) o volume da solução do adsorvato e m (g) a massa de adsorvente. Há de se ressaltar que em alguns casos é bastante pertinente a indicação do percentual em massa de analito adsorvido, sendo este determinado conforme a equação 2 (AHMED; DHEDAN, 2012):

$$\% \text{ Ads} = \frac{(C_o - C_f) \cdot 100}{C_o} \quad (2)$$

Para se chegar a conclusões mais precisas a respeito da cinética de adsorção utiliza-se de modelos matemáticos (Tabela 1) que ao serem aplicados nos dados experimentais, permitem a tomada de decisões mais exatas e confiáveis (CARDOSO et al., 2011).

Tabela 1 – Modelos cinéticos de adsorção.

Modelos cinéticos	Equações não lineares
Pseudo-primeira ordem	$q_t = q_e[1 - \exp(-k_1t)]$
Pseudo-segunda ordem	$q_t = \frac{k_2q_e^2t}{1 + k_2q_e t}$
Quimissorção	$q_t = \frac{1}{\beta} \text{Ln}(\alpha\beta) + \frac{1}{\beta} \text{Ln}(t)$
Ordem fracionária	$q_t = q_e\{1 - \exp[-(k_{AV}t)]^{n_{AV}}\}$
Difusão intrapartícula	$q_t = k_{id} \sqrt{t} + C$

Fonte: CARDOSO et al., 2011.

Notas: q_t : 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; α : velocidade inicial de adsorção da equação de Elovich; β : constante de Elovich relacionada a extensão da cobertura de superfície e também para a energia de ativação envolvida na quimissorção; k_{AV} : constante cinética de Avrami; n_{AV} : reação de ordem fracionária (Avrami) relacionada ao mecanismo de adsorção; k_{id} : constante de velocidade da difusão intrapartículas.

2.4.1.1 Pseudoprimeira ordem

O ajuste matemático pelo modelo de pseudoprimeira ordem indica que a taxa de variação da adsorção do analito é diretamente proporcional a diferença entre o teor adsorvido ao se atingir o equilíbrio e a quantidade adsorvida com o tempo de análise (SHAWABKHE; TUTUNJI, 2003; KUMAR, 2006).

2.4.1.2 Pseudosegunda ordem

Este modelo apresenta como vantagens em comparação aos demais o fato de não requerer parâmetros prévios, a possibilidade de determinação da taxa de adsorção inicial assim como da constante da taxa de pseudosegunda ordem e, principalmente, a mensuração da capacidade adsorviva (HO, 2006). Segundo Kumar e Sivanesan (2006) este ajuste é amplamente utilizado em diversos sistemas quando se analisa todo o tempo de ocorrência da adsorção.

2.4.1.3 Quimissorção

O modelo de quimissorção, também conhecido por Elovich, admite que as interações adsorvato-adsorvente são químicas, fato este que proporciona tempos menores para que o estado de equilíbrio seja alcançado (ELOVICH; ZHABROVA, 1939). Geralmente é utilizado na descrição do processo de adsorção de gases, contudo, a literatura reporta alguns sistemas sólidos ou mesmo soluções sendo ajustados por este modelo (HO, 2006). Em ambos os casos, a superfície do material adsorvente é heterogênea (QIU et al., 2009; WU; TSENG; JUANG, 2009; BEHNAMFARD; SALARIRAD, 2009).

2.4.1.4 Ordem fracionária

O modelo de ordem fracionária diferentemente dos demais pressupõe a existência de vários mecanismos de adsorção que se modificam a medida em que se efetiva o contato entre o adsorvato e o adsorvente (LOPES et al., 2003). Essa multiplicidade de mecanismos sugere uma heterogeneidade da superfície do material, sendo esta indicada na expressão do modelo como o expoente de Avrami (n_{AV}) (GAY et al., 2010).

2.4.1.5 Difusão intrapartículas

O modelo da difusão intrapartículas permite inferir sobre a resistência na transferência de massa do adsorvato pelos sítios ativos do adsorvente (ROYER et al., 2009). Do ponto de vista mecânico, pode-se ter três tipos de difusão: a superficial, a externa e a interna (ARIVOLI; HEMA; BARATHIRAJA, 2008). Neste último caso, a análise gráfica ($q_t \times t^{0.5}$) indica se o processo está acontecendo de forma linear ou multilinear (SILVA et al., 2016).

2.4.2 Isotermas de adsorção

Isotermas de adsorção são ferramentas experimentais que permitem estudar profundamente as formas de adsorção dos analitos pelo adsorvente, além de fornecer uma estimativa da quantidade máxima de adsorvato retida pelo material (MORENO-CASTILHA, 2004). Essa otimização na extração das substâncias acontece a partir do momento em que o sistema entra em equilíbrio a uma dada temperatura (BEHNAMFARD; SALARIRAD, 2009).

A forma das isotermas é bastante variada, entretanto, todas possuem o mesmo objetivo que é fornecer informações para subsidiar a tomada de decisões sobre o processo de adsorção (MARSH; RODRIGUEZ-REINOSO, 2006). A

construção das isotermas implica na compreensão de modelos matemáticos que podem se pautar nos aspectos de linearidade ou não linearidade (Tabela 2) (FOO; HAMEED, 2010).

Tabela 2 – Modelos de isoterma de adsorção.

Modelos de isoterma	Equações não lineares
Langmuir	$q_e = \frac{q_s K_L C_e}{1 + K_L C_e}$
Freundlich	$q_e = K_F C_e^{1/n_s}$
Sips	$q_e = \frac{q_s K_s C_e^{1/n_s}}{1 + K_s C_e^{1/n_s}}$
Khan	$q_e = \frac{q_s b_K C_e}{(1 + b_K C_e)^{a_K}}$
Redlich-Peterson	$q_e = \frac{K_R C_e}{1 + a_R C_e^g} \quad \text{onde } 0 \leq g \leq 1$
Toth	$q_e = \frac{K_T C_e}{(a_T + C_e)^{1/t}}$

Fonte: FOO; HAMEED, 2010.

Notas: q_e : quantidade de analito adsorvido no equilíbrio por grama de material; q_s : capacidade de saturação teórica; K_L : constante de afinidade de Langmuir; C_e : concentração de analito no equilíbrio; K_F e n_F : constante e expoente do modelo de Freundlich, respectivamente; K_s e n_s : constante e expoente do modelo de Sips, respectivamente; a_K e b_K : constante e expoente do modelo de Khan, respectivamente; K_R e a_R : constantes do modelo de Redlich-Peterson; g : expoente do modelo de Redlich-Peterson; K_T e a_T : constantes da isoterma de Toth; t : expoente do modelo de Toth.

2.4.2.1 Isoterma de Langmuir

O modelo de Langmuir é um clássico que consegue descrever inúmeras situações, partindo-se do pressuposto de que ele se aplica a processos adsorptivos que ocorrem com formação de monocamadas em uma superfície homogênea (LANGMUIR, 1918). Nesse caso, a adsorção se processa no limiar dos sítios ativos disponíveis, sendo facilitada pela ausência de interações laterais e impedimento estérico (FOO; HAMEED, 2010). Uma característica marcante deste tipo de isoterma é a existência de um ponto de saturação, indicando que a capacidade adsorptiva do material foi atingida (ROYER et al., 2009).

2.4.2.2 Isoterma de Freundlich

A isoterma de Freundlich indica que a adsorção dos analitos se dá sob uma superfície heterogênea com a formação de multicamadas (FREUNDLICH, 1906). A heterogeneidade do adsorvente sugere a existência de sítios ativos com energias diferenciadas, o que acaba gerando uma prioridade na ocupação daqueles sítios de maior energia, ocasionando, assim, uma queda na força de ligação (LIU; LIU, 2008). Vale destacar que este modelo é bastante eficiente na descrição da adsorção tanto para compostos orgânicos quanto para aqueles de elevada afinidade pelo carvão ativado desde que suas concentrações assumam valores baixos (FOO; HAMEED, 2010; AHMED; DHEDAN, 2012).

2.4.2.3 Isoterma de Sips

A isoterma de Sips é um modelo intermediário entre os dois descritos anteriormente que otimiza as suas vantagens e minimiza algumas desvantagens, como por exemplo, a restrição que a isoterma de Freundlich possui de ser aplicada a solutos em baixa concentrações (GHAZNAVI; FATEMI; JODA, 2012). Por ser um

modelo misto, o mesmo se aproximará do comportamento de Langmuir e de Freundlich quando o adsorvato estiver em altas e pequenas concentrações, respectivamente (FOO; HAMEED, 2010). Contudo, o ajuste por Sips permite inferir que a superfície do adsorvente é exclusivamente heterogênea (SILVA et al., 2016).

2.4.2.4 Isoterma de Khan

O modelo de Khan para isoterma é muito aplicável a substâncias aromáticas adsorvidas por carvão ativado, por exemplo (LIU; LIU, 2008; DONNAPERNA et al., 2009). Ele consiste numa generalização dos processos adsorptivos que ocorrem em soluções puras (FOO; HAMEED, 2010).

2.4.2.5 Isoterma de Redlich-Peterson

A isoterma de Redlich-Peterson é altamente precisa se comparada as duas primeiras descritas nesta sessão, porém dependente de uma função linear em seu numerador e de uma exponencial no denominador (REDLICH; PETERSON, 1959). Por se tratar de um modelo intermediário o mesmo engloba características mistas das isotermas de dois parâmetros: **i)** em termos energéticos ela se ajusta satisfatoriamente tanto para superfícies homogêneas quanto para heterogêneas; **ii)** em altas concentrações ela tende a se aproximar do modelo de Freundlich, ao passo que em baixas concentrações do de Langmuir (GIMBERT et al., 2008).

2.4.2.6 Isoterma de Toth

Este modelo ajusta-se perfeitamente a materiais adsorventes cuja superfície é heterogênea (TOTH, 1971). Devido sua distribuição energética ser quase uma gaussiana os sítios ativos de baixa energia são os que possuem as energias de

adsorção máximas (VIJAYARAGHAVAN et al., 2006). A grande vantagem desta isoterma é de ser aplicável a sistemas cujo intervalo de concentração é grande (HO; PORTER; MCKAY, 2002).

2.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

A cromatografia é uma técnica físico-química de separação na qual os componentes de uma mistura se distribuem em duas fases, a móvel e a estacionária, sendo a amostra sempre dissolvida na fase móvel que posteriormente é passada pela fase estacionária, ocorrendo, dessa forma, interações entre o(s) analito(s) e os constituintes da fase estacionária (SKOOG et al., 2006). Normalmente, a fase estacionária é composta por substâncias que se encontram no estado sólido, enquanto que a fase móvel pode estar nos estados de agregação líquido e gasoso, fato este que fez surgir as mais variadas nomenclaturas para a técnica, como por exemplo, cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

A HPLC é uma técnica que está sendo usada em larga escala por diversos pesquisadores devido à série de vantagens que possui se comparado as técnicas tradicionais de cromatografia, tais como, obtenção de dados tanto qualitativos quanto quantitativos, alta sensibilidade e a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis (TONHI et al., 2002). Entretanto, deve-se ressaltar que a HPLC apresenta um elevado custo para ser executada, além de se utilizar de altas quantidades de solventes e possuir colunas que podem ser sensíveis a extremas faixas de pH (LOESCHER et al., 2014).

Snyder, Kirkland e Glajch (1997) afirmam que as amostras a serem analisadas por HPLC podem ser classificadas em inorgânicas ou orgânicas (incluindo as biológicas), podendo estas serem subdivididas em sólidas, semi-sólidas (cremes, géis, suspensões e coloides), líquidas ou gasosas. Diante dessa diversidade de amostras possíveis de serem tratadas por HPLC, faz-se necessário a realização de estudos minuciosos sobre o tipo de coluna cromatográfica a ser usada na separação, ou seja, é preciso compreender como se dá a interação entre o

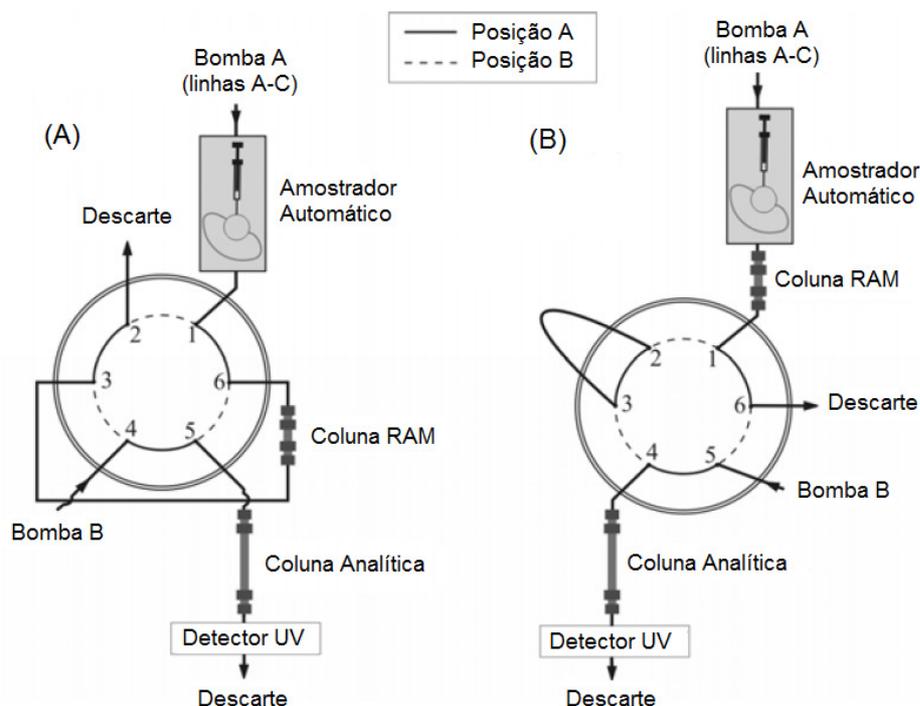
analito e a fase estacionária e como aperfeiçoar sua extração (CAMENZULI; RITCHIE; SHALLIKER, 2013).

2.5.1 *Column switching*

A técnica de *column switching* foi desenvolvida para melhorar a separação de analitos que se encontram no mesmo fluxo de fase móvel passando por colunas diferentes, uma vez que estes, por estarem contidos em matrizes complexas, podem danificá-las caso sua inserção proceda sem um pré-tratamento (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). Normalmente os equipamentos que trabalham com essa técnica possuem duas colunas de separação por onde as amostras serão carregadas, sendo estas inseridas nas colunas por meio de bombas injetoras (CHEN; YEN; LEE, 2010). O fluxo de amostra que entra nas colunas é controlado por válvulas automáticas, assim como os resíduos eliminados após a extração (ZHANG et al., 2014).

Nos sistemas de *column switching* que se utilizam de uma válvula de seis vias e duas posições, os modos de operação podem ser em *backflush* ou *foreflush* (Figura 7) (SANTOS NETO, 2007). No modo *backflush* (Figura 7a), no período em que o sistema estiver na posição A, a bomba A impulsionará água pelo amostrador rumo a coluna extratora (neste caso, uma coluna RAM) ao mesmo tempo em que a bomba B injeta fase móvel que percorre a coluna analítica; todavia, ao se trocar a posição A para a posição B, a fase móvel será injetada na coluna RAM no seu sentido inverso, direcionando todos os analitos para o detector; Já no segundo caso (Figura 7b), a posição A é análoga ao modo *backflush*, entretanto, aqui temos a presença de uma válvula seletora de solventes que ao ser acionada gira o sistema para posição B, permitindo a passagem de fase móvel pela bomba A que a impulsiona para a coluna RAM no mesmo sentido que a fase móvel anterior, eluindo todos os analitos que serão detectados posteriormente (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

Figura 7 – Modos de operação do sistema de *column switching* (A) *backflush* e (B) *foreflush*, usando uma válvula seletora de seis vias e duas posições.



Fonte: SANTOS NETO, 2007.

Há de ressaltar que a característica excludente do *column switching* somada à escolha adequada de uma boa fase estacionária são as responsáveis pela vasta aplicabilidade da metodologia pela indústria farmacêutica, como por exemplo, em análises de fármacos (MORAES et al., 2013).

2.6 ANTICONVULSIVANTES

Pesquisas realizadas na década passada estimam que cerca 1,5% da população mundial é acometida por epilepsia, uma doença neurológica caracterizada por crises corriqueiras devido a uma excessiva atividade desregulada do Sistema Nervoso Central (SNC) (COGNATO et al., 2007; DELUCIA et al., 2007). Browne e Holmes (2001) já indicavam em seus estudos que cerca de 3 a 4% das pessoas epiléticas convivem com os sintomas durante toda a vida. Na terapêutica desta enfermidade é muito comum se utilizar fármacos pertencentes à classe dos anticonvulsivantes também conhecidos por antiepilépticos (OLIVEIRA et al., 2013).

Contudo, a aplicabilidade dessas substâncias se estende ao tratamento de inúmeros distúrbios neurológicos e psiquiátricos, ao controle da ansiedade e de dores neuropáticas (AHMED; SIDDIQI, 2006; ZWANZGER; ESER; RUPPRECHT, 2007; NASREDDINE; BEYDOUN, 2007).

Diante de uma crise, um anticonvulsivante funcionará suprimindo a rápida e excessiva ação dos neurônios, evitando que a convulsão se espalhe pelo cérebro, o que poderia causar sérios prejuízos ao organismo (DELUCIA et al., 2007). É preciso destacar que a supressão citada varia de acordo com a classe de fármacos anticonvulsivantes (GOODMAN; HARDMAN; LIMBIRD, 2006). O mecanismo de ação dos barbitúricos, por exemplo, ocorre por meio da interação que há entre eles e os receptores GABA presentes nas membranas das células neurais do SNC (MCNAMARA, 2011).

Atualmente há uma grande variedade de anticonvulsivantes disponíveis no mercado que podem ser prescritos como medicação por profissionais da saúde (COGNATO et al., 2007). Entretanto, apesar dos benefícios já descritos sobre esses fármacos há de se ressaltar que o seu uso deve ser consciente, visto que os mesmos podem acarretar alguns efeitos colaterais, tais como, constipação, náuseas ou vômitos leves, tonturas e sonolência (GOODMAN; HARDMAN; LIMBIRD, 2006). Além dessas implicações, é importante destacar que a periculosidade desses fármacos frente ao consumo desregulado pelas pessoas se dá pela proximidade que há entre a dose na qual começa a intoxicação e aquela que produz efeitos terapêuticos desejáveis (OLIVEIRA et al., 2013).

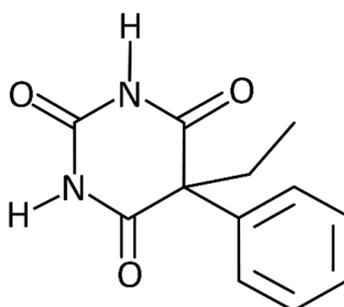
Esta classe de fármacos está subdividida em três grupos: os de primeira geração (fenitoína, carbamazepina, fenobarbital, diazepam, e valproato de sódio), os de segunda geração (lamotrigina, vigabatrina, tiagabine, topiramato e leviracetam) e os de terceira geração (pregabalina e gabapentina) (SMITH; WILCOX; WHITE, 2007; CORDIOLI; GALLOIS; ISOLAN, 2015).

2.6.1 Fenobarbital

O fenobarbital (FEN) (Figura 8) é um fármaco com propriedades antiepilépticas, sedativas e hipnóticas, sendo obtido a partir do ácido barbitúrico pela

substituição de um hidrogênio ligado ao carbono 5 do ciclo por um grupo fenila (GUERREIRO, 2006). Sua indicação se dá em crises tônico-clônicas generalizadas, crises parciais simples, crises convulsivas do período neonatal, em crianças e no tratamento do *status epilepticus*, de convulsões febris e da síndrome de abstinência em crianças nascidas de mães adeptas aos opiáceos (VARONA; ESCRIBANO; MARTÍN-CALDERÓN, 2001; ROCHA; BATISTA; NUNES, 2004).

Figura 8 – Estrutura química do fenobarbital.



Fonte: Do autor.

O FEN age ligando-se ao sítio alostérico no receptor ácido α – aminobutírico (GABA), potencializando a ação da GABA endógeno por aumentar a duração de abertura dos canais de íons cloreto (GUERREIRO, 2006). A sua meia vida varia de acordo com a faixa etária do paciente: no período neonatal ela é superior a 100 horas, nas crianças entre 1 e 5 anos é igual a 69 horas e nos adultos varia de 80 a 100 horas, sendo que o ápice de sua concentração no sangue se dá entre 8 e 12 horas (YACUBIAN, 2002; PILAU et al., 2008). Uma característica inerente a este fármaco é sua estreita faixa terapêutica e elevado grau de toxicidade: concentrações plasmática entre 10 a 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ causam efeitos benéficos no organismo, porém concentrações superiores a 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ levam o paciente ao coma e até mesmo a morte (REPETTO; REPETTO, 2015).

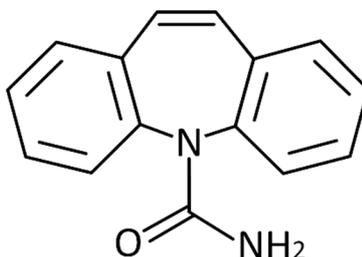
2.6.2 Carbamazepina

A carbamazepina (CAR) (Figura 9) é um fármaco utilizado no tratamento da epilepsia, da nevralgia do trigêmeo, de doenças depressivas e de crises convulsivas

generalizadas tônico-clônicas (GOODMAN; HARDMAN; LIMBIRD, 2006). Estruturalmente, sua molécula é tricíclica, sendo derivada do iminoestilbeno com um grupo carbamil na posição 5 (GALVÃO, 2009). Sua descoberta se deu por acaso em 1960 pelo químico Walter Schindler que objetivava encontrar um composto com propriedades antipsicóticas semelhantes à clorpromazina (SIMON; BROWN, 2000).

O mecanismo de ação da CAR não é conhecido em sua totalidade, contudo, sabe-se que ela estabiliza a membrana do nervo hiperexcitado, fato este que bloqueia as descargas neuronais repetitivas e diminui a propagação sináptica dos impulsos excitatórios (LIMA, 2002). A meia vida deste fármaco é de 48 horas quando ingerido em dose única, entretanto, este tempo cai drasticamente após um uso prolongado (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2013). Como todo anticonvulsivante, a CAR apresenta uma alta proximidade entre a janela terapêutica (3 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e a concentração sanguínea tóxica (superior a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (REPETTO; REPETTO, 2015).

Figura 9 – Estrutura química da carbamazepina.



Fonte: Do autor.

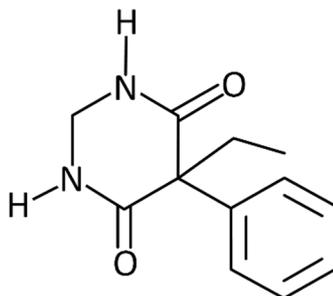
2.6.3 Primidona

A primidona (PRI) (Figura 10) é um anticonvulsivante utilizado no tratamento de pacientes acometidos por convulsões parciais ou tônico-clônicas (GUIMARÃES; MOURA; SILVA, 2006). O uso deste fármaco data dos anos 50, sendo os seus efeitos terapêuticos dependentes de dois metabólitos ativos: a feniletilmalonamida e o fenobarbital (LEOD, 2008).

O mecanismo de ação da PRI está relacionado aos seus metabólitos, principalmente ao FEN, logo o mesmo se dá pela potencialização do GABA, um

neurotransmissor de inibição (ALMEIDA; BERGOLD, 2002). Seu tempo de meia vida está entre 5 e 18 horas, sendo este prolongado pela metabolização do FEN e, assim como os demais anticonvulsivantes há uma proximidade entre sua faixa terapêutica (5 a 10 mg L⁻¹) e a concentração tóxica (superior a 15 mg L⁻¹) (GUIMARÃES; MOURA; SILVA, 2006; REPETTO; REPETTO, 2015).

Figura 10 – Estrutura química da primidona.



Fonte: Do autor.

3 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral desenvolver um método de análise direta dos fármacos anticonvulsivantes fenobarbital, carbamazepina e primidona a partir de plasma sanguíneo humano em um sistema de *column switching*, empregando RACNTs como material extrator.

Para que isso fosse possível, foi necessário alcançar os seguintes objetivos específicos:

- Sintetizar os RACNTs;
- Avaliar o desempenho do RACNTs em termos de extração dos analitos em plasma sanguíneo humano e exclusão de proteínas;
- Realizar estudos cinéticos e de equilíbrio a respeito da capacidade adsorptiva dos RACNTs para o fármaco primidona;
- Otimizar as condições cromatográficas para separação de FEN, CAR e PRI;
- Otimizar as condições de um sistema *column switching*, empregando colunas de RACNTs para a análise direta de FEN, CAR e PRI em plasma sanguíneo humano;
- Validar a metodologia de acordo com os parâmetros linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e limite de detecção;
- Aplicar o método em análises de amostras reais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta sessão há um detalhamento sobre os equipamentos, reagentes, síntese e caracterização dos RACNTs, otimização das condições cromatográficas, coleta de amostras e validação do método.

4.1 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos e acessórios utilizados são listados a seguir:

- Vidrarias apropriadas;
- Freezer (Brastemp[®], Brasil);
- Sistema Milli-Q (Millipore[®], EUA);
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Shimadzu[®], Japão);
- Coluna C₁₈ (250 mm x 4,6 mm) (Macherey-Nagel[®], Alemanha);
- Balança analítica (Shimadzu[®], Japão);
- Potenciômetro (Quimis[®], Brasil);
- Bomba a vácuo (New Pump[®], EUA);
- Filtro de celulose (Millipore[®], EUA);
- Lavadora ultra-sônica, modelo USC2800A (Unique[®], Brasil);
- Estufa S.E. (Fanem[®], Brasil);
- Manta aquecedora (Fisatam[®], Brasil);
- Cartucho de SPE (Supelco[®], EUA);
- Manifold (Lida[®], EUA);
- Micropipetas (Peguepet[®], Brasil; Digipet[®], Brasil);
- Seringa de injeção (Hamilton[®], EUA);
- Agitador vórtex (Fanem[®], Brasil);
- Centrífuga (Novatecnica[®], Brasil);
- Materiais de coleta de sangue: apoio para braço (Imer[®], Brasil), garrote (Labor import[®], Brasil), agulha (Greiner Bio-one[®], Brasil), adaptador para agulha (Injex[®], Brasil) e tubo com heparina (Greiner Bio-one[®], Brasil).

4.2 REAGENTES, PADRÕES E SOLVENTES

Os reagentes, padrões e solventes utilizados são listados a seguir:

- Fenobarbital ($\geq 99\%$) (Sigma-Aldrich[®], Alemanha);
- Carbamazepina ($\geq 98\%$) (Sigma-Aldrich[®], Alemanha);
- Primidona ($\geq 99\%$) (Sigma-Aldrich[®], Alemanha);
- Hidantoína ($\geq 97,5\%$) (Sigma-Aldrich[®], Alemanha);
- Metanol grau HPLC (Sigma-Aldrich[®], Alemanha);
- Nitrogênio gasoso (White Martins[®], Brasil);
- Água ultra pura (Millipore[®], EUA);
- Fosfato monopotássico (Microbioquímica[®], Brasil);
- Acetonitrila grau HPLC (Merck[®], Alemanha);
- Hidróxido de sódio (Vetec[®], Brasil);
- Nanotubos de carbono de múltiplas camadas (Sigma-Aldrich[®], EUA);
- Ácido nítrico (Vetec[®], Brasil);
- Albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich[®], Alemanha);
- Fosfato de sódio monobásico (Cinética Química[®], Brasil);
- Fosfato de sódio dibásico (CAAL[®], Brasil);
- Glutaraldeído (Sigma-Aldrich[®], Alemanha);
- Borohidreto de sódio (CAQ[®], Brasil);
- Ácido clorídrico (Êxodo Científica[®], Brasil).

4.3 PREPARO DE SOLUÇÕES

As soluções estoque de FEN, CAR, PRI e hidantoína (HID, padrão interno - PI), todas na concentração de $1,00 \text{ g L}^{-1}$, foram preparadas em metanol grau HPLC, acondicionadas em frasco âmbar, armazenadas a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e usadas por um prazo máximo de seis meses. Já as soluções de trabalho dos referidos fármacos nas suas diversas concentrações, foram preparadas pela evaporação do solvente mediante aplicação de gás nitrogênio com posterior diluição em água ultra pura. Estas

soluções foram acondicionadas em frascos âmbar, armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e utilizadas por um prazo máximo de um mês.

4.4 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS USADAS NOS TESTES DE CINÉTICA E ADSORÇÃO

O FEN, a CAR e a PRI foram determinados por meio da cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta (UV), empregando-se uma coluna C₁₈ Macherey-Nagel® (250 mm x 4,6 mm) e se utilizando de uma fase móvel composta por tampão fosfato monopotássico (KH₂PO₄) 0,01 mol L⁻¹ (pH = 6,0) : acetonitrila : metanol (55:25:20). A correção do pH foi feita com uma solução de NaOH 1% (m/v). Os parâmetros cromatográficos encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Parâmetros cromatográficos.

Parâmetros	Valores
	0,01 min → 0,80 mL min ⁻¹
Vazão da bomba A ^a	5,01 min → 1,60 mL min ⁻¹ 6,01 min → 1,80 mL min ⁻¹ 8,01 min → 2,40 mL min ⁻¹
Vazão da bomba B	1,00 mL min ⁻¹
Volume injetado	100,00 µL
Comprimento de onda	210 nm
Temperatura do forno	35 °C
Tempo	12,00 min

Fonte: Do autor.

Nota: ^a Entre 0,01 min e 5,00 min a vazão da bomba A se deu por meio de rampa.

Para otimizar essas condições cromatográficas empregou-se inicialmente as mesmas condições descritas por Liu et al. (1993). Entretanto, houve a necessidade

de fazer alterações em alguns parâmetros, como por exemplo, na proporção dos constituintes, vazão e pH da fase móvel, no comprimento de onda e na temperatura do forno. Ressalta-se que os critérios de otimização foram separação dos analitos, tempo de corrida e seletividade do método (FRANQUI, 2015).

4.5 EFEITO DO TRATAMENTO DOS CNTs NA RESPOSTA ANALÍTICA

A capacidade adsortiva do FEN, da CAR e da PRI nos CNTs foi verificada submetendo este material a dois tratamentos distintos – o aquecimento e a oxidação. No primeiro caso, 100 mg de CNTs comercial permaneceram por duas horas em estufa a 80 °C. Já o tratamento oxidativo se deu pela adição de 100 mg de CNTs comercial em 30,00 mL de HNO₃ 65%, sendo este aquecido a 120 °C por duas horas sobre refluxo (ZHIJIE et al., 1999). Após o aquecimento em ácido, o material foi filtrado, lavado com água ultrapura e deixado em estufa a 80 °C por duas horas para que o solvente fosse evaporado. Além desses dois tratamentos, os CNTs comercial também foram submetidos a um estudo de adsorção.

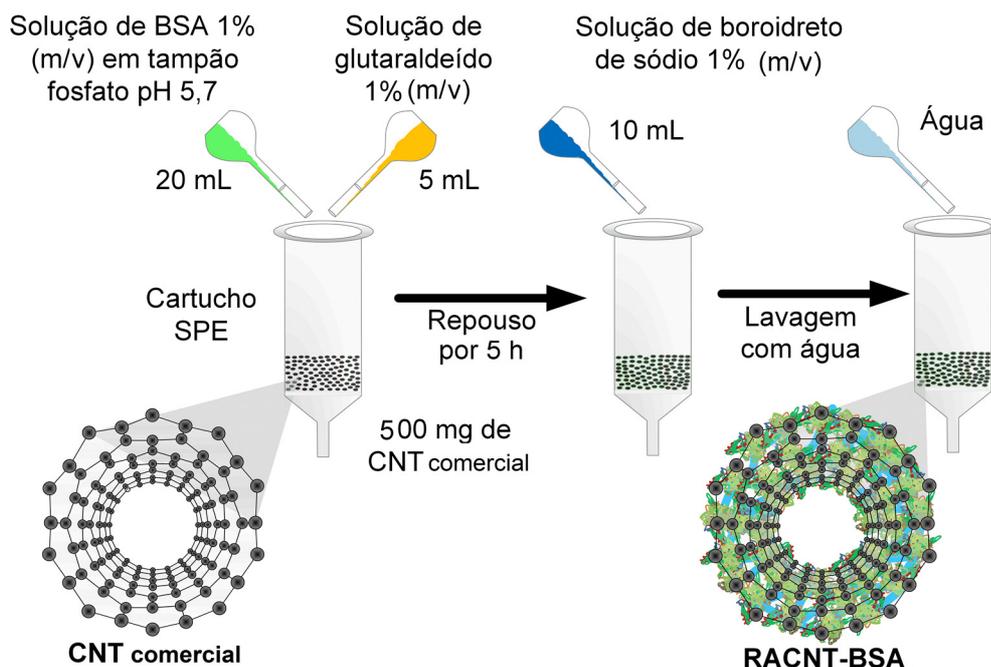
Após esse processo, cerca de 20 mg do material obtido em cada tratamento foram colocados em um cartucho vazio de SPE, acoplados em um *manifold*, por onde foi percolado 2,00 mL uma solução padrão aquosa mista dos fármacos na vazão de 1,00 mL min⁻¹, sendo a concentração de cada analito da ordem de 50,00 µg mL⁻¹. Posteriormente, o eluato foi filtrado e analisado, em triplicata, por HPLC.

4.6 SÍNTESE DOS RACNTs

Os CNTs comercial foram revestidos com uma camada de BSA de acordo com a proposta de Moraes et al. (2013). Cerca de 20,00 mL de BSA 1% (m/v) preparado em tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ (pH = 5,7) foi vertido em um cartucho de SPE, acoplado a um manifold, contendo 500 mg de CNTs comercial a uma taxa de 1,00 mL min⁻¹. Em seguida, 5,00 mL de solução aquosa de glutaraldeído 25% (m/v) foi percolada pelo cartucho a uma vazão de 1,00 mL min⁻¹. O sistema foi

deixado em repouso por 5 horas. Passado esse tempo, 10,00 mL de solução aquosa de borohidreto de sódio 1% (m/v) foi passada pelo material numa taxa de 1 mL min⁻¹. Ao final do processo houve uma intensa lavagem do cartucho com água (pH = 7,0) para que se eliminassem possíveis resíduos da síntese dos RACNTs (Figura 11).

Figura 11 – Síntese dos RACNTs.



Fonte: Adaptado de GOMES (2016).

4.7 TESTE DE ELIMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

Para que se efetivasse esse estudo, 25,00 µL de solução aquosa padrão de BSA 44,00 mg mL⁻¹ foi injetada dentro do sistema de HPLC sem a presença da coluna analítica, com o detector UV a 254 nm e usando tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹ (pH = 7,0) como fase móvel na vazão de 1,00 mL min⁻¹. O sinal obtido nessa análise corresponde a 100% da BSA. Posteriormente, uma coluna contendo 30 mg de CNTs comercial ou RACNTs foi acoplada no sistema de HPLC para que a mesma solução de BSA fosse injetada. A área do pico obtido nesta segunda análise dividida pela área do sinal de 100% da BSA correspondia a porcentagem de BSA eluída.

4.8 ESTUDOS CINÉTICOS DE ADSORÇÃO

Os estudos cinéticos de adsorção se efetivaram pela adição de 10 mg de RACNTs e 1,00 mL de solução aquosa de primidona 100,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a sete tubos de ensaio, sendo os mesmos agitados por 1, 5, 10, 15, 20, 25 ou 30 min a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C), seguido de centrifugação por 10 min a 1000 g. Os sobrenadantes foram separados dos precipitados e injetados no cromatógrafo para que se quantificasse a concentração de equilíbrio do fármaco. A parcela de adsorvato retida pelo material foi determinada de acordo com a equação 1.

Os dados obtidos foram tratados de acordo com os modelos cinéticos de pseudoprimeira ordem, pseudossegunda ordem, quimissorção (Elovich), ordem fracionária (Avrami) e difusão intrapartículas (LAGERGREN, 1898; HO; MCKAY, 1999; ELOVICH; ZHABROVA, 1939; CARDOSO et al., 2011; WEBER; MORRIS, 1963) (Tabela 1), levando-se em consideração o valor do coeficiente de correlação linear (R^2). Todos estes modelos foram plotados no modo não-linear, usando o software OriginPro 8.5 (OriginLab®, Reino Unido). A fim de se confirmar o melhor ajuste, foram avaliados estatisticamente os modelos baseando-se na função de erro (F_{error}) (equação 3), que correlaciona a quantidade teórica de fármaco adsorvido pelo material com aquela mensurada experimentalmente, considerando o número de parâmetros dos modelos (SKOOG et al., 2013; SILVA et al., 2016).

$$F_{\text{error}} = \sqrt{\left(\frac{1}{n-p}\right) \sum_i^n (q_{i,\text{exp}} - q_{i,\text{teórico}})^2} \quad (3)$$

onde n é o número de experimentos, p é o número de parâmetros do modelo, $q_{i,\text{exp}}$ é o valor de q medido experimentalmente e $q_{i,\text{teórico}}$ é o valor de q previsto pelo modelo.

4.9 CONSTRUÇÃO DAS ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

Para a construção das isotermas de adsorção, soluções aquosas de primidona de 100, 500, 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram preparadas. Pipetou-se

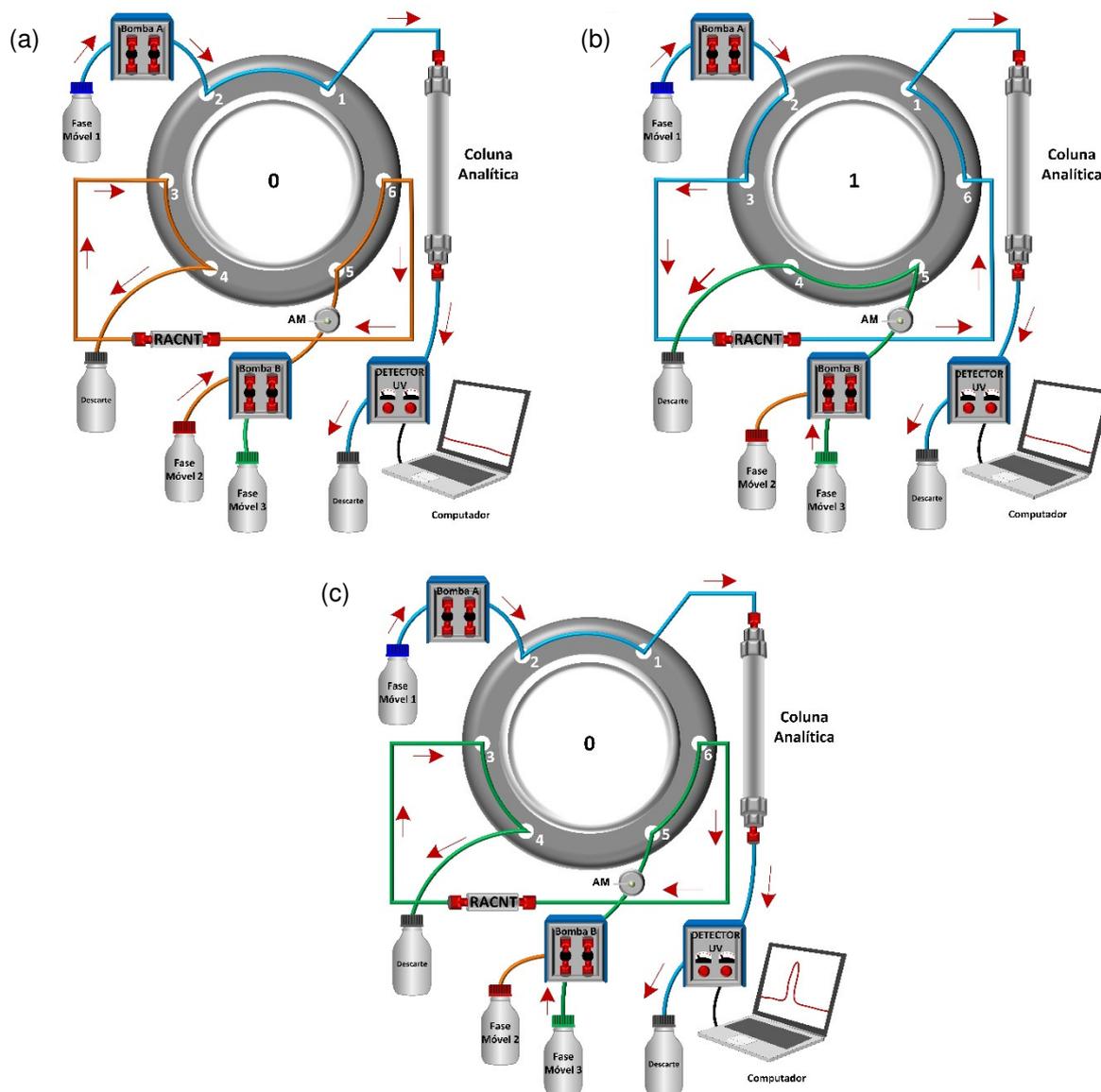
1,00 mL de cada uma delas isoladamente em tubos de ensaio contendo 10 mg de RACNTs, sendo estes agitados por 15 min a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C), seguida de centrifugação por 10 min a 1000 g. Os sobrenadantes foram injetados no cromatógrafo, quantificando-se, assim, as concentrações de equilíbrio do fármaco e as quantidades retidas do mesmo pelo material (equação 1) em cada situação. Os dados foram ajustados de acordo com os modelos de Langmuir, Freundlich, Sips, Khan, Redlich-Peterson e Toth (LANGMUIR, 1918; FREUNDLICH, 1906; GHAZNAVI; FATEMI; JODA, 2012; KHAN; ATAULLAH; ALHADDAD, 1997; REDLICH; PETTERSON, 1959; TOTH, 1971) (Tabela 2), levando-se em consideração o valor do coeficiente de correlação linear (R^2) e analisados estatisticamente com base na F_{error} (equação 3). Analogamente aos estudos cinéticos, estes modelos foram plotados no modo não-linear, usando o software OriginPro 8.5 (OriginLab®, Reino Unido).

4.10 MONTAGEM DO SISTEMA *COLUMN SWITCHING*

O sistema de *column switching*, operando no modo de *backflush* (Figura 12), era composto por duas bombas A e B. A primeira, impulsionava o tampão fosfato monopotássico 0,01 mol L⁻¹ (pH = 6,0) : acetonitrila : metanol (55:25:20) como fase móvel 1, ao passo que a segunda distribuía água ultra pura ou metanol : água ultra pura (90:10) como fases móveis 2 e 3, respectivamente. A vazão da bomba A sofreu variações durante a corrida: inicialmente era de 0,80 mL min⁻¹, porém nos primeiros cinco minutos ela aumentava em rampa para 1,60 mL min⁻¹, de 5,01 a 6,00 min para 1,80 mL min⁻¹ e de 6,01 a 8,00 min para 2,40 mL min⁻¹. A bomba B, por sua vez, permaneceu com uma vazão constante de 1,00 mL min⁻¹.

A bomba B estava conectada a um amostrador manual (AM) equipado com um *loop* de 100,00 µL. Este era ligado a uma válvula de comutação eletrônica de seis vias (VC). A coluna extratora contendo os RACNTs (10 mm × 4,6 mm, mantida em forno a 35 °C) posicionava-se depois da VC, enquanto que a coluna analítica C₁₈ Macherey-Nagel® (250 mm x 4,6 mm, também mantida a 35 °C) localizava-se após a coluna extratora e antes do detector UV (operando em 210 nm).

Figura 12 – Sistema cromatográfico em *column switching*. (a) os analitos são retidos e as macromoléculas serão eliminadas, (b) os fármacos são eluídos a partir da coluna de RACNTs e (c) os analitos são separados pela coluna analítica C₁₈.



Fonte: Do autor.

Cada ciclo de análise era constituído por três etapas. No primeiro estágio, ocorria o preenchimento do *loop* com a amostra, estando a VC na posição de carregamento (0). Ao se acionar a alavanca do AM a mesma era injetada e conduzida pela fase móvel 2 rumo à coluna de RACNTs durante 2 min ao mesmo tempo em que a fase móvel 1 acondiciona a coluna analítica (Figura 12a). Os analitos juntamente com o padrão interno ficavam retidos na coluna de RACNTs e os interferentes eram eliminados. Posteriormente, a VC comuta da posição (0) para a posição (1) e a fase móvel 1 percorria a coluna de RACNTs por um tempo

aproximado de 30 s, promovendo a eluição dos fármacos (Figura 12b). Na terceira etapa, havia novamente a comutação da VC, retornando para a posição inicial (0). Nesse estágio, os analitos são separados na coluna analítica por meio da fase móvel 1, durante 9 min e 30 s (Figura 12c).

Ressalta-se que após a primeira inversão da VC a bomba B passa a impulsionar a fase móvel 3 durante 5 min, tendo esta a função de limpar a coluna de RACNTs para que não haja *carry over* e interferentes nos cromatogramas. Passado esse tempo, havia o retorno da fase móvel 2 para que a mesma reconduzisse a coluna de RACNTs, sendo este processo efetuado por 5 min. O tempo total de cada análise, incluindo a extração e separação cromatográfica era de 12 min. A Tabela 4 resume os eventos da análise.

Tabela 4 – Etapas de extração e separação cromatográfica pelo sistema *column switching*.

Tempo (min)	Bomba	Evento	Posição da VC
0,00	Bomba A (fase móvel 1) Bomba B (fase móvel 2)	Condicionalmento da coluna analítica, retenção dos analitos e exclusão das proteínas	0
2,00	Bomba A (fase móvel 1) Bomba B (fase móvel 3)	Eluição dos analitos retidos pelos RACNTs rumo à coluna analítica	1
2,50	Bomba A (fase móvel 1) Bomba B (fase móvel 3)	Separação dos analitos na coluna analítica e limpeza da coluna de RACNTs	0
7,00	Bomba A (fase móvel 1) Bomba B (fase móvel 2)	Separação dos analitos na coluna analítica e reconduzimento da coluna de RACNTs	0
12,00	Bomba A (fase móvel 1) Bomba B (fase móvel 2)	Final da análise	0

Fonte: Do autor.

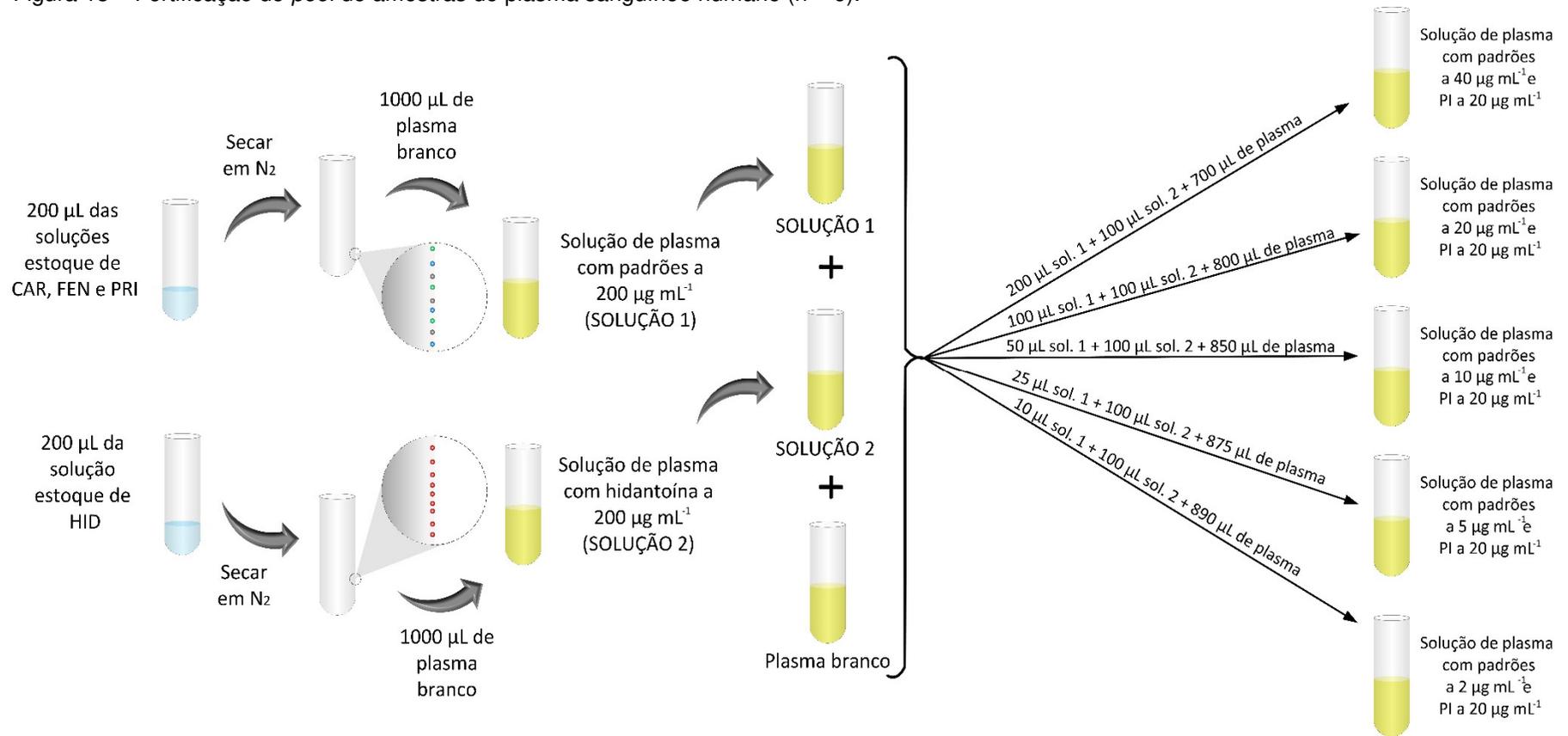
4.11 AMOSTRAS

As amostras de sangue foram coletadas por meio do uso de seringa e agulha pelos analistas do Laboratório Central de Análises Clínicas (LACEN) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNIFAL-MG, seguindo o protocolo de trabalho do mesmo e acondicionadas em tubos contendo heparina a fim de se evitar a coagulação das hemácias.

Após a coleta, as amostras de sangue foram misturadas e centrifugadas por 10 min a 1000 g para que houvesse total separação entre os constituintes sólidos e líquido, no caso o plasma, do material. Em seguida, o *pool* de plasma foi armazenado em freezer a uma temperatura de -20 °C até o momento da análise. Os doadores foram entrevistados pelo pesquisador no momento da coleta e informados sob o conteúdo da pesquisa, devendo estes assinar um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A). Ressalta-se que a coleta foi realizada mediante aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFAL-MG, protocolo número 44527914.2.0000.5142.

O desenvolvimento do método foi realizado a partir de um *pool* de amostras de plasma sanguíneo humano (n = 6) provenientes de indivíduos voluntários adultos, com faixa etária entre 18 e 40 anos, que não fazem uso de medicamentos contendo os fármacos de interesse do presente estudo. O *pool* de amostras coletadas foi fortificado com soluções padrão de FEN, CAR, PRI e HID em diferentes concentrações (Figura 13). Após o processo de dopagem do plasma, o mesmo foi diluído com água ultra pura na proporção de 1:1. O “branco” foi o próprio *pool* de amostra de plasma não tratado, cuja finalidade é verificar a interferência dos níveis basais dos fármacos presentes no *pool* de amostras biológicas.

Figura 13 – Fortificação do *pool* de amostras de plasma sanguíneo humano (n = 6).



Fonte: Do autor.

4.12 VALIDAÇÃO

Os parâmetros de validação avaliados foram linearidade, limite de quantificação (LQ), limite de detecção (LD), precisão e exatidão, adotando-se como guia a Resolução RE nº 899, de 29 de Maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003). A validação foi processada usando-se amostras de plasma sanguíneo contendo todos os padrões (FEN, CAR, PRI e HID). As curvas de calibração foram obtidas por análises em quintuplicatas de cada analito em cinco níveis de concentração (2, 5, 10, 20 e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (REPETTO; REPETTO, 2015). Os dados para todos os analitos foram ajustados ao modelo linear e o coeficiente de correlação (R^2) foi considerado adequado caso fosse igual ou superior a 0,99. A precisão e exatidão intradia foram avaliadas, no mesmo dia, com três replicatas a partir de cada nível de concentração (2, 20 e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A precisão e a exatidão interdia foram avaliadas, em dias separados, usando-se três replicatas de cada analito nas concentrações de 2, 20 e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A precisão é expressa como o desvio padrão relativo amostral (RSD), de acordo com a equação 4:

$$\text{RSD} = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (4)$$

onde s representa o desvio padrão e \bar{x} a média. Já a exatidão é demonstrada como o erro relativo (ER), de acordo com a equação 5:

$$\text{ER} = \frac{AC-NC}{NC} \cdot 100 \quad (5)$$

onde AC é a concentração do analito analisado e NC a concentração nominal. O LQ foi determinado como o menor valor passível de ser quantificado com precisão e exatidão, ao passo que, a estimação do LD baseou-se na relação sinal-ruído 3:1.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir são apresentados os resultados alcançados pelo presente trabalho no que diz respeito a síntese dos RACNTs, a sua caracterização físico-química e sua utilização como material adsorvente para extração e separação de analitos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência em sistemas de *column switching*.

5.1 SÍNTESE DOS RACNTs

Esta etapa consistiu em dois momentos distintos, onde no primeiro houve um estudo preliminar do poder de adsorção que os CNTs, tratados ou não, possuem frente ao FEN, CAR e PRI, e no segundo a síntese, propriamente dita, dos RACNTs.

5.1.1 Efeito do tratamento dos CNTs na resposta analítica

Segundo Wen et al. (2014) os CNTs possuem uma grande capacidade adsorvente para analitos orgânicos e inorgânicos, fato este que instigou a realização de um estudo prévio a cerca dessa característica a fim de se obter um melhor desempenho deste material no que diz respeito a extração dos fármacos FEN, CAR e PRI, assim como da HID que atua como padrão interno no presente método. Para avaliar essa propriedade foram testados CNTs comercial e CNTs que passaram pelos tratamentos térmicos e oxidativo, neste último caso, conforme a metodologia utilizada por Zhijie et al. (1999). Os resultados alcançados nestas análises encontram-se na Tabela 5.

Com estes dados é possível concluir que os CNTs comercial possuem uma maior capacidade adsorvente para todos os compostos se comparados aos demais, seguido de perto pelos CNTs que foram aquecidos. Este resultado difere daquele encontrado por Barbosa et al. (2015), pois em seu estudo os CNTs oxidado se

sobressaíram em relação aos demais. Contudo, há de se ressaltar que o objetivo do trabalho dos autores supracitados era identificar Cd^{2+} em amostra de soro humano, logo, acredita-se que um tratamento forte, causando grandes mudanças superficiais no material, é mais vantajoso. Como todos os fármacos aqui testados são de caráter orgânico, modificações mais brandas na estrutura dos CNTs permitem que as interações estabelecidas entre o adsorvente e os analitos sejam mais pronunciadas.

Tabela 5 - Capacidade adsorptiva dos CNTs comercial, aquecidos e oxidados frente aos analitos FEN, CAR, PRI e HID.

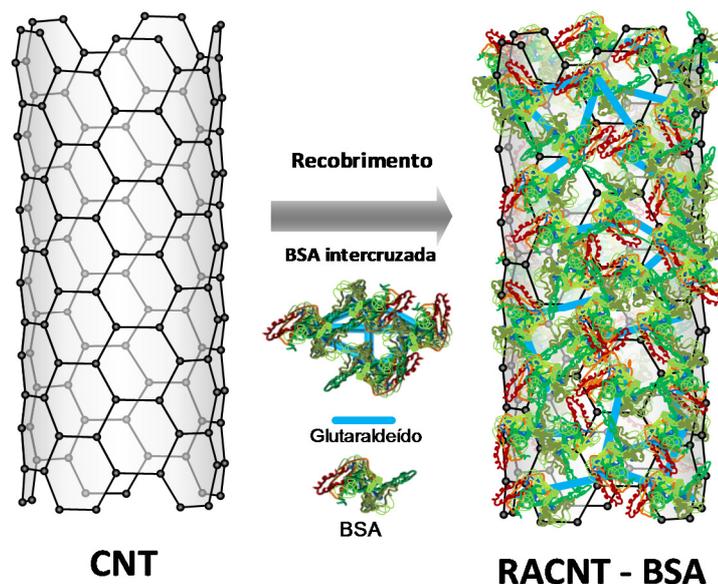
Tratamento	Porcentagem de retenção (%)			
	FEN	CAR	PRI	HID
Térmico	86,54	92,94	90,94	46,36
Oxidado	48,65	54,66	81,83	63,36
Comercial	87,01	96,80	91,78	89,68

Fonte: Do autor.

5.1.2 Revestimento dos CNTs com BSA

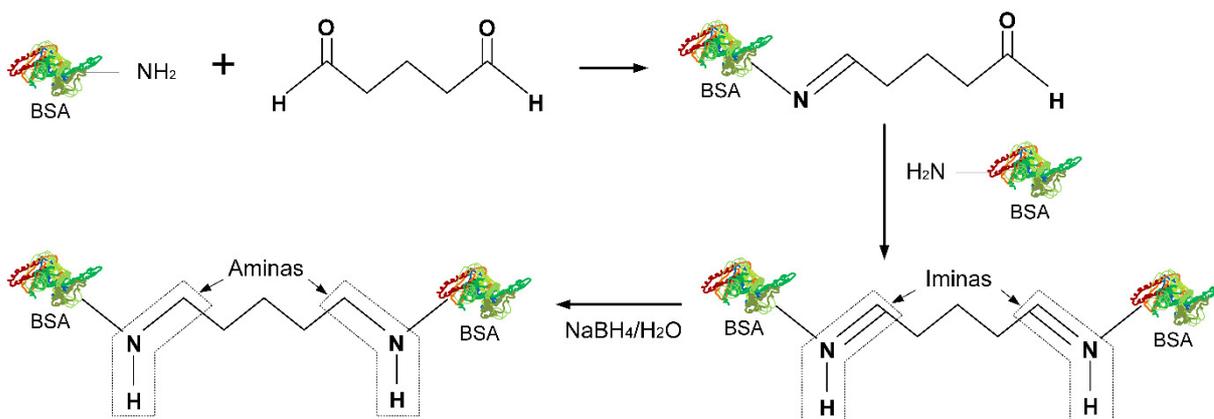
A BSA foi escolhida para revestir os CNTs devido a sua enorme semelhança com a albumina de soro humano (HSA) (CARTER; HO, 1994). Neste caso, o encapsulamento desta proteína se dá por meio do inter cruzamento entre os grupos aminos da BSA, utilizando como agente de ligação o glutaraldeído (Figura 14) (BARBOSA et al., 2015). Todavia, este processo é gerador de grupamentos imínicos que por serem altamente lábeis conferem um alto grau de instabilidade ao material. Para resolver esse problema, trata-se o mesmo com borohidreto de sódio que atuará como agente oxidante, reduzindo as iminas a aminas, sendo estas mais estáveis (Figura 15) (MENEZES; FÉLIX, 1998). Mais detalhes acerca do procedimento de revestimento podem ser acessados no item 2.3.1 da Revisão Bibliográfica.

Figura 14 – Revestimento dos CNTs comercial com BSA.



Fonte: Do autor.

Figura 15 – Redução de iminas a aminas pela ação do borohidreto de sódio.



Fonte: GOMES (2016).

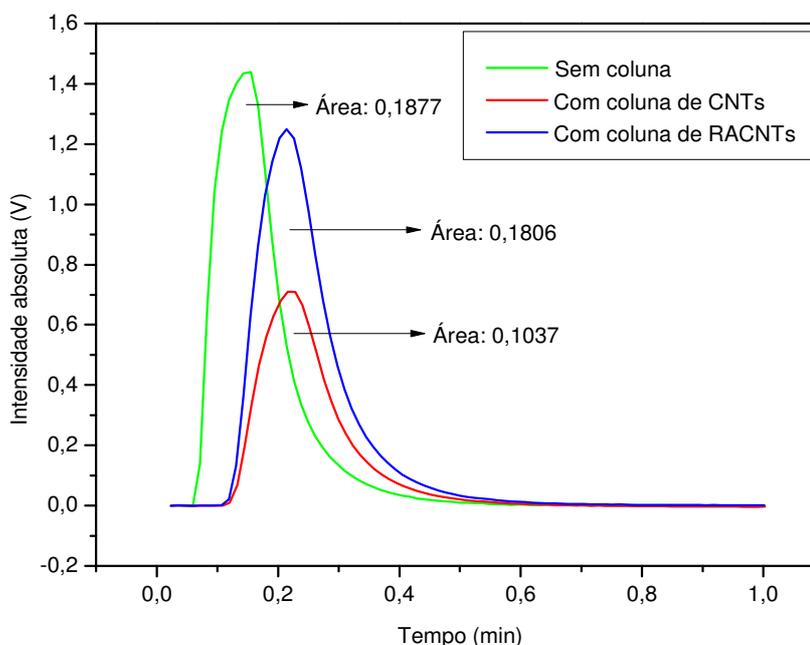
5.2 TESTE DE ELIMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

Os resultados obtidos nos testes de eliminação de proteínas podem ser vistos na Figura 16. Por ela, observa-se que a capacidade de retenção de proteínas pelos CNTs é de aproximadamente 44,75% $\left(\left[100 - \left(\frac{0,1037}{0,1877} \times 100 \right) \right] \right)$, fato este, que inviabiliza a utilização deste material na extração direta de fármacos a partir de amostras biológicas, como é o caso do plasma sanguíneo humano. Porém, ao se

utilizar como material adsorvente os RACNTs, o teor de proteínas excluídas assume um valor considerável da ordem de 96,22% $\left(\frac{0,1806}{0,1877} \times 100\right)$.

Ressalta-se que a quantidade de proteínas eliminadas é maior quando se injetam amostras cujos valores de pH são iguais ou maiores que 6,00, uma vez que o ponto isoelétrico da BSA varia de 4,7 a 5,6 (EMERSON, 1989). Essa afirmação se justifica visto que, de acordo do Gomes et al. (2016), o mecanismo de eliminação das macromoléculas se dá por repulsão eletrostática entre a camada de BSA e as proteínas da amostra quando o pH do meio é superior ao ponto isoelétrico das proteínas.

Figura 16 – Teste de eliminação de proteínas usando colunas empacotadas com CNTs e RACNTs.



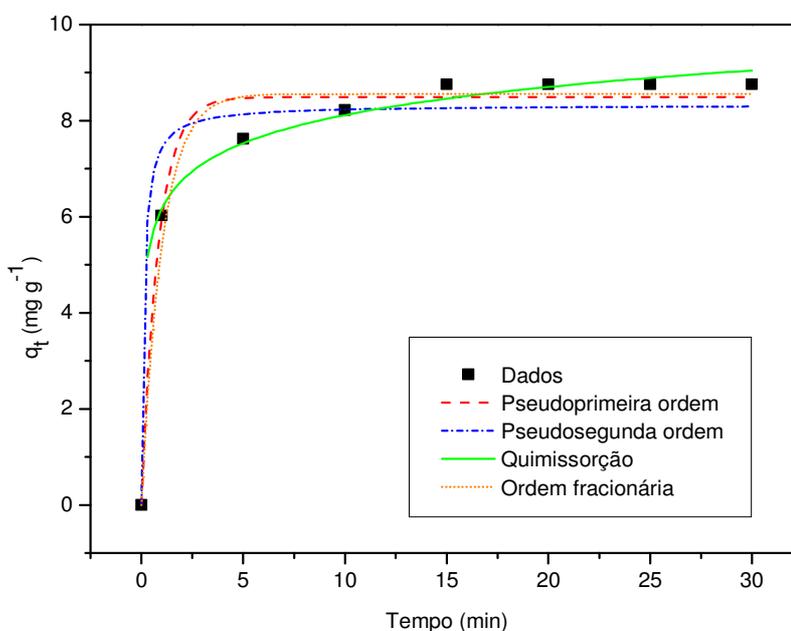
Fonte: Do autor.

Os pesquisadores Barbosa et al. (2015) em seu trabalho reportam valores superiores aos encontrados neste estudo tanto para a capacidade de retenção de proteínas pelos CNTs quanto para a eliminação das mesmas pelos RACNTs (ambos de aproximadamente 99%). Uma das possíveis causas para essa diferença de valores pode ser o tipo de tratamento utilizado anteriormente ao recobrimento dos CNTs com BSA. No caso dos autores supracitados optou-se por trabalhar com CNTs oxidados, ao passo que nesta pesquisa foram usados CNTs comercial.

5.3 ESTUDOS CINÉTICOS DE ADSORÇÃO

Por meio dos estudos cinéticos de adsorção da primidona em RACNTs percebeu-se que o equilíbrio (ou saturação) entre adsorvato-adsorvente era atingido passados 15 min. Visando obter uma melhor compreensão dessas interações, os dados foram tratados de acordo com os modelos teóricos de pseudoprimeira ordem, pseudosegunda ordem, quimissorção e ordem fracionária, sendo os resultados apresentados na Figura 17.

Figura 17 – Simulação dos estudos cinéticos de adsorção da primidona em RACNTs a partir de soluções aquosas de acordo com os métodos de ajustes não lineares.



Fonte: Do autor.

Observe que o modelo de quimissorção é o que melhor se ajusta em decorrência de seu maior valor de R^2 (0,9958) e menor valor de F_{error} (0,1971) (Tabela 6), indicando a existência de interações químicas entre adsorvato-adsorvente (DABROWSKI, 2001). Estas, por sua vez, somente ocorrem quando as energias envolvidas no processo de adsorção são elevadas, tal como, a de uma ligação química (CORNÉLIO; FERRUA; GUERREIRO, 2004).

Tabela 6 – Parâmetros cinéticos da adsorção da primidona em RACNTs.

Modelos cinéticos	Parâmetros	Dados
Pseudoprimeira ordem	q_e (mg g ⁻¹)	8,4890
	k_1 (min ⁻¹)	1,2244
	R^2	0,9803
	F_{error}	0,4246
Pseudosegunda ordem	q_e (mg g ⁻¹)	8,3299
	k_2 (g mg ⁻¹ min ⁻¹)	1,0000
	R^2	0,9506
	F_{error}	0,7266
Quimissorção	α (mg g ⁻¹ min ⁻¹)	1251,9096
	β (g mg ⁻¹)	1,1831
	R^2	0,9958
	F_{error}	0,1971
Ordem fracionária	q_e (mg g ⁻¹)	8,5575
	k_{AV} (min ⁻¹)	1,0000
	n_{AV}	1,0000
	R^2	0,9778
	F_{error}	0,5332
Difusão intrapartícula	k_{id} (mg g ⁻¹ min ^{-0,5})	0,9397 ^a

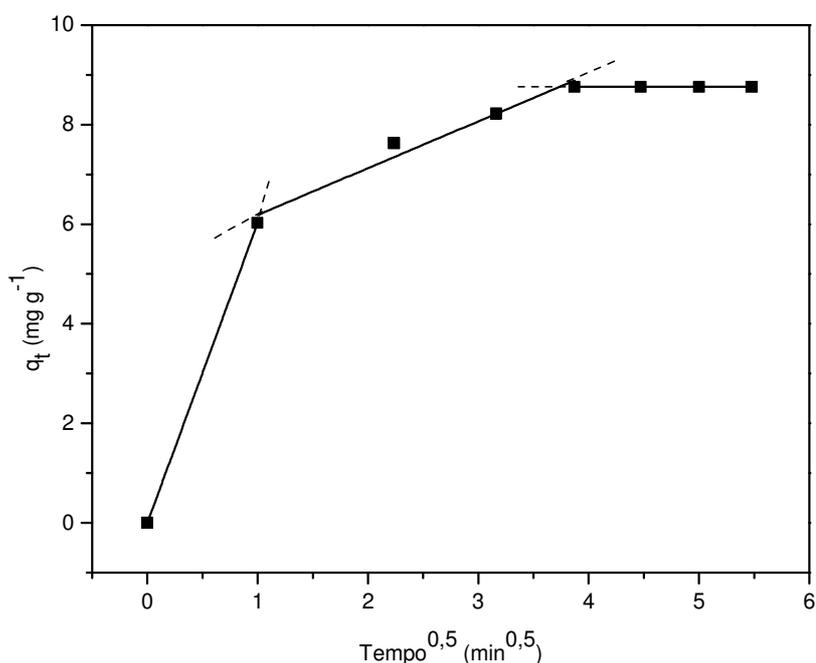
Fonte: Do autor.

Notas: ^a Segundo estágio. q_t : 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; α : velocidade inicial de adsorção da equação de Elovich; β : constante de Elovich relacionada a extensão da cobertura de superfície e também para a energia de ativação envolvida na quimissorção; k_{AV} : constante cinética de Avrami; n_{AV} : reação de ordem fracionária (Avrami) relacionada ao mecanismo de adsorção; k_{id} : constante de velocidade da difusão intrapartículas.

De forma complementar a difusão intrapartículas possibilitou compreender qual era a resistência à transferência de massa do analito mediante os sítios ativos do adsorvente (ROYER et al., 2009). Neste caso, tem-se uma difusão intrapartículas multilinear constituída por três regiões (Figura 18): na primeira, a adsorção acontece de forma rápida devido a elevada concentração do analito na solução, indicando

uma alta taxa de transporte de massa; na segunda, considerada a etapa limitante, o adsorvato tem uma grande dificuldade para chegar nos sítios ativos, fato este que retarda a saturação do material, ou seja, o alcance do equilíbrio é estritamente dependente deste estágio; e na terceira, a difusão se dá pelos poros menores até o estabelecimento do equilíbrio (WU; TSENG; JUANG, 2009). Há de destacar que nessa última fase a concentração do analito é muito baixa.

Figura 18 – Difusão intrapartículas da primidona em RACNTs a partir de soluções aquosas.

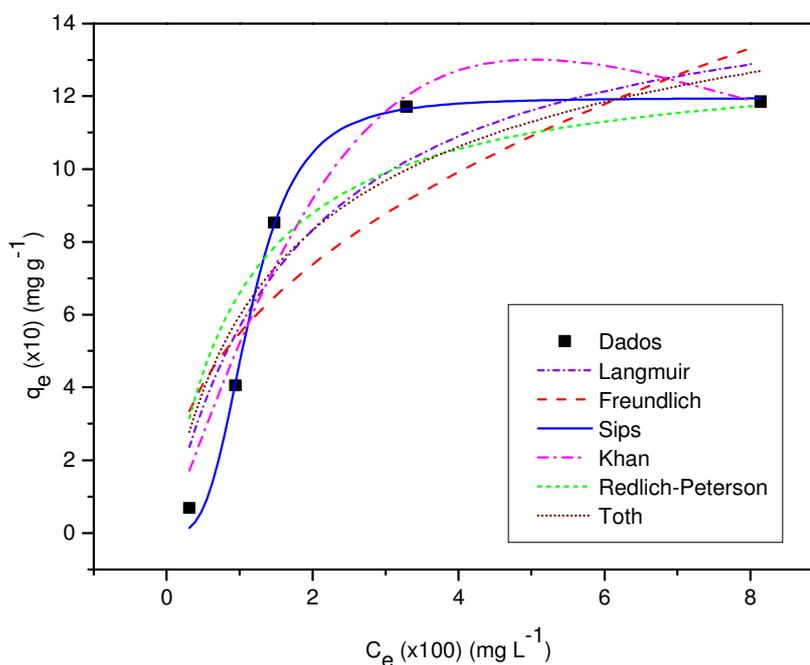


Fonte: Do autor.

5.4 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

Os estudos de equilíbrio se deram por meio da construção das isotermas de adsorção para a primidona, sendo esta um mecanismo que permite descrever a relação que existe entre a quantidade de adsorvato retida no material e a concentração de analito resultante em solução (MORENO-CASTILHA, 2004). Para tanto, os dados experimentais foram tratados seguindo as equações dos modelos matemáticos de Langmuir, Freundlich, Sips, Khan, Redlich-Peterson e Toth (Figura 19).

Figura 19 – Isoterma de adsorção da primidona adsorvida pelos RACNTs obtida a partir de soluções aquosas com seus respectivos ajustes.



Fonte: Do autor.

A análise do gráfico indica que a quantidade máxima de primidona adsorvida pelos RACNTs foi de 118,56 mg para cada grama de adsorvente. Nota-se que o modelo Sips foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais visto que este apresentou o maior valor de R^2 (0,9934) e o menor valor da F_{error} (0,8551) (Tabela 7), o que permite inferir que a superfície do material é energeticamente heterogênea (FOO; HAMEED, 2010). Tal modelo corresponde a uma combinação dos modelos de Langmuir e Freundlich, onde em altas concentrações o mesmo se adequa melhor ao primeiro e em baixas concentrações ao segundo (AHMED; DHEDAN, 2012). Nesse sentido, observa-se que o analito em questão teve uma adsorção em monocamada, considerando a existência de um ponto de saturação, o que aproxima seu comportamento ao modelo de Langmuir em comparação ao de Freundlich, que se caracteriza por uma adsorção por multicamadas (ROYER et al., 2009).

Tabela 7 – Parâmetros das isotermas da primidona adsorvida nos RACNTs.

(continua)

Modelos de isoterma	Parâmetros	Dados
Langmuir	q_s (mg g^{-1})	15,7295
	K_L (mg L^{-1})	0,5635
	R^2	0,8591
	F_{error}	2,3181
Freundlich	K_F (mg g^{-1}) (mg L^{-1}) ⁿ	5,4944
	n_F	2,3481
	R^2	0,6910
	F_{error}	2,9635
Sips	q_s (mg g^{-1})	1,2115
	K_s (mg L^{-1})	0,6450
	n_s	3,4378
	R^2	0,9934
	F_{error}	0,8551
Khan	q_s	25,9817
	ak	1,8889
	bk	0,2115
	R^2	0,9270
	F_{error}	2,3386

Tabela 7 – Parâmetros das isotermas da primidona adsorvida nos RACNTs.

(conclusão)

Modelos de isoterma	Parâmetros	Dados
Redlich-Peterson	K_R (g L ⁻¹)	13,1890
	a_R (mg L ⁻¹)	1,0000
	g ($0 \leq g \leq 1$)	1,0000
	R^2	0,8474
	F_{error}	3,7502
Toth	K	11,9471
	a_T	1,0000
	t	1,1057
	R^2	0,8240
	F_{error}	3,5087

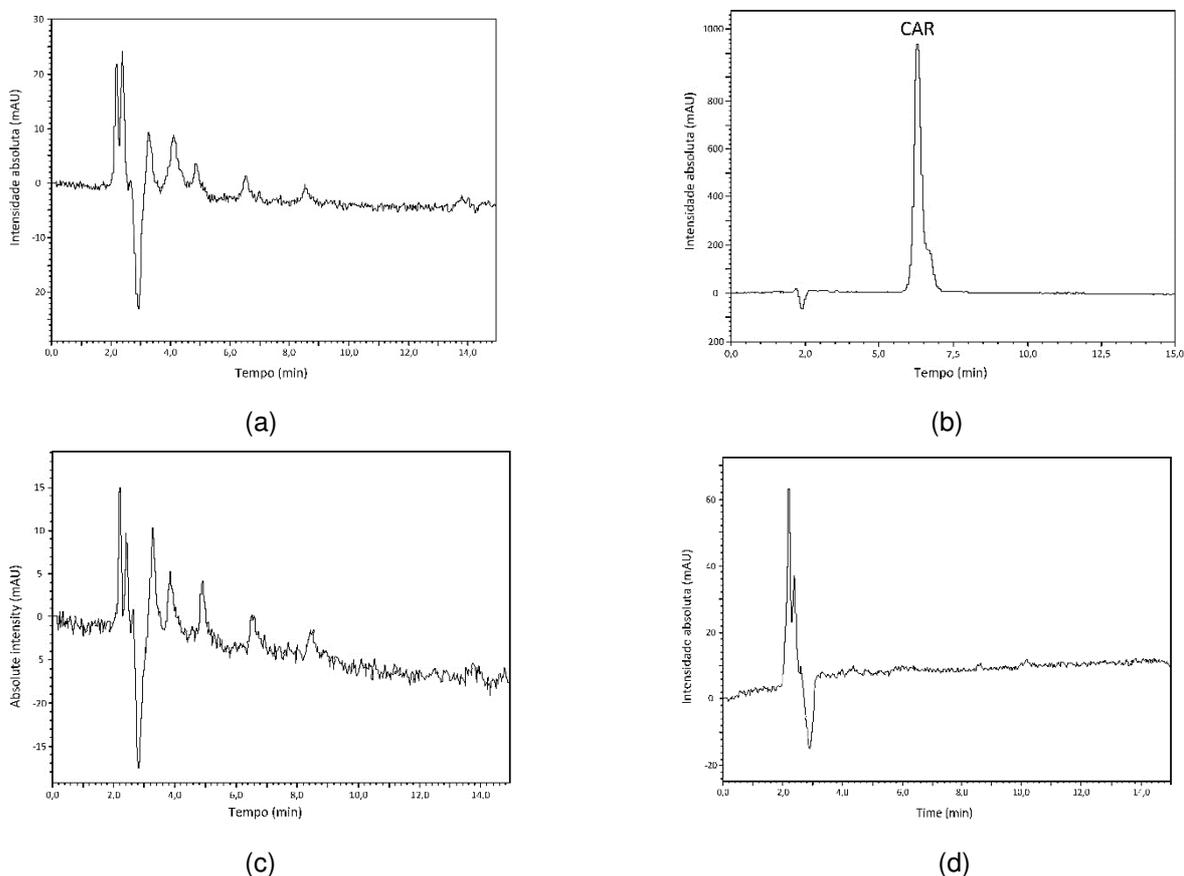
Fonte: Do autor.

Notas: q_e : quantidade de analito adsorvido no equilíbrio por grama de material; q_s : capacidade de saturação teórica; K_L : constante de afinidade de Langmuir; C_e : concentração de analito no equilíbrio; K_F e n_F : constante e expoente do modelo de Freundlich, respectivamente; K_s e n_s : constante e expoente do modelo de Sips, respectivamente; a_K e b_K : constante e expoente do modelo de Khan, respectivamente; K_R e a_R : constantes do modelo de Redlich-Peterson; g : expoente do modelo de Redlich-Peterson; K_T e a_T : constantes da isoterma de Toth; t : expoente do modelo de Toth.

5.5 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

A otimização das condições cromatográficas inicialmente foi realizada com soluções aquosas contendo os analitos isoladamente, empregando a metodologia descrita por Liu et al. (1993). Tendo por finalidade rastrear o comportamento dos fármacos diante dessas condições, optou-se por utilizar quatro comprimentos de ondas diferentes (200, 210, 254 e 284 nm) (Figura 20).

Figura 20 – Cromatogramas da solução aquosa de CAR na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ obtidos em diferentes comprimentos de onda. (a) 200 nm, (b) 210 nm, (c) 254 nm e (d) 284 nm.

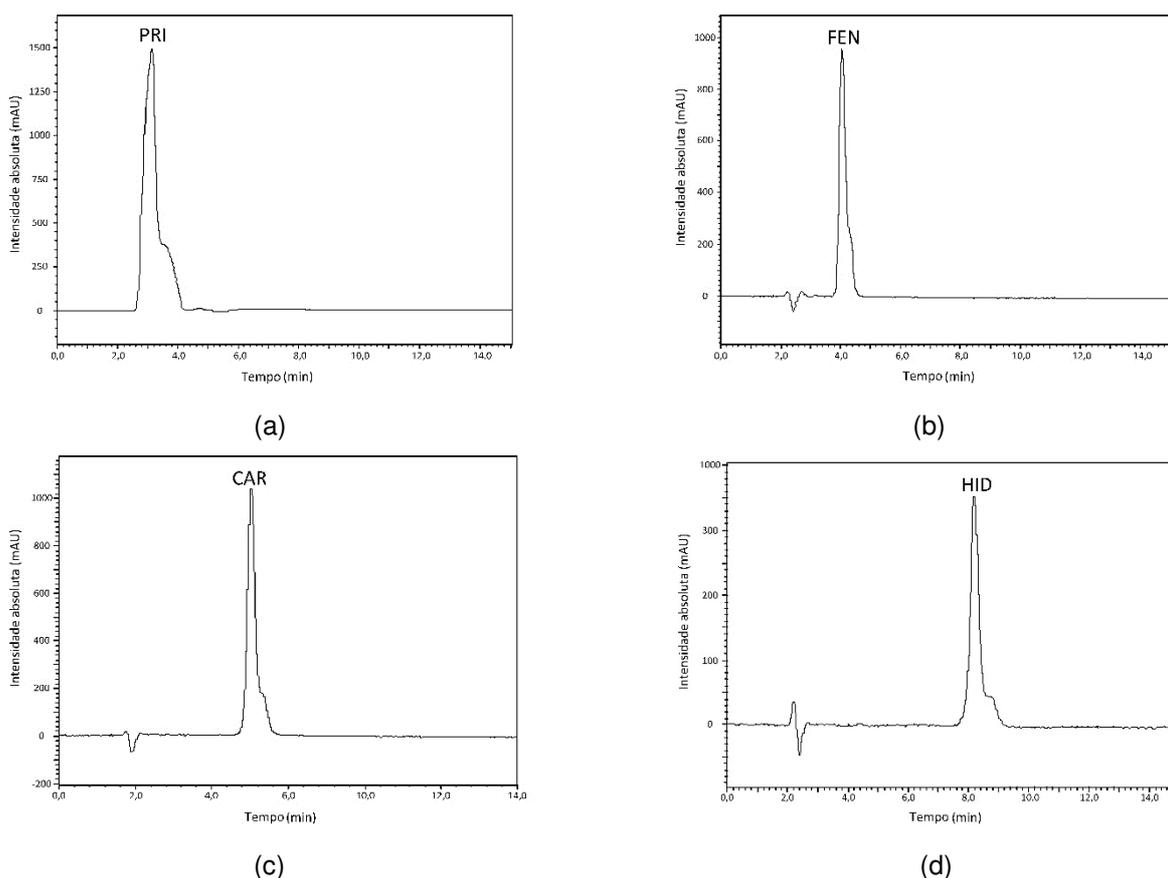


Fonte: Do autor.

Os resultados obtidos nas análises foram satisfatórios, principalmente no comprimento de onda de 210 nm. Isso pode ser justificado pela ausência de anel aromático na estrutura da hidantoína. Porém em todos os cromatogramas foi observado uma ligeira deformação ao final da formação dos picos (Figura 21). Para sanar esse problema foi feita uma alteração no valor de pH da solução tampão (SANTOS NETO, 2010). No caso, houve a redução desta propriedade em uma

unidade. Outros parâmetros modificados foram a vazão e o volume de amostra injetado. Ambos foram aumentados a fim de se obter um menor tempo de corrida e maior sensibilidade do método, respectivamente.

Figura 21 – Cromatogramas das soluções aquosas de padrões na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ obtidos no comprimento de onda de 210 nm. (a) PRI, (b) FEN, (c) CAR e (d) HID.

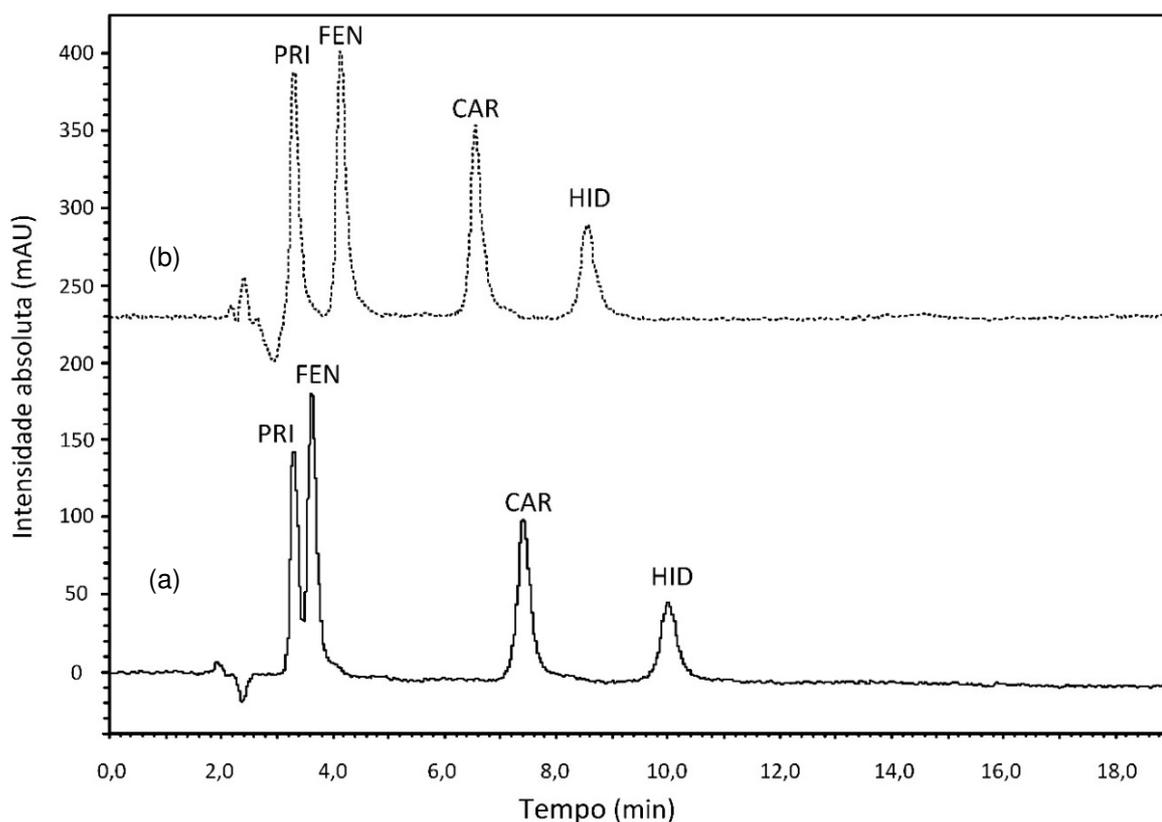


Fonte: Do autor.

Todavia, as condições cromatográficas até então padronizadas mostram-se ineficientes quando aplicadas na separação simultânea dos analitos a partir de uma solução aquosa (Figura 22a). Isso pode ser explicado pelas possíveis interações intermoleculares, formação de ligações de hidrogênio, entre as moléculas dos fármacos. Diante desse fato, foi necessário fazer novas alterações em alguns parâmetros, como por exemplo, na proporção dos constituintes da fase móvel. Esta, por sua vez, passou a ter uma maior quantidade de fase orgânica, porém, mesmo nessa nova composição a fase aquosa ainda continuava majoritária. A temperatura do forno sofreu uma redução de $5 \text{ }^\circ\text{C}$. Houve também um aumento no volume do *loop* de amostragem e a vazão que até então era fixa passou a assumir valores variados no decorrer da corrida. O resultado dessas modificações pode ser visto na

Figura 22b, onde se constata que os tempos de retenção para PRI, FEN e CAR são de, respectivamente, 2 min e 58 s, 3 min e 50 s e 6 min e 20 s.

Figura 22 – Cromatogramas da solução aquosa contendo o mix de padrões na concentração $20 \mu\text{g mL}^{-1}$. (a) condições cromatográficas idênticas às utilizadas para soluções aquosas contendo os analitos isolados e (b) condições cromatográficas otimizadas para solução aquosa contendo o mix de padrões.



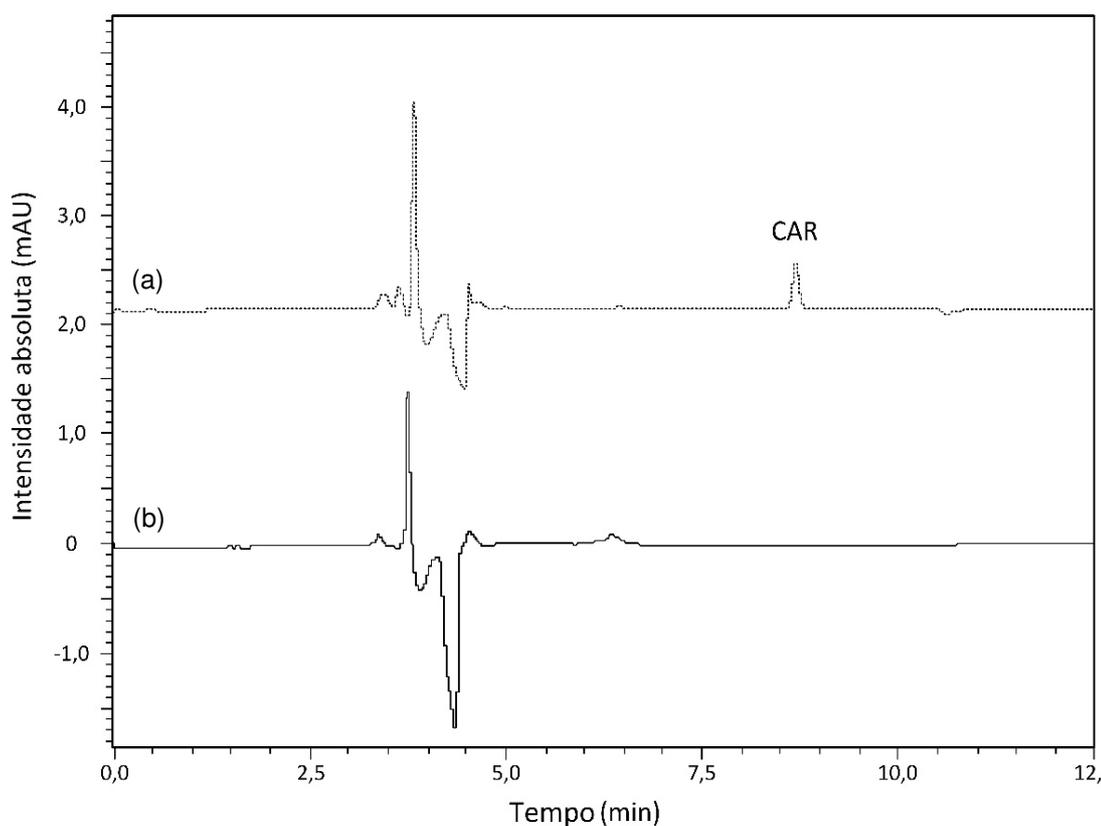
Fonte: Do autor.

5.6 PREPARO DE AMOSTRA AUTOMATIZADO

As primeiras análises cromatográficas automatizadas foram feitas com soluções aquosas contendo um mix de padrões dos analitos. Estas tiveram por finalidade otimizar alguns parâmetros da cromatografia multidimensional, tais como, o tempo de comutação da válvula eletrônica de seis vias. Inicialmente, foi testado o tempo de carregamento dos fármacos pela fase móvel 2 de 1 min, ocorrendo, então, a primeira viragem da VC. Pelos próximos 20 s a fase móvel 1 percolava a coluna de RACNTs, extraindo os analitos que ficaram retidos no

material. Em 1 min e 21 s ocorria a segunda viragem da VC e a partir daí todo analito extraído pela fase móvel 1 era eluído por ela passando pela coluna analítica rumo ao detector. Entretanto, analisando os resultados obtidos percebeu-se que este intervalo de tempo era insuficiente para remover todo fármaco injetado, principalmente a CAR que possui uma adsorção superior aos demais fármacos para este método (Figura 23a).

Figura 23 – Cromatogramas para uma solução aquosa contendo um mix de padrões a $2 \mu\text{g mL}^{-1}$. (a) ocorrência de *carry over* e (b) ausência de *carry over*.

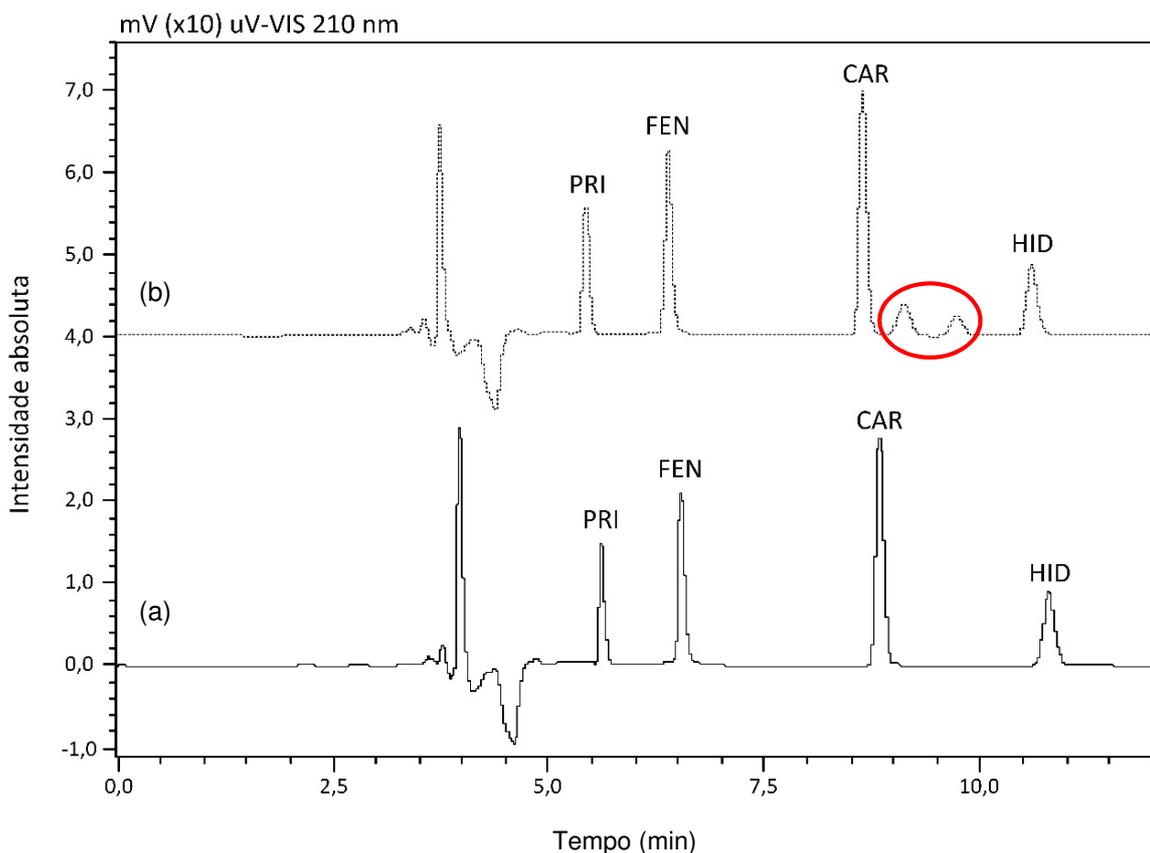


Fonte: Do autor.

Diante desse fato, aumentou-se o tempo para ocorrência da primeira viragem da VC para 2 min e mantiveram-se os mesmos 20 s para que a fase móvel 1 extraísse os analitos da coluna de RACNTs, visto que capacidade extratora da fase móvel 1 para estes compostos já havia sido comprovada anteriormente. Logo, a segunda viragem da VC se procedeu aos 2 min e 21 s. Diferentemente dos primeiros ensaios, os fármacos nestas condições foram totalmente retirados da fase estacionária (Figura 23b).

Outro parâmetro estudado neste sistema foi a utilização de uma fase de limpeza, tendo esta a função de retirar os interferentes impregnados na coluna de RACNTs que por ventura não foram eluídos pela fase móvel 1. Foram testadas duas fases, sendo uma constituída por metanol : água ultra pura (90:10) e a outra por acetonitrila : água ultra pura : álcool isopropílico (75:15:10). Os dados alcançados nestes experimentos (Figura 24) mostraram que a primeira fase de limpeza era mais eficiente na eliminação de interferentes, quando percolada por um tempo de 4 min e 30 s, se comparada a segunda.

Figura 24 – Cromatogramas indicando a ausência/presença de interferentes para uma solução aquosa contendo um mix de padrões a $2 \mu\text{g mL}^{-1}$. (a) fase de limpeza metanol : água ultra pura (90:10) e (b) fase de limpeza acetonitrila : água ultra pura : álcool isopropílico (75:15:10).

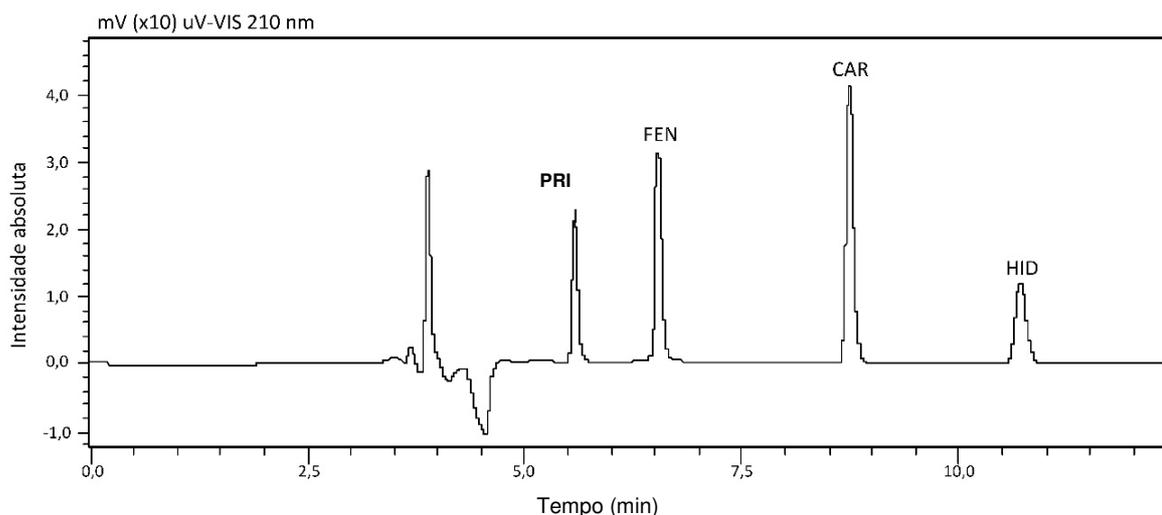


Fonte: Do autor.

Visando um aumento na sensibilidade do método, em sua totalidade, utilizando este sistema, o volume amostral foi dobrado, passando de $50 \mu\text{L}$ para $100 \mu\text{L}$. Neste contexto, os resultados alcançados podem ser observados na Figura 25. Analisando os tempos de retenção para PRI, FEN e CAR (5 min e 24 s,

6 min e 18 s e 8 min e 36 s, respectivamente) nota-se que houve um aumento significativo se comparados àqueles obtidos na HPLC convencional para todos analitos. Esse fato pode ser justificado pela ocorrência do preparo de amostra automatizado no sistema.

Figura 25 – Cromatograma da solução aquosa contendo o mix de padrões na concentração $2 \mu\text{g mL}^{-1}$.



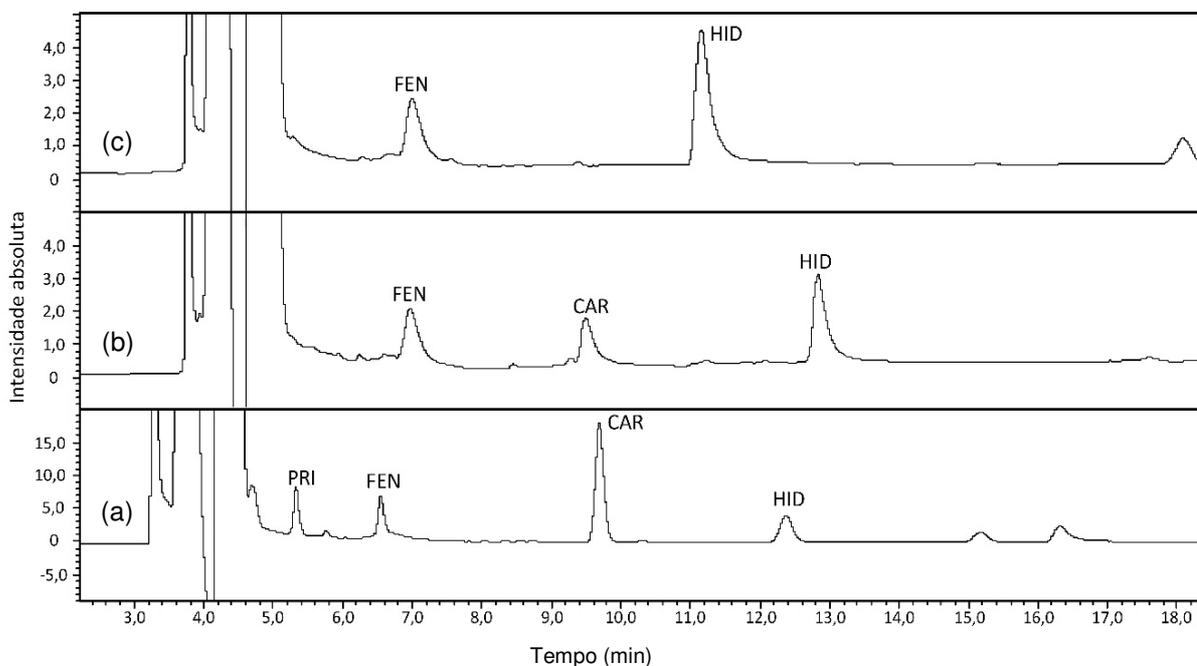
Fonte: Do autor.

Posteriormente à otimização de todas as condições da cromatografia multidimensional utilizando soluções aquosas, deram-se início as análises com amostras biológicas, que no caso correspondem a plasma sanguíneo humano. Por ser tratar de uma matriz mais complexa que a água, foi realizado um estudo acerca da eficácia das condições cromatográficas até então utilizadas e percebeu-se que era necessário aumentar o tempo da segunda viragem da VC em 10 s, ou seja, a segunda comutação da válvula ocorreria a partir de agora em 2 min e 31 s. Os componentes presentes no plasma com os RACNTs fazem com que as interações dos fármacos com a fase estacionária se fortaleçam, necessitando, assim, de um tempo maior de passagem da fase móvel 1.

Visando expor os RACNTs a uma menor concentração de proteínas plasmática, aumentando, assim, sua vida útil, foram feitos testes de diluição, utilizando como solvente água ultra pura. A Figura 26 mostra os resultados alcançados nas injeções de amostras de plasma dopadas e diluídas nas proporções de 1:1, 1:2 e 1:3. A análise da figura permite inferir que os analitos em baixas concentrações não são detectados quando há uma grande discrepância nas

proporções entre amostra biológica e solvente adicionado. Esse fato sugeriu que se optasse por trabalhar com amostras diluídas na proporção de 1:1.

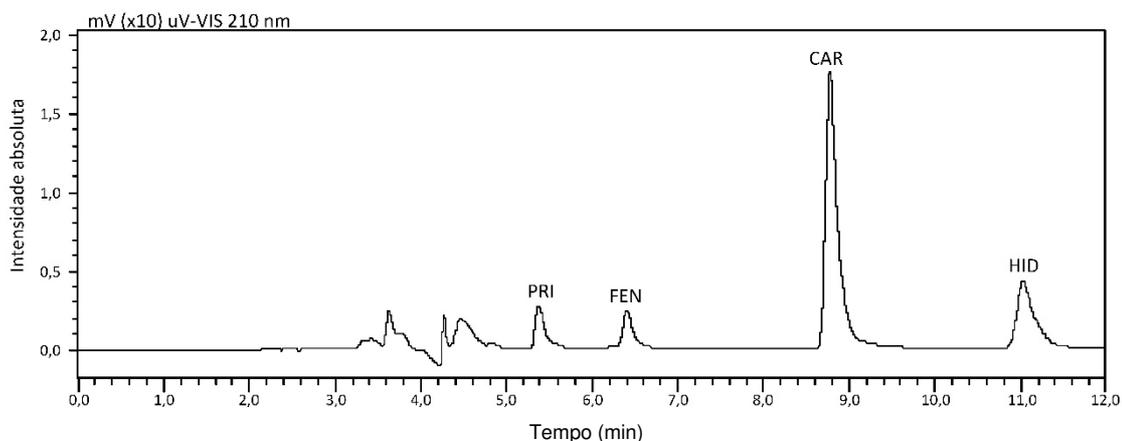
Figura 26 – Cromatogramas das amostras de plasma diluídas e fortificadas com padrões na concentração $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Diluições nas proporções de (a) 1:1, (b) 1:2 e (c) 1:3.



Fonte: Do autor.

Após estas etapas, verificou-se que todas as condições cromatográficas estavam otimizadas e permitiam obter bons resultados em termos de extração e separação de fármacos anticonvulsivantes a partir de plasma sanguíneo humano. A análise da Figura 27 permite afirmar que os picos dos analitos estão completamente espaçados e identificados, visto que a resolução cromatográfica para todos os compostos apresenta valores satisfatórios. Além disso, a boa definição dos picos contribui para a grande eficácia do método.

Figura 27 – Cromatograma da amostra de plasma diluída (1:1) e fortificada com padrões na concentração 20 µg mL⁻¹.



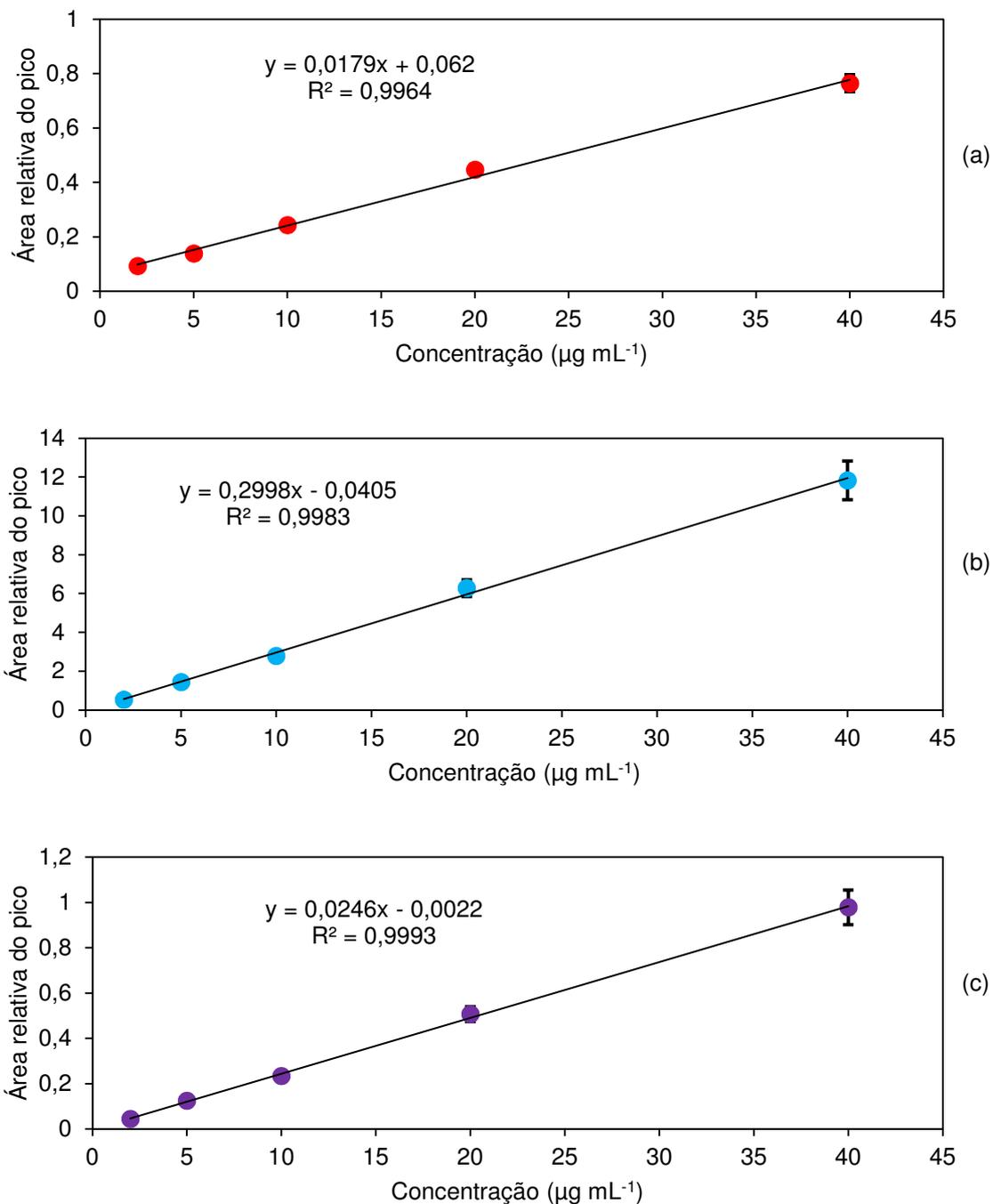
Fonte: Do autor.

Com relação aos tempos de retenção (PRI = 5 min e 22 s; FEN = 6 min e 23 s; CAR = 8 min e 46 s) não se observa diferença significativa dos mesmos com aqueles obtidos nas corridas com soluções aquosas dos padrões (Figura 25), o que permite inferir que o efeito de matriz para esse dado não é o mais importante. Entretanto, Shibata et al. (2012) encontrou em seu trabalho tempos de retenção menores para todos os analitos (PRI = 3 min e 23 s; FEN = 3 min e 53 s; CAR = 4 min e 57 s), ao passo que, Liu et al. (1993) obteve valores parecidos para PRI e FEN (5 min e 1 s e 6 min e 13 s, respectivamente), porém um valor maior para a CAR (13 min e 4 s).

5.7 VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DO MÉTODO

A primeira figura de mérito avaliada neste estudo foi a linearidade dos analitos frente às condições cromatográficas otimizadas (Figura 28). Este parâmetro para todos os fármacos apresentou valores satisfatórios ($R^2 > 0,99$), como preconiza a Resolução nº 899, de 29 de Maio de 2003 da Anvisa. O comportamento linear é importante porque é a partir da curva de calibração, expressa por meio de sua equação da reta, que a quantificação de uma substância é feita.

Figura 28 – Curvas de calibração para os fármacos (a) FEN, (b) CAR e (c) PRI, usando HID como padrão interno (n = 5).



Fonte: Do autor.

Com relação à precisão (intra e intercorrida) e exatidão (intra e intercorrida) os analitos apresentaram valores inferiores a 15% e entre -15 e 15%, respectivamente, para todas as concentrações testadas. Estes dados (Tabela 8) estão condizentes com a legislação supracitada. É importante salientar que a reprodutibilidade e a

sensibilidade de um método analítico são estritamente dependentes destes dois fatores. Logo, quanto menores eles forem mais bem aceito será o seu método.

Tabela 8 – Precisão e exatidão para FEN, CAR e PRI contidos em plasma sanguíneo humano extraídos pelos RACNTs (n = 3).

Parâmetros	FEN					
	Intradia			Interdia		
CN ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	2,00	20,00	40,00	2,00	20,00	40,00
CA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,73	21,53	39,30	1,91	20,51	39,77
Precisão (DPR (%))	5,80	3,67	4,13	6,60	3,22	2,66
Exatidão (ER (%))	-13,40	7,66	-1,74	-4,40	2,54	-0,58

Parâmetros	CAR					
	Intradia			Interdia		
CN ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	2,00	20,00	40,00	2,00	20,00	40,00
CA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,94	21,08	39,61	1,97	20,38	39,86
Precisão (DPR (%))	1,00	6,95	8,41	3,80	5,92	6,03
Exatidão (ER (%))	-2,96	5,41	-0,97	-1,56	1,91	-0,35

Parâmetro	PRI					
	Intradia			Interdia		
CN ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	2,00	20,00	40,00	2,00	20,00	40,00
CA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,87	20,63	39,78	1,83	20,46	39,81
Precisão (DPR (%))	3,18	6,41	7,84	5,73	7,59	4,99
Exatidão (ER (%))	-6,31	3,17	-0,55	-8,64	2,30	-0,48

Fonte: Do autor.

Notas: CN: concentração nominal; CA: concentração obtida; DPR: desvio padrão relativo; ER: erro relativo.

O limite de quantificação para todos os compostos apresentaram o mesmo valor ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$). Contudo, o método obteve um limite de detecção para os fármacos da ordem de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 29). A comparação entre o este método e aqueles descritos na literatura, no que tange a determinação de anticonvulsivantes, pode ser encontrada na Tabela 9. Como se observa, o método proposto apresenta uma das melhores detectabilidade. Além disso, este se mostra vantajoso visto que a amostra pode ser diretamente injetada no sistema depois de uma simples diluição. Este fato minimiza os erros experimentais devido ao mínimo preparo de amostra manual.

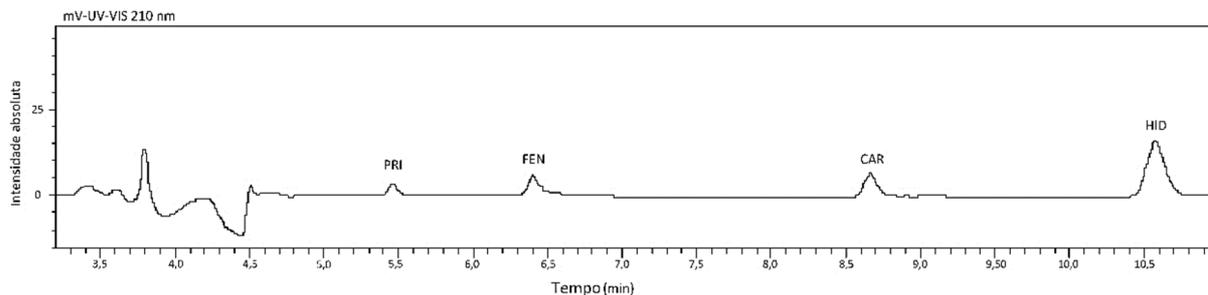
Tabela 9 – Comparação entre os valores de limites de detecção para FEN, CAR e PRI encontrados na literatura e aqueles obtidos neste trabalho.

Referências	Técnica	Preparo de amostra	LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
PATIL; BODHANKAR, 2005	HPLC – UV	centrifugação filtração	0,10 ^{a,b}
CAVAZOS et al., 2005	HPLC – DAD	desproteínização SPE	1,60 ^a
			1,98 ^b
			1,38 ^c
VERMEIJ; EDELBROEK, 2007	HPLC – DAD	SPE	0,017 ^{a,c}
			0,018 ^b
SHAH et al., 2013	HPLC – UV	SPE	0,32 ^a
			0,26 ^b
SERRALHEIRO et al., 2013	HPLC – UV	SPE	0,025 ^a
			0,01 ^b
			0,04 ^c
Este trabalho	HPLC – UV	Online SPE	0,1 ^{a,b,c}

Fonte: Do autor.

Notas: ^a fenobarbital; ^b carbamazepina; ^c primidona.

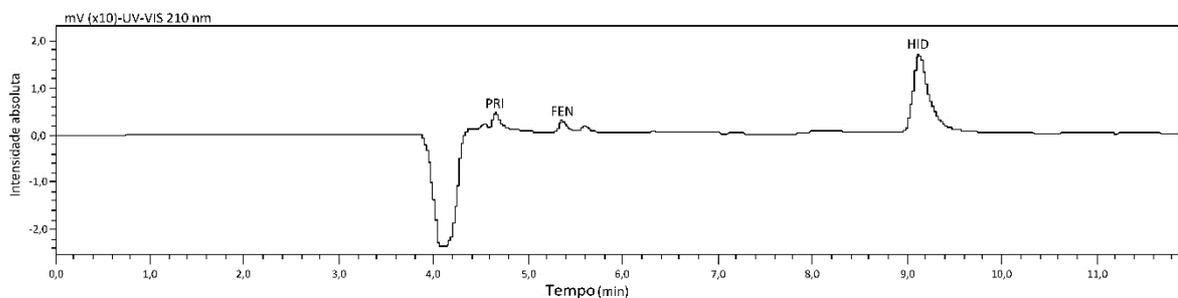
Figura 29 – Cromatograma da amostra de plasma diluída (1:1) e fortificada com padrões na concentração $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$.



Fonte: Do autor.

Este método foi testado na análise de amostras de plasma sanguíneo humano provenientes de pacientes com doenças mentais. Os fármacos FEN e PRI foram quantificados nas concentrações de $7,66$ e $3,85 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (Figura 30). Note que as concentrações obtidas encontram-se dentro das faixas terapêuticas de ambos analitos ($5 - 30$, $3 - 10$ e $5 - 10 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente para FEN, CAR e PRI) (REPETTO; REPETTO, 2015).

Figura 30 – Cromatograma da amostra real de plasma sanguíneo humano diluída (1:1).



Fonte: Do autor.

6 CONCLUSÃO

A utilização dos RACNTs, obtidos pelo recobrimento dos CNTs comercial com BSA, na extração de fenobarbital, carbamazepina e primidona a partir de plasma sanguíneo humano por meio da HPLC multidimensional se mostrou bem promissora, evitando etapas morosas e complexas do preparo de amostras. O método proposto foi validado para os fármacos supracitados, apresentando baixos limites de quantificação e detecção e excelentes precisões e exatidões, o que permite identificar tais compostos em pequenos níveis plasmáticos, (da ordem de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) fato este de suma importância visto que há uma grande proximidade entre as suas faixas terapêuticas com as respectivas doses toxicológicas. Complementarmente, a frequência analítica foi consideravelmente maior se comparada com os processos convencionais de análise por HPLC.

As proteínas contidas na matriz biológica foram excluídas em quantidades significativas, provocando uma melhor adsorção dos analitos nos RACNTs. Além disso, esse alto poder de exclusão de macromoléculas do adsorvente permitiu utilizar a coluna em aproximadamente 250 análises, atestando sua elevada durabilidade frente as condições testadas.

As investigações físico-químicas mostraram que os RACNTs apresentam uma superfície heterogênea para adsorção da primidona, visto que o modelo Sips foi o que melhor se adequou na compreensão das interações adsorvato-adsorvente. Soma-se a isso, a inferência de se ter uma adsorção química do referido fármaco, em função do melhor ajuste pelo modelo de quimissorção no estudo cinético.

Por fim, fica comprovada que a aplicação dos RACNTs na extração direta de fármacos anticonvulsivantes a partir de fluidos biológicos é eficiente por conta do alto poder adsorvativo dos CNTs, podendo este material ser empregado em análises para compostos orgânicos oriundos de diversas matrizes.

REFERÊNCIAS

AHMED, M. J.; DHEDAN, S. K. Equilibrium isotherms and kinetics modeling of methylene blue adsorption on agricultural wastes-based activated carbons. **Fluid Phase Equilibria**, v. 317, p. 9-14, 2012.

AHMED, S. N.; SIDDIQI, Z. A. Antiepileptic drugs and liver disease. **Seizure**, v. 15, p. 156-164, 2006.

ALBERTI, G. et al. Beyond the synthesis of novel solid phases: review on modelling of sorption phenomena. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 256, p. 28-45, 2012.

ALMEIDA, E. D.; BERGOLD, A. M. Primidona: importância das propriedades físico-químicas na análise qualitativa e quantitativa – Revisão comentada. **Caderno de Farmácia**, v. 18, n. 1, p. 9-21, 2002.

ARIVOLI, S.; HEMA, M.; BARATHIRAJA, C. Comparative study on metal ions adsorption on a low cost carbonaceous adsorbent kinetic equilibrium. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2008.

AUGUSTO, F. et al. New materials and trends in sorbents for solid-phase extraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 14-23, 2013.

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**, 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**, v. 147, p. 478-484, 2016.

BEHNAMFARD, A.; SALARIRAD, M. M. Equilibrium and kinetic studies on free cyanide adsorption from aqueous solution by activated carbon. **Journal of hazardous materials**, v. 170, n. 1, p. 127-33, 2009.

BOOS, K. S.; GRIMM, C. H. High performance liquid chromatography integrated solid-phase extraction in bioanalysis using restricted access precolumn packings. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 3, p. 175-180, 1999.

BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. São Paulo: LTC, 2015.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de Maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de Junho de 2003.

BROWNE, T. R.; HOLMES, G. L. Epilepsy. **New England Journal Medicine**, v. 344, p. 1145-1151, 2001.

CAI, Y. Q. et al. Multi-walled carbono nanotubes packed cartridge for the solid-phase extraction of several phthalate esters from water samples and their determination by high performance liquid chromatograph. **Analytica Chimica Acta**, v. 494, p. 149-156, 2003.

CAMINO-SÁNCHEZ, F. J. et al. Stir bar sorptive extraction: recent applications, limitations and future trends. **Talanta**, v. 130, p. 388-399, 2014.

CARDOSO, N. F. et al. Removal of remazol black B textile dye from aqueous solution by adsorption. **Desalination**, v. 269, p. 92-103, 2011.

CARMENZULI, M.; RITCHIE, H. J.; SHALLIKER, R. A. Improving HPLC separation performance using parallel segmented flow chromatography. **Microchemical Journal**, v. 111, p. 3-7, 2013.

CARTER, D. C.; HO, J. X. Structure of serum-albumin. **Advances in Protein Chemistry**, v. 45, p. 153-203, 1994.

CAVAZOS, M. D. L. L. S. et al. Simultaneous determination of anticonvulsants and their principal metabolites by HPLC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 28, n. 5, p. 693-704, 2005.

CHEN, C. M.; YEN, C. F.; LEE, J. A. The development of a column-switching high-performance liquid chromatography system for chiral separation of Mouse Urinary D, L-lactate. **International Journal of Bio-Science and Bio-technology**, v. 2, n. 1, p. 31-38, 2010.

COGNATO, G. D. et al. Antiepileptic drugs prevent changes induced by pilocarpine model of epilepsy in brain ecto-nucleotidases. **Neurochemical Research**, v. 32, n. 6, p. 1046-1055, 2007.

CORDIOLI, A.; GALLOIS, C.; ISOLAN, L. **Psicofármacos: consulta rápida**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

CORNÉLIO, A. R.; FERRUA, F. Q.; GUERREIRO, M. C. Influência de solventes orgânicos na adsorção de linalol e decanal em sílica gel. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 4, p. 863-870, 2004.

DABROWSKI, A. Adsorption – from theory to practice. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 93, p. 135-224, 2001.

DAI, L.; MAU, A. W. H. Controlled synthesis and modification of carbon nanotubes and C₆₀: carbon nanostructures for advanced polymeric composite materials. **Advanced Materials**, v. 13, n. 12-13, p. 899-913, 2001.

DELUCIA, R. et al. **Farmacologia integrada**. 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2007.

DONNAPERNA, L. et al. Comparison of adsorption of Remazol Black B and Acidol Red on microporous activated carbon felt. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 339, n. 2, p. 275-284, 2009.

DOS SANTOS, M. P. et al. Poly(dimethylsiloxane) (PDMS)-Schiff base, a new polymeric network and its adsorbent capability for copper ions from ethanol. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 398, p. 1-8, 2012.

EKLUND, P. C.; HOLDEN, J. M.; JISHI, R. A. Vibrational modes of carbon nanotubes: spectroscopy and theory. **Carbon**, v. 33, n. 7, p. 959-972, 1995.

ELOVICH, S. Y.; ZHABROVA, G. M. Mechanism of the catalytic hydrogenation of ethylene on nickel. I. Kinetics of the process, **Zhurnal Fizicheskoi Khimii**, v. 13, p. 1761-1775, 1939.

EMERSON, T. E. Unique features of albumin – a brief review. **Critical Care Medicine**, v. 17, n. 7, p. 690-694, 1989.

EUROPEAN UNION PHARMACOPEIAL CONVENTION. **European pharmacopeia**, 8. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2013.

FAN, H. T. et al. An Ion-Imprinted Amino-Functionalized Silica Gel Sorbent Prepared by Hydrothermal Assisted Surface Imprinting Technique for Selective Removal of Cadmium (II) from Aqueous Solution. **Applied Surface Science**, v. 258, p. 3815-3822, 2012.

FARAJI, M. et al. Preconcentration of trace amounts of lead in water samples with cetyltrimethylammonium bromide coated magnetite nanoparticles and its determination by flame atomic absorption spectrometry. **Arabian Journal of Chemistry**, in press, p. 1-7, 2012.

FIGUEIREDO, E. C. et al., inventores; INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial, cessionário. **Nanotubos de carbono de acesso restrito à ligação com macromoléculas por meio de recebimento com albumina (RACNT-BSA)**. Brasil BR1020140010742, 2014.

FILHO, A. G. S.; FAGAN, S. B. Funcionalização de nanotubos de carbono. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1695-1703, 2007.

FOO, K. Y.; HAMEED, B. H. Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. **Chemical Engineering Journal**, v. 156, p. 2-10, 2010.

FRANQUI, L. S. **Síntese de polímeros de impressão molecular magnéticos para extração seletiva de nicotina e cotinina em urina seguida de análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas**. 2015. 61f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2015.

FREUNDLICH, H. M. F. Over the adsorption in solution. **The Journal of Chemical Physics**, v. 57, p. 385-471, 1906.

GALVÃO, W. G. **Carbamazepina no estado sólido e sua susceptibilidade polimórfica**. 2009. 67f. Dissertação (Mestrado em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica) – Universidade Católica de Goiás/Universidade Estadual de Goiás/Centro Universitário de Anápolis, Anápolis, 2009.

GAY, D. S. F. et al. Silica grafted with a silsesquioxane containing the positively charged 1, 4-diazoniabicyclo[2.2.2]octane group used as adsorbent for anionic dye removal. **Desalination**, v. 258, p. 128-135, 2010.

GHAZNAVI, F.; FATEMI, S.; JODA, M. CO₂-CH₄ phase equilibria on modified multi-walled carbon nanotubes using Gibbs excess energy models based on vacancy solution theory. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 90, n. 3, p. 769-776, 2012.

GIMBERT, F. et al. Adsorption isotherm models for dye removal by cationized starch-based material in a single component system: error analysis. **Journal of Hazardous Materials**, v. 157, n. 1, p. 34-46, 2008.

GOMES, R. A. B. **Avaliação de nanotubos de carbono de acesso restrito na obtenção e determinação de apoproteínas**. 2016. 95f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2016.

GOMES, R. A. B. et al. Evaluation of the pH influence on protein exclusion by restricted access carbon nanotubes coated with bovine serum albumin. **Journal of Materials Science**, v. 51, p. 7407-7414, 2016.

GOODMAN, L. S.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. Ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006.

GOTTIPATI, R.; MISHRA, S. Process optimization of adsorption of Cr(VI) on activated carbons prepared from plant precursors by a two-level full factorial design. **Chemical Engineering Journal**, v. 160, n. 1, p. 99-107, 2010.

GUERREIRO, C. A. M. História do surgimento e desenvolvimento das drogas antiepilépticas. **Journal of Epilepsy Clinical Neurophysiology**, v. 12, n. 1, p. 18-20, 2006.

GUIMARÃES, S.; MOURA, D.; SILVA, P. **Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas – Manual de Farmacologia e Farmacoterapia**. 5. ed. Porto: Porto Editora, 2006.

HAGESTAM, I. H.; PINKERTON, T. C. Internal surface reversed-phase silica supports for liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 57, p. 1757-1763, 1985.

HERBEST, M. H.; MACÊDO, M. I. F.; ROCCO, A. M. Tecnologia dos nanotubos de carbono: tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 986-992, 2004.

HO, Y. S. Review of second-order models for adsorption systems. **Journal of hazardous materials**, v. 136, n. 3, p. 681-689, 2006.

HO, Y. S.; PORTER, J. F.; MCKAY, G. Equilibrium isotherm studies for the sorption of divalent metal ions onto peat: copper, nickel and lead single component system. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 141, n. 1, p. 1-33, 2002.

HO, Y.; MCKAY, G. Pseudo-second order model for sorption processes. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 5, p. 451-465, 1999.

HU, L. et al. Analysis of the endogenous human serum peptides by on-line extraction with restricted-access material and HPLC-MS/MS identification. **Talanta**, v. 127, p. 191-195, 2014.

IBRAHIM, W. A. W. et al. Application of Solid-Phase Extraction for Trace Elements in Environmental and Biological Samples: a Review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 44, p. 233-254, 2014.

IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, p. 56-58, 1991.

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

KHAN, A. R.; ATAULLAH, R.; ALHADDAD, A. Equilibrium adsorption studies of some aromatic pollutants from dilute aqueous solutions on activated carbon at different temperatures. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 194, n. 1, p. 154-165, 1997.

KROTO, H. W. et al. C₆₀: buckminsterfullerene. **Nature**, v. 318, p. 162-163, 1985.

KUMAR, K. V. Linear and non-linear regression analysis for the sorption kinetics of methylene blue onto activated carbon. **Journal of hazardous materials**, v. 137, n. 3, p. 1538-1544, 2006.

KUMAR, K. V.; SIVANESAN, S. Pseudo second order kinetics and pseudo isotherms for malachite green onto activated carbon: comparison of linear and non-linear regression methods. **Journal of hazardous materials**, v. 136, n. 3, p. 721-726, 2006.

LAGERGREN, S. About the theory of so-called adsorption of soluble substances. **Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar**, v. 24, n. 4, p. 1-39, 1898.

LANGMUIR, I. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. **Journal of the American Chemical Society**, v. 40, n. 9, p. 1361-1403, 1918.

LEOD, T. C. O. M. **Metaloporfirinas e compostos salen como modelos biomiméticos do citocromo P450 no metabolismo de fármacos anticonvulsivante e antidepressivo**. 2008. 215f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade Estadual de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

LEON-GONZALEZ, M. E. et al. Rapid analysis of pyrethroids in whole urine by high performance liquid chromatography using a monolithic column and off-line preconcentration in a restricted access material cartridge. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, p. 527-531, 2005.

LIANG, X. et al. Carbon-based sorbents: carbon nanotubes. **Journal of Chromatography A**, v. 1357, p. 53-67, 2014.

LIMA, D. R. **Manual de farmacologia clínica, terapêutica e toxicologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica LTDA, 2002.

LIU, H. et al. Simultaneous determination of carbamazepine, phenytoin, phenobarbital, primidone and their principal metabolites by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. **Journal of Chromatography**, v. 616, p. 105-115, 1993.

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

LOESCHER, C. M. et al. High performance thin layer chromatography (HPTLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) for the qualitative and quantitative analysis of *Calendula officinalis* – Advantages and limitations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 98, p. 52-59, 2014.

LOPES, E. C. N. et al. An alternative Avrami equation to evaluate kinetic parameters of the interaction of Hg(II) with thin chitosan membranes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 263, p. 542-547, 2003.

MARSH, H.; RODRIGUEZ-REINOSO, F. **Activated Carbon**. New York: Elsevier Science & Technology Books, 2006.

MCCABE, W. L.; SMITH, J. C.; HARRIOTT, P. **Unit operations of chemical engineering**. New York: McGraw-Hill, 1993.

MCNAMARA, J. O. Drugs effective in the therapy of the epilepsies. In: GOODMAN, L. S. et al. **Goodman and Gilman the pharmacological basis of therapeutics**. New York: McGraw-Hill Medical, 2011, cap. 21, p. 583-607.

MENEZES, M. L.; FÉLIX, G. Online extraction and separation of bendiocarb, methomyl, methyl-parathion and pentachlorophenol pesticides from raw milk. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 21, n. 18, p. 2863-2871, 1998.

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

MORENO-CASTILLA, C. Adsorption of organic molecules from aqueous solutions on carbon materials. **Carbon**, v. 42, n. 1, p. 83-94, 2004.

NASREDDINE, W.; BEYDOUN, A. Oxcarbamazepine in neuropathic pain. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 16, p. 1615-1625, 2007.

OLIVEIRA, E. Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and future trends. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 174-182, 2003.

OLIVEIRA, F. G. F. et al. Determinação simplificada de carbamazepina, fenitoína, fenobarbital e lamotrigina em plasma e monitoração terapêutica por HPLC/PDA. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 3, p. 519-526, 2013.

PAN, J. et al. Review of online coupling of sample preparation techniques with liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 815, p. 1-15, 2014.

PATIL, K. M.; BODHANKAR, S. L. Simultaneous determination of lamotrigine, phenobarbitone, carbamazepine and phenytoin in human serum by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, n. 1-2, p. 181-186, 2005.

PILAU, E. J. et al. Molecularly imprinted sol-gel silica for solid-phase extraction of phenobarbital. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 6, p. 1136-1143, 2008.

QIU, H. et al. Critical review in adsorption kinetic models. **Journal of Zhejiang University SCIENCE A**, v. 10, n. 5, p. 716-724, 2009.

QUEIROZ, M. E. C.; SILVA, S. M.; CARVALHO, D. Simultaneous determination of six antiepileptic drugs by high-performance liquid chromatography. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 13, n. 2, p. 35-40, 2000.

RAYNIE, D. E. Modern extraction techniques. **Analytical Chemistry**, v. 82, p. 4911-4916, 2010.

REDLICH, O.; PETTERSON, D. A useful adsorption isotherm, **Journal Physic Chemical**, v. 63, n. 6, p. 1024-1026, 1959.

REPETTO, M. R.; REPETTO, M. Tabla de concentraciones de xenobioticos em fluidos biológicos humanos como referencia para el diagnostico toxicológico (versión 2015). In: REPETTO, M. **Ampliación de toxicologia de postgrado**. Sevilla: Area de toxicologia. Universidade de Sevilla, 2015.

RIEUX, L. et al. Restricted-access material-based high-molecular-weight protein depletion coupled on-line with nano-liquid chromatography–mass spectrometry for proteomics applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1149, p. 169-177, 2007.

ROCHA, G. P.; BATISTA, B. H.; NUNES, M. L. Orientações ao pediatra sobre o manejo das drogas psicoativas e antiepilépticas. **Journal of Pediatrics**, v. 80, n. 2, p. 45-55, 2004.

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**, v. 164, n. 2-3, p. 1213-1222, 2009.

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

SAITO, R.; DRESSELHAUS, G.; DRESSELHAUS, M. S. **Physical properties of carbon nanotubes**. Londres: Imperial College Press, 1998.

SANTOS, M. G. et al. Restricted access molecularly imprinted polymers obtained by bovine serum albumin and/or hydrophilic monomers' external layers: a comparison related to physical and chemical properties. **Analyst**, v. 140, n. 22, p. 7768-7775, 2015.

SANTOS NETO, A. J. **Cromatografia Líquida multidimensional e espectrometria de massas em *tandem* para análise direta de fármacos em fluidos biológicos: da escala convencional a miniaturizada**. 2007. 216f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

_____. Problemas com o formato dos picos em cromatografia líquida – parte 4. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 3, p. 61-67, 2010.

SATO, Y. et al. Weak cation-exchange restricted-access material for on-line purification of basic drugs in plasma. **Journal of Chromatography A**, v. 1190, p. 8-13, 2008.

SERRALHEIRO, A. et al. First HPLC-UV method for rapid and simultaneous quantification of phenobarbital, primidone, phenytoin, carbamazepine, carbamazepine-10,11-epoxide, 10,11-trans-dihydroxy-10,11-dihydrocarbamazepine, lamotrigine, oxcarbazepine and licarbazepine in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 925, p. 1-9, 2013.

SHAH, N. M. et al. A simple bioanalytical method for the quantification of antiepileptic drugs in dried blood spots. **Journal of Chromatography B**, v. 923-924, p. 65-73, 2013.

SHAWABKEH, R.; TUTUNJI, M. Experimental study and modeling of basic dye sorption by diatomaceous clay. **Applied Clay Science**, v. 24, p. 111-120, 2003.

SHIBATA, M. et al. Detection of 22 antiepileptic drugs by ultra-performance liquid chromatography couple with tandem mass spectrometry applicable to routine therapeutic drug monitoring. **Biomedical Chromatography**, v. 26, p. 1519-1528, 2012.

SILVA, F. A. B. et al. Poly(dimethylsiloxane) and Poly[vinyltrimethoxysilane-co-2-(dimethylamino) ethyl methacrylate] Based Cross-Linked Organic-Inorganic Hybrid Adsorbent for Copper(II) Removal from Aqueous Solutions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 00, n. 00, p. 1-11, 2016.

SIMON, P. A.; BROWN, W. M. Treatment of epilepsy: existing therapies and future developments. **Frontiers in Bioscience**, v. 5, p. 124-152, 2000.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentals of Analytical Chemistry**. 9. ed. Boston: Cengage Learning, 2013.

_____. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2006.

SMITH, M.; WILCOX, K. S.; WHITE, H. S. Discovery of antiepileptic drugs. **Neurotherapeutics**, v. 4, n. 1, p. 12-17, 2007.

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

SONG, W. et al. Restricted access chiral stationary phase synthesized via reversible addition-fragmentation chain-transfer polymerization for direct analysis of biological samples by high performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 832, p. 58-64, 2014.

SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L. Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 801, p. 141-156, 2004.

TERRONES, M. Science and technology of the twenty-first century: synthesis, properties, and applications of carbon nanotubes. **Annual Review of Materials Research**, v. 33, p. 419-501, 2003.

TERZYK, A. P. The influence of activated carbon surface chemical composition on the adsorption of acetaminophen (paracetamol) in vitro - Part II. TG, FTIR, and XPS analysis of carbons and the temperature dependence of adsorption kinetics at the neutral pH. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 177, n. 1, p. 23-45, 2001.

TONHI, E. et al. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.

TOTH, J. State Equations of Solid-Gas Interface Layers. **Acta Chimica Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 69, n. 3, p. 311-317, 1971.

VARONA, J.; ESCRIBANO, E.; MARTÍN-CALDERÓN, J. L. Fenobarbital: farmacocinética, toxicología y monitorización por el laboratorio. **Revista de Diagnóstico Biológico**, v. 50, n. 1, p. 13-16, 2001.

VERMEIJ, T. A. C.; EDELBROEK, P. M. Robust isocratic high performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of seven antiepileptic drugs including lamotrigine, oxcarbazepine and zonisamide in serum after solid-phase extraction. **Journal of Chromatography B**, v. 857, n. 1, p. 40-46, 2007.

VIJAYARAGHAVAN, K. et al. Biosorption of nickel(II) ions onto *Sargassum wightii*: application of two-parameter and three parameter isotherm models. **Journal of Hazardous Materials**, v. 133, n. 1-3, p. 304-308, 2006.

VINTILOIU, A. et al. Combining restricted access material (RAM) and turbulent flow for the rapid on-line extraction of the cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib in plasma samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1082, p. 150-157, 2005.

WANG, C. et al. Preparation of an internal surface reversed-phase restricted-access material for the analysis of hydrophobic molecules in biological matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1343, p. 195-199, 2014.

WEBER, W. J.; MORRIS, J. C. Kinetics of adsorption on carbon from solution. **Journal of the Sanitary Engineering Division**, v. 89, n. 2, p. 31-60, 1963.

WEN, Y. et al. Recent advances in solid-phase sorbents for sample preparation prior to chromatographic analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 59, p. 26-41, 2014.

WU, F. C.; TSENG, R. L.; JUANG, R. S. Characteristics of Elovich equation used for the analysis of adsorption kinetics in dye-chitosan systems. **Chemical Engineering Journal**, v. 150, n. 2-3, p. 366-373, 2009.

XU, W. J. et al. Determination of sulfonamides in bovine milk with column-switching high performance liquid chromatography using surface imprinted silica with hydrophilic external layer as restricted access and selective extraction material. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 7198-7207, 2010.

YACUBIAN, E. M. T. Tratamento da epilepsia na infância. **Jornal de Pediatria**, v. 78, n. 1, p. 19-27, 2002.

YU, P. et al. Polyethylene glycol modified magnetic carbon nanotubes for the determination of methylprednisolone in rat plasma by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1348, p. 27-33, 2014.

ZARBIN, A. J. G. Química de (nano)materiais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1469-1479, 2007.

ZHANG, Y. Y. et al. Simultaneous stereoselective analysis of naftopidil and O-desmethyl naftopidil enantiomers in feces using an online column-switching high-performance liquid chromatography method. **Biomedical Chromatography**, v. 28, p. 1030-1035, 2014.

ZHIJIE, J. et al. Production of short multi-walled carbon nanotubes. **Carbon**, v. 37, p. 903-906, 1999.

ZHOU, C. et al. Oligomers matrix-assisted dispersion of high content of carbon nanotubes into monolithic column for online separation and enrichment of proteins from complex biological samples. **Analyst**, v. 138, p. 5783-5790, 2013.

ZWANZGER, P.; ESER, D.; RUPPRECHT, R. Anticonvulsivants in the treatment of anxiety – an alternative treatment option? **Nervenarzt**, v. 78, p. 1274-1282, 2007.

ANEXO

ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa – **EMPREGO DE NANOTUBOS DE CARBONO DE ACESSO RESTRITO NA EXTRAÇÃO DIRETA DE FÁRMACOS ANTICONVULSIVANTES SEGUIDO DE ANÁLISE POR HPLC**. No caso de você concordar em participar, favor assinar ao final do documento. Sua participação não é obrigatória, e, a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição. Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e endereço do pesquisador principal, podendo tirar dúvidas do projeto e de sua participação.

TÍTULO DA PESQUISA: EMPREGO DE NANOTUBOS DE CARBONO DE ACESSO RESTRITO NA EXTRAÇÃO DIRETA DE FÁRMACOS ANTICONVULSIVANTES SEGUIDO DE ANÁLISE POR HPLC

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Rodrigo Campos dos Santos (aluno de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Química – PPGQ – UNIFAL-MG)

ENDEREÇO: Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos – LATF, UNIFAL-MG

TELEFONES: (35) 3299-1342; (35) 9203-2699.

PESQUISADOR PARTICIPANTE: Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo (Orientador)

Eu, _____, declaro que em ___/___/___ concordei voluntariamente em participar do projeto de pesquisa acima referido. Fui informado(a) sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Os detalhes de que fui informado são:

1. Este estudo tem como objetivo desenvolver uma nova técnica para determinação direta e simultânea de anticonvulsivantes em plasma, utilizando-se de um novo material com alta capacidade adsorptiva;
2. A minha participação no presente estudo não acarretará em risco físico ou financeiro;
3. O estudo implica em que eu me submeta à coleta de uma amostra de sangue de 5 mL (quantidade equivalente a uma colher de sopa) de uma veia do meu braço, após devida higienização do local;

4. A coleta de sangue será realizada por profissional habilitado, no Laboratório Central de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unifal-MG – LACEN;
5. Pode acontecer de aparecerem efeitos como dor ou desconforto no local onde meu braço foi picado pela agulha, mas isso não traz nenhum risco. Se isso ocorrer, serei informado sobre como aliviar esta situação;
6. A pesquisa não será feita se houver grandes riscos relacionados à mesma. Caso algum risco proibitivo venha a se revelar no decurso do estudo, o pesquisador se compromete a me alertar sobre o fato e a suspender de imediato minha participação;
7. Este grupo de pesquisa não fará nenhuma alteração nos medicamentos que eu tomo, nem na quantidade deles, excluindo deste estudo pacientes que realizam tratamento medicamentoso com anticonvulsivantes;
8. Foi dada segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada à minha privacidade;
9. A garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa;
10. Não haverá benefício financeiro ou de qualquer outro tipo;
11. Não sou obrigado a participar do projeto e posso sair do mesmo a qualquer momento sem qualquer prejuízo.

Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Poderei consultar o pesquisador responsável (acima identificado) ou o CEP-UNIFAL-MG, com endereço na Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Centro, CEP - 37130-000, Fone: (35) 3299-1318, no e-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br sempre que entender necessário obter informações ou esclarecimentos sobre o projeto de pesquisa e minha participação no mesmo.

Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados.

Alfenas, ____/____/____

Assinatura do participante

Assinatura do Pesquisador Responsável