



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ALMIR CUSTODIO BATISTA JUNIOR

ABORDAGENS PARA ANÁLISE DE N-NITROSAMINAS EM MEDICAMENTOS
UTILIZANDO DPX-LC-MS e DART-MS

GOIÂNIA
2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Almir Custódio Batista Junior

3. Título do trabalho

ABORDAGENS PARA ANÁLISE DE N-NITROSAMINAS EM MEDICAMENTOS UTILIZANDO DPX-LC-MS E DART-MS

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;

- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Andrea Rodrigues Chaves, Professor do Magistério Superior**, em 12/01/2024, às 15:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Almir Custodio Batista Junior, Discente**, em 17/01/2024, às 09:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4313240** e o código CRC **5A06DD4F**.

ALMIR CUSTODIO BATISTA JUNIOR

**ABORDAGENS PARA ANÁLISE DE N-NITROSAMINAS EM MEDICAMENTOS
UTILIZANDO DPX-LC-MS e DART-MS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás como requisito para obtenção do título Mestre em Química.
Área de Concentração: Química

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Rodrigues Chaves

GOIÂNIA

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Batista Junior, Almir Custodio
ABORDAGENS PARA ANÁLISE DE N-NITROSAMINAS EM
MEDICAMENTOS UTILIZANDO DPX-LC-MS e DART-MS
[manuscrito] / Almir Custodio Batista Junior. - 2023.
CXVI, 116 f.

Orientador: Profa. Dra. Andréa Rodrigues Chaves.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto
de Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2023.

Inclui abreviaturas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. N-Nitrosaminas. 2. Preparo de Amostra. 3. Ionização Ambiente.
4. Cromatografia Líquida. 5. Espectrometria de Massas. I. Chaves,
Andréa Rodrigues, orient. II. Título.

CDU 543



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

ATA IQ 169-A/2024

Ata nº 169 da sessão da Defesa de Mestrado de **Almir Custodio Batista Junior**, que confere o título de **Mestre em Química**, na área de concentração em **Química**.

Aos **19 (dezenove) dias do mês de dezembro de 2023 (dois mil e vinte e três)**, a partir das **14h00m**, no **Anfiteatro do IQ II**, realizou-se a sessão pública da Defesa de Mestrado intitulada "**ABORDAGENS PARA ANÁLISE DE N-NITROSAMINAS EM MEDICAMENTOS UTILIZANDO DPX-LC-MS E DART-MS**". Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, **Profa. Dra. Andréa Rodrigues Chaves (UFG)**, com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Dra. Carla Santos de Freitas (UFG)** e **Prof. Dr. Wendell Karlos Tomazelli Coltro (UFG)**. Durante a arguição os membros da banca não fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Defesa de Mestrado, tendo sido o candidato **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pela Profª. Drª. Andréa Rodrigues Chaves, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos 19 (dezenove) dias do mês de dezembro de 2023 (dois mil e vinte e três).



Documento assinado eletronicamente por **Andrea Rodrigues Chaves, Professor do Magistério Superior**, em 12/01/2024, às 15:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Wendell Karlos Tomazelli Coltro, Professor do Magistério Superior**, em 12/01/2024, às 15:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **CARLA SANTOS DE FREITAS, Usuário Externo**, em 12/01/2024, às 16:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4313224** e o código CRC **5B2EB0B0**.

AGRADECIMENTOS

A minha família, meus pais Maria Luzinete e Almir, e minhas irmãs Stafany e Maria Vitória, por todo apoio e amor que recebi. Agradeço imensamente aos meus pais que desde cedo me impulsionaram e me ensinaram que a educação é um instrumento de transformação social e que poderia me levar a lugares que não imaginava. Eles não mediram esforços para proporcionar as melhores oportunidades. Esse manuscrito é a realização do que sonharam.

A minha orientadora Profa. Dra. Andréa Rodrigues Chaves, sou grato por toda paciência e dedicação com minha formação. Levarei todo seu zelo e delicadeza que teve comigo durante esse percurso pela minha vida.

Agradeço a coordenação e o grupo de pesquisa do Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas da UFG (LaCEM), por todo apoio, infraestrutura e ensinamento.

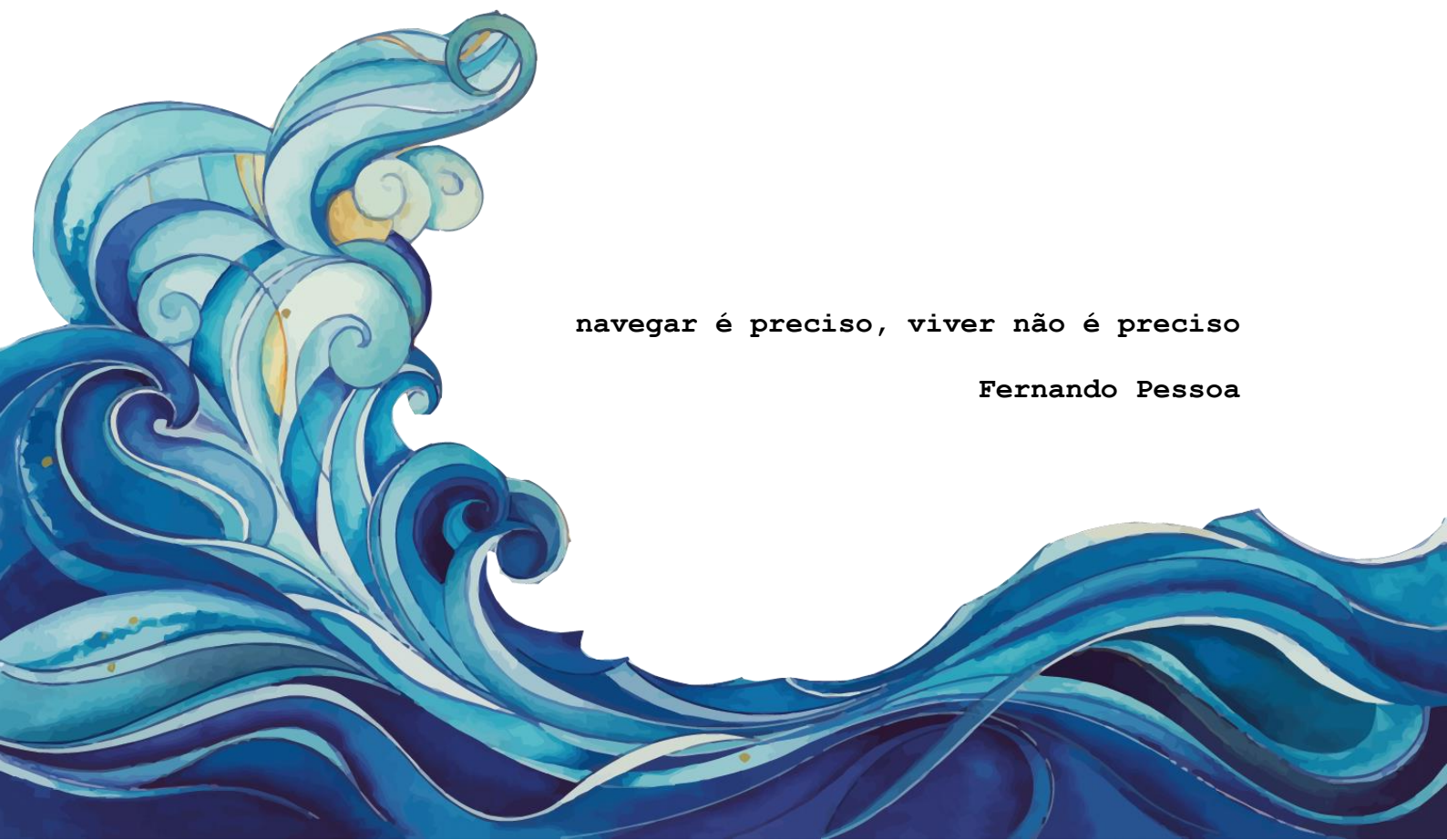
Agradeço ao Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, pela oportunidade de realização do mestrado em uma universidade pública e de qualidade.

Agradeço a CAPES pelo fomento e bolsa de estudos.

Agradeço aos amigos que o mestrado me proporcionou, sem eles o caminho teria sido muito mais difícil. Obrigado pelo café & fofocas de todo dia.

Agradeço aos meus amigos, que foram suporte incondicional, tanto em momentos felizes quanto nos momentos difíceis.

Agradeço a todos que me testemunharam.



navegar é preciso, viver não é preciso

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE FIGURAS	10
ABREVIações	12
INTRODUÇÃO GERAL.....	15
1. N-NITROSAMINAS.....	15
2. LIMITES ACEITÁVEIS DE N-NITROSAMINAS.....	21
3. ANÁLISE DE N-NITROSAMINAS EM MEDICAMENTOS	23
3.1 Técnicas de Preparo de Amostra.....	25
3.2 Cromatografia Líquida – LC.....	28
3.3 Espectrometria de Massas – MS	31
4. ANÁLISES SUSTENTÁVEIS.....	34

CAPÍTULO I

DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO SORTIVA EM PONTEIRA DE MICROPIPETA (*DISPOSABLE PIPETTE EXTRACTION - DPX*) PARA DETERMINAÇÃO DE N-NITROSAMINAS EM MEDICAMENTOS POR LC-MS

RESUMO I.....	38
ABSTRACT I	39
1. INTRODUÇÃO.....	40
2. OBJETIVOS.....	43
2.1 Objetivo geral	43
2.2 Objetivos Específicos	43
3. METODOLOGIA.....	44
3.1 Reagentes.....	44
3.2 Obtenção e preparo de amostra.....	44
3.3 Parâmetros LC-MS	44
3.4 Otimização da extração por DPX.....	45
3.5 Performance analítica do método DPX-LC-MS.....	46
3.6 Extração de NAs em amostras reais	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.1 Método LC-MS.....	48

4.2	Otimização da extração DPX	50
4.3	Performance Analítica DPX-LC-MS	61
4.4	Quantificação de NAs em medicamentos por DPX-LC-MS.....	67
4.5	Comparação do método DPX-LC-MS com a literatura	69
5.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	71
CAPÍTULO II		
DETERMINAÇÃO DE N-NITROSAMINAS EM COMPRIMIDOS DE MEDICAMENTOS POR <i>DIRECT ANALYSIS IN REAL TIME MASS SPECTROMETRY</i> (DART-MS).....		
	RESUMO II.....	73
	ABSTRACT II	74
1	INTRODUÇÃO.....	75
2	OBJETIVOS.....	78
2.1	Objetivo geral	78
2.2	Objetivos específicos.....	78
3	METODOLOGIA.....	79
3.1	Reagentes.....	79
3.2	Obtenção e preparo de amostras.....	79
3.3	DART-MS	79
3.4	Performance analítica	81
3.5	Quantificação de NAs em amostras reais	82
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	83
4.1	Otimização da análise por DART-MS	83
4.2	Análise direta dos comprimidos por DART-MS	87
4.3	Performance analítica	92
4.4	Quantificação de NAs em medicamentos por DART-MS.....	98
5	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	101
CONCLUSÃO GERAL		102
REFERÊNCIAS		103

RESUMO

As N-nitrosaminas (NAs) são moléculas caracterizadas por um grupo amina desprotonado ligado a um grupo nitroso, geralmente formadas pela reação de amigas secundárias ou terciárias com agentes nitrosantes. As NAs são geralmente encontradas como impurezas em uma série de produtos, como alimentos processados e cosméticos. Essas moléculas são alvo de estudo visto seu potencial mutagênico e carcinogênico. Em 2018 as NAs foram encontradas em medicamentos contendo o princípio ativo valsartana. Em medicamentos sartana, a ocorrência das NAs foi inicialmente atrelada à síntese do insumo farmacêutico ativo (IFA), uma vez que o meio reacional pode haver aminas precursoras das NAs, bem como um agente nitrosante. Com estudos mais aprofundados, foi comprovado que a degradação do IFA ou sua interação de IFAs com a embalagem poderiam levar a formação das NAs. Isso levou agências reguladoras mundiais a estabelecerem diretrizes norteadoras sobre a presença e as concentrações máxima permitida destas moléculas nesses medicamentos. Frente a necessidade de avaliar o teor de NAs em medicamentos, métodos analíticos eficientes e sensíveis têm sido desenvolvidos. O desafio de analisar NAs em medicamentos reside na baixa concentração que esses analitos, uma vez que são encontrados nessa matriz na ordem de ng de N-nitrosamina por mg do medicamento. A literatura apresenta diversos métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas (*mass spectrometry* - MS) aplicados em tais análises. Tanto a cromatografia líquida (*liquid chromatographic* - LC) quanto a cromatografia gasosa (*gas chromatographic* - GC) se apresentam como métodos sensíveis e seletivos para análise de NAs em medicamentos. Contudo, métodos de LC apresentam vantagens frente a GC para análises de NAs por permitir a análise de compostos termicamente instáveis e não voláteis. Devido à presença do IFA na amostra e a baixa concentração dessas impurezas, a determinação de NAs pode ser comprometida por diversos fatores, como o efeito matriz, efeitos de *carryover* e o comprometimento do sistema LC-MS. Assim, a etapa de preparo de amostra se mostra importante, visando a extração, purificação e pré-concentração do analito. Além disso, avanços na espectrometria de massas levaram ao desenvolvimento das técnicas de ionização ambiente que apresentam propósito de analisar amostras não processadas ou minimamente modificadas em seu ambiente nativo. Tais técnicas permitem análise de amostras *in situ*, e muitas vezes de forma não destrutível. Outro fator importante atualmente é a adequação de protocolos de análise com princípios sustentáveis, postulados pela química verde, que visam a redução do uso de solventes e amostra, redução do risco, redução energética e redução de resíduos. Assim, o presente estudo apresenta novas abordagens para análise de NAs em medicamentos ainda não exploradas pela literatura. O capítulo I demonstra o uso de uma técnica miniaturizada de preparo de amostra para separação e pré-concentração de NAs presentes em medicamentos para análise por LC-MS. Já o capítulo II apresenta a aplicação de uma técnica de ionização ambiente acoplada a espectrometria de massas para avaliação e quantificação de NAs em medicamentos.

Palavras-Chave: N-Nitrosaminas, Preparo de Amostra, Ionização Ambiente, Cromatografia Líquida, Espectrometria de Massas.

ABSTRACT

N-Nitrosamines (NAs) are molecules characterized by a deprotonated amine group linked to a nitroso group, usually formed through the reaction of secondary or tertiary amines with nitrosating agents. NAs are commonly found as impurities in various products, such as processed foods and cosmetics. These molecules are the subject of study due to their potential mutagenic and carcinogenic properties. In 2018, NAs were discovered in medicines containing the active ingredient valsartan. In sartan medicines, the occurrence of NAs was initially linked to the synthesis of the active pharmaceutical ingredient (API), as the reaction medium may contain precursor amines for NAs, as well as a nitrosating agent. Through more in-depth studies, it has been confirmed that the degradation of the API or its interaction with the packaging material could lead to the formation of NAs. These discoveries prompted global regulatory agencies to establish guiding principles regarding the presence and maximum allowable concentrations of these molecules in such medicines. Aiming to assess the content of NAs in medicines, efficient and sensitive analytical methods have been developed. The challenge in analyzing NAs in medicines lies in the low concentration of these analytes, as they are found in this matrix in the order of ng of N-nitrosamine per mg of the medicines. The literature presents various chromatographic methods coupled with mass spectrometry (MS) applied in such analyses. Both liquid chromatography (LC) and gas chromatography (GC) techniques provide sensitive and selective methods for the analysis of NAs in medicines. However, LC methods have advantages over GC as it allows the analysis of thermally unstable and non-volatile compounds. Due to the presence of the API in the sample and the low concentration of these impurities, the determination of NAs can be compromised by various factors, such as matrix effects, carryover effects, and the compromise and contamination of the LC-MS system. Thus, the sample preparation step proves to be important, aiming at the extraction, purification, and pre-concentration of NAs. Additionally, advances in mass spectrometry have led to the development of ambient ionization techniques designed to analyze samples that are either unprocessed or minimally modified in their native environment. These techniques enable the analysis of samples *in situ*, often in a non-destructive manner. Another important factor currently is the adaptation of analysis protocols with sustainable principles advocated by green chemistry, which aim to reduce the use of solvents and samples, minimize risks, decrease energy consumption, and reduce waste generation. Therefore, the present study introduces new approaches to the analysis of NAs in medicines that have not yet been explored in the literature. Chapter I demonstrates the use of a miniaturized sample preparation technique for the separation and pre-concentration of NAs in medicines followed by LC-MS analysis. Conversely, Chapter II presents the application of an ambient ionization technique coupled with mass spectrometry for the assessment and quantification of NAs in medicines.

Key Words: N-Nitrosamines, Sample Preparation, Ambient Ionization, Liquid Chromatography, Mass Spectrometry.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Limite diário aceitável de NAs em medicamentos

Tabela 2: Limites provisórios de NDMA, NDEA e NMBA em medicamentos da família sartana

Tabela 3: Métodos de análise para detecção de NAs em medicamentos reportada na literatura

CAPÍTULO I

Tabela 1.1: Tempo de retenção para cada analito avaliado pelo método

Tabela 1.2: Experimentos realizados no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}

Tabela 1.3: Experimentos realizados no planejamento de composto central

Tabela 1.4: Método de extração das NAs por DPX otimizado

Tabela 1.5: Comparação entre as formulações dos medicamentos comerciais de ibuprofeno e dos medicamentos sartana

Tabela 1.6: Linearidade, LD e LQ para análise das seis NAs em medicamento por DPX-LC-MS

Tabela 1.7: Valores de precisão (P%) e exatidão (E%) intradia e interdia, e recuperação (R%) para a análise das seis NAs por DPX-LC-MS (n=5)

Tabela 1.8: Valores relacionados aos testes de efeito matriz para as seis NAs avaliadas

Tabela 1.9: Concentração de NAs encontrada experimentalmente por DPX-LC-MS para amostras reais de medicamentos (n=3)

Tabela 1.10: Limite tolerável de NPIR, NDEA e NPIP em medicamentos sartana

CAPÍTULO II

Tabela 2.1: NAs encontradas nos medicamentos de losartana potássica e valsartana e sua m/z medida com o erro de massa obtidos pela análise direta por DART-MS

Tabela 2.2: NAs encontradas nos medicamentos de nimesulida e sua m/z medida com o erro de massa obtidos pela análise direta por DART-MS

Tabela 2.3: Comparação entre as formulações dos medicamentos comerciais avaliados por DART-MS

Tabela 2.4: Linearidade, LD e LQ para análise de seis NAs em medicamento por

DART-MS

Tabela 2.5: Valores de precisão e exatidão Intradia e Interdia para a análise das seis NAs por DART-MS (n=5)

Tabela 2.6: Valores relacionados aos testes de efeito matriz para as seis NAs avaliadas

Tabela 2.7: Concentração de NAs encontrada experimentalmente por DART-MS para amostras reais de medicamentos

Tabela 2.8: Limite tolerável de NPIR, NDEA e NPIP em medicamentos sartana

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura de ressonância das N-nitrosaminas

Figura 2: Formação de NAs por nitroação a partir do nitrito de sódio em meio ácido

Figura 3: Metabolismo de oxidação enzimática das N-nitrosaminas

Figura 4: Estrutura molecular dos alcaloides encontrados em cigarros. **A:** Nicotina; **B:** Nornicotina; **C:** Anatabina; **D:** Anabasina

Figura 5: Formação de NAs através da cloraminação

Figura 6: **A:** Etapa de síntese do anel tetrazol; **B:** Estrutura molecular dos fármacos sartana

Figura 7: Estrutura molecular dos IFAs: **A:** Ranitidina, **B:** Nizatidina e **C:** Metformina

Figura 8: Componentes de um cromatógrafo líquido

Figura 9: Componentes de um espectrômetro de massas

Figura 10: Representação de um tipo de espectrômetro de massas com analisador de massas qToF

Figura 11: Princípios da química analítica verde sugeridos por Galuszka e colaboradores

CAPÍTULO I

Figura 1.1: Modelo esquemático da técnica DPX

Figura 1.2: Cromatograma do íon extraído para cada N-nitrosamina analisada pelo método de LC-ESI-MS

Figura 1.3: Comparação da recuperação obtida para cada analito em cada fase extratora avaliada (n=3)

Figura 1.4: Comparação da recuperação obtida para cada solvente de dessorção (n=3)

Figura 1.5: Gráficos de Pareto para cada analito avaliado pelo planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}

Figura 1.6: Perfil de valores preditos de desejabilidade

Figura 1.7: Perfil de desejabilidade obtido através do planejamento de composto central: **A:** Superfície de desejabilidade; **B:** Contorno de desejabilidade; **C:** Valores preditos de desejabilidade

Figura 1.8: Recuperação das NAs pela extração por DPX após otimização (n=3)

Figura 1.9: Estrutura molecular do ibuprofeno

Figura 1.10: Comparação da curva analítica em matriz com a curva analítica em solvente como parâmetro de avaliação para o efeito matriz para as seis NAs

Figura 1.11: Concentração de NDEA determinadas por DPX-LC-MS em relação ao limite estabelecido pela ANVISA: **A:** Marcas de losartana; **B:** Marcas de valsartana

Figura 1.12: Concentração das demais NAs determinadas por DPX-LC-MS: **A:** Marcas de losartana; **B:** Marcas de valsartana

CAPÍTULO II

Figura 2.1: Representação da fonte de ionização DART

Figura 2.2: Representação da análise por DART-MS. **A:** Análise direta dos comprimidos; **B:** Análise da solução utilizando um cartão modelo QuickStrip

Figura 2.3: Comparação da análise direta da losartana por DART-MS utilizando hélio e nitrogênio como gás de ionização

Figura 2.4: Avaliação da variação de temperatura (50, 150, 200, 300 e 400 °C) na análise do medicamento losartana potássica no método de análise direta por DART-MS: **A:** Espectros de *full scan* para a faixa de 50 - 250 *m/z* (* pico referente a N-nitrosodietilamina); **B:** Resposta para a N-nitrosodietilamina (*m/z* 103,0866)

Figura 2.5: Avaliação da quantificação da NDEA em relação a temperatura em solução por DART-MS (n=3)

Figura 2.6: Avaliação dos comprimidos por análise direta por DART-MS. **A:** Avaliação da valsartana, losartana e nimesulida no método otimizado; **B:** Avaliação da losartana utilizando 250 °C; **C:** Avaliação da nimesulida utilizando 250 °C

Figura 2.7: Espectro de fragmentação do NDEA

Figura 2.8: Estrutura molecular da nimesulida

Figura 2.9: Estrutura molecular do ibuprofeno

Figura 2.10: Comparação da curva analítica em matriz com a curva analítica em solvente como parâmetro de avaliação para o efeito matriz para as seis NAs

Figura 2.11: Concentração de NDEA determinadas por DART-MS em relação ao limite estabelecido pela ANVISA: **A:** Marcas de losartana; **B:** Marcas de valsartana

ABREVIATÓES

AM - Resposta analítica para o analito em matriz

ANOVA - Análise de variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCI - Ionização química à pressão atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization*)

AS - Resposta analítica do analito em solução

CD - Ciclo de dessorção

CE - Ciclo de extração

Cexp - Concentração experimental

CMD - Concentração média determinada

CT - Concentração teórica

DART - análise direta em tempo real (*direct analysis in real time*)

DESI - Dessorção por *electrospray* (*desorption electrospray ionization*)

DIPNA - N- di-isopropilnitrosamina

DMF -Dimetilformamida

DP - Desvio padrão

DPX -extração sortiva em ponteira de micropipeta (*Disposable Pipette Extraction*)

E% - Exatidão

EIC - Cromatograma do íon extraído (*extract ion chromatogram*)

EIPNA - N- etilisopropilnitrosamina

ESI- *Electrospray*

EM - erro de massa

EMA - Agência Europeia de Medicamentos (*European Medicines Agency*)

FCSI - *filter cone spray ionization*

FDA - Administração Federal de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (*U.S. Food and Drug Administration*)

FE - Fase estacionaria

FM - Fase móvel

FMN - fator de matriz normalizado

GC - Cromatografia gasosa (*gas chromatographic*)

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography*)

IARC - Agencia Internacional de Pesquisa ao Câncer (*International Agency for*

Research on Cancer)

ICH - Conselho Internacional para Harmonização de requisitos técnicos para medicamentos de uso humano (*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*)

IFA - Insumo farmacêutico ativo

IRIS - Sistema Integrado de Informação de Risco (*Integrated Risk Information System*)

LC - Cromatografia líquida (*liquid chromatographic*)

LD - Limite de detecção

LLE - Extração líquido-líquido (*liquid-liquid extraction*)

LQ - Limite de quantificação

MS - Espectrometria de massas (*mass spectrometry*)

m/z - Massa/carga

ND - Não detectado

NAs - N-nitrosaminas

NDBA - N-nitroso-N-dibutilamina

NDEA - N-nitrosodietilamina

NDMA - N-nitrosodimetilamina

NMBA - N-nitroso-N-metil-4-mminobutírico

NMEA - N-nitroso-N-metiletilamina

NMOR - N-nitrosomorfolina

NPIP - N-nitrosopiperidina

NPIR - N- nitrosopirrolidina

OMS - Organização Mundial da Saúde

P% - Precisão

PESI - Ionização em probe (*Probe Electrospray Ionization*)

PI - Padrão interno

PSI - Ionização por *paperspray*

qToF - Quadrupolo – Tempo de voo

S/R - Razão sinal/ruído

SPE - Extração em fase sólida (*solid phase extraction*)

R% - Recuperação

SPME - microextração em fase sólida (*solid phase microextraction*)

TE - Tempo de equilíbrio

ToF - Tempo de voo (*time of flight*)

TTC - Limiar de Preocupação Toxicológica (*Threshold of Toxicological Concern*)

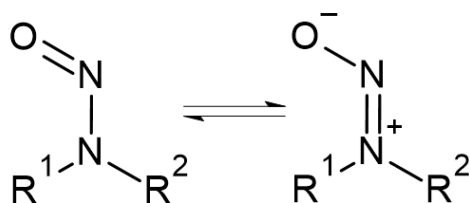
UHPLC - Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (*ultraperformance liquid chromatography*)

INTRODUÇÃO GERAL

1. N-NITROSAMINAS

As N-nitrosaminas, ou nitrosaminas, (NAs) (**Figura 1**) são compostos orgânicos estáveis que têm por estrutura geral um grupo amina desprotonado ligado a um grupo nitroso e a dois grupos alquil (R_1 e R_2) [1,2]. Essas moléculas foram inicialmente estudadas por Otto Witt, ainda em 1870, que definiu essa classe de moléculas como “qualquer amônia substituída que contenha, em vez de pelo menos um átomo de hidrogênio, o grupo nitroso univalente, -NO, em conexão imediata com o nitrogênio amoniacal.” [1,3,4].

Figura 1: Estrutura de ressonância das N-nitrosaminas

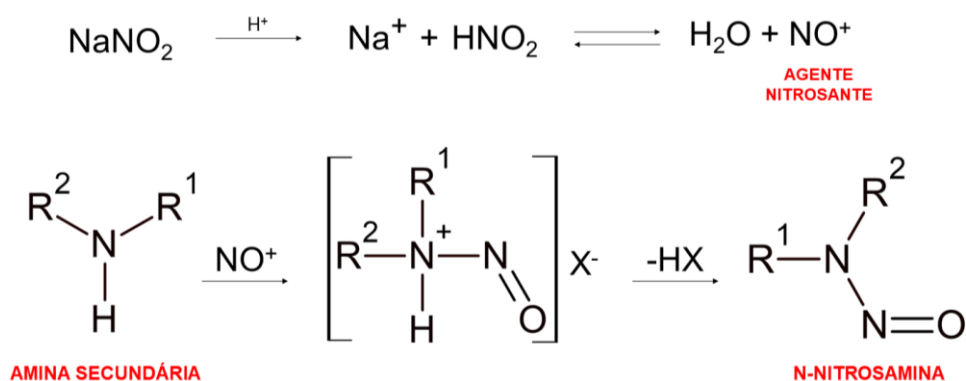


Fonte: do autor.

NAs são formadas pela reação de aminas secundárias, terciárias ou quaternárias com agentes nitrosantes, como ácido nítrico ou sais de nitrato e nitrito (NO_x) em meio ácido (**Figura 2**). Além desses, outros compostos como nitritos de alquila, tetróxido de dinitrogênio, anidrido nitroso, haletos de nitrosila, nitrosiltiocianato entre outros, demonstram capacidade de nitrosar aminas visto que formam a espécie reativa NO^+ [5]. Essas moléculas são amplamente estudadas e são atualmente uma preocupação global dado seu potencial mutagênico e carcinogênico [2]. O potencial carcinogênico da N-nitrosodimetilamina (NDMA) foi comprovada em 1956, por um estudo de Magee e colaboradores [6] que demonstraram que a molécula seria causadora de tumores hepáticos avaliados em ratos. A Agência Internacional de Pesquisa ao Câncer (*International Agency for Research on Cancer* - IARC) classifica como possivelmente carcinogênico em humanos (grupo 2A) a NDMA e N-nitrosodietilamina (NDEA) e é alvo de estudos pela agência desde 1987. Já o Sistema Integrado de Informação de Risco (*Integrated Risk Information System* - IRIS) atribui outras sete NAs como

provavelmente carcinogênicas a humanos (grupo 2B) [7].

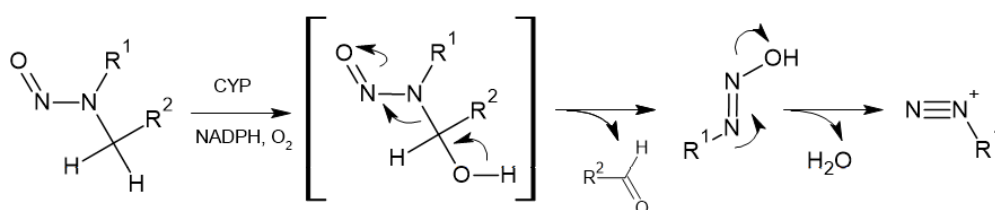
Figura 2: Formação de NAs por nitroação a partir do nitrito de sódio em meio ácido



Fonte: Adaptado de ANVISA [5].

Estudos sugerem que tal efeito carcinogênico das NAs se deve ao mecanismo de bioativação da molécula através de um metabolismo de oxidação por enzimas, como o citocromo P450s (CYP2E1). Essa reação de oxidação (**Figura 3**) forma diazo-hidróxido como produto intermediário e um aldeído derivado da molécula [7,8]. A decomposição do diazo-hidróxido gera uma molécula de N-alquildiazônio que é um eletrófilo alquilante potente, capaz de reagir com proteínas e com o DNA. O eletrófilo formado reage com sítios nucleofílicos dessas moléculas, como o N⁷ da guanidina, e o O⁴ da tiamina que são passíveis de sofrer tal alquilação, gerando adutos estáveis que apresentam características carcinogênicas [2].

Figura 3: Metabolismo de oxidação enzimática das N-nitrosaminas

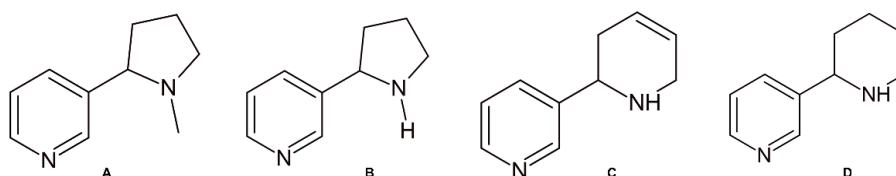


Fonte: Adaptado de Dobo e colaboradores [8].

Ademais, o aldeído formado como subproduto da reação pode reagir com essas macromoléculas e gerar adutos uma vez que o formaldeído, a exemplo, é classificado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela IARC como carcinogênico em humanos. Assim, as NAs são consideradas moléculas carcinogênicas bidentadas [7]. A presença desses compostos mutagênicos em baixas concentrações já é amplamente conhecida na fumaça de cigarro [9], em água potável [7], cosméticos [10], e em alimentos fermentados e/ou processados [11].

Pesquisas apontam que dentre os muitos compostos carcinogênicos presentes na fumaça de cigarro, existem as N-nitrosaminas específicas do tabaco, como a nitrosoanatabina e a nitrosonornicotina [9,12]. A presença dessas moléculas advém de alcaloides presentes nos cigarros (**Figura 4**), como a nicotina, que tem em sua estrutura uma amina terciária, e a nornicotina, anatabina e anabasina, que possuem aminas secundárias em suas estruturas. A reação do grupo amina dessas moléculas com agentes nitrosantes leva a formação das N-nitrosaminas específicas do tabaco. Assim, essa classe de NAs podem ser encontradas tanto em cigarros tradicionais quanto nos cigarros eletrônicos que possuem nicotina [9,12].

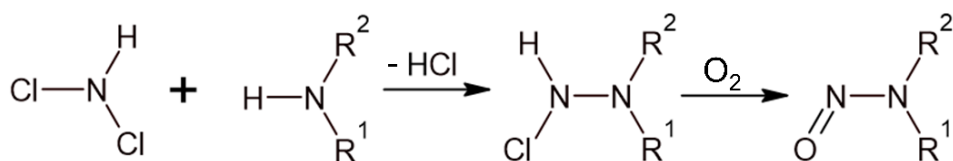
Figura 4: Estrutura molecular dos alcaloides encontrados em cigarros. **A:** Nicotina; **B:** Nornicotina; **C:** Anatabina; **D:** Anabasina



Fonte: do autor.

Já a ocorrência de NAs em água potável é relacionada ao processo de tratamento de água, tanto químicos como físicos. Estudos reportam que o uso da cloraminação como tratamento de água potável pode levar a formação dessas moléculas uma vez que a dicloroamina pode reagir com uma molécula de amina precursora (**Figura 5**) [13]. A molécula de dicloroamina age como um nucleófilo, atacando sítios eletrofílicos de aminas. O produto dessa reação, se oxidado, leva a formação das NAs. Nesses casos, valores maiores de pH podem aumentar o rendimento de reação uma vez que mantém a amina desprotonada [7,13].

Figura 5: Formação de NAs através da cloraminação



Fonte: Adaptado de Krasner e colaboradores [13].

Outro mecanismo de formação dessas impurezas em água é o tratamento por ozonização, podendo levar aminas secundárias ou até mesmo moléculas contendo hidrazina ou sulfamidas a formação das NAs [7,13]. Já outros estudos relatam que o uso de materiais de filtração, como o carvão ativado ou mesmo a coagulação por poli (cloreto de dialildimetilamônio) pode levar a contaminação de água potável por NAs [13,14].

Em cosméticos, a presença de NAs é conhecida desde 1977. Nesses casos, essas moléculas são formadas como impurezas por reações de aminas presente nos componentes da formulação de cosméticos. Ademais, alguns conservantes desses produtos possuem grupos nitrosos, como o bronopol ($\text{C}_3\text{H}_6\text{BrNO}_4$) e bronidox ($\text{C}_4\text{H}_6\text{BrNO}_4$), que são precursores das NAs [10,15]. Atualmente, a legislação europeia proíbe o uso de agentes que podem ser precursoras dessas impurezas em cosméticos, como moléculas que apresentam alquilaminas e estabelece o limite máximo de 50 ng/mg de nitrosamina no produto acabado [15].

A literatura ainda relata diversas incidências dessas moléculas mutagênicas em alimentos processados e fermentados [11]. Em carnes processadas, é preconizado o uso de sais de nitrito e nitrato como aditivos na composição, que atuam como agentes conservantes, apresentarem funções antioxidantes e antimicrobianas e ainda contribuem com o sabor e aroma desses produtos. Tais aditivos podem agir como agentes nitrosantes, que, reagindo com aminas presente nesses produtos, podem levar a formação das NAs [16,17].

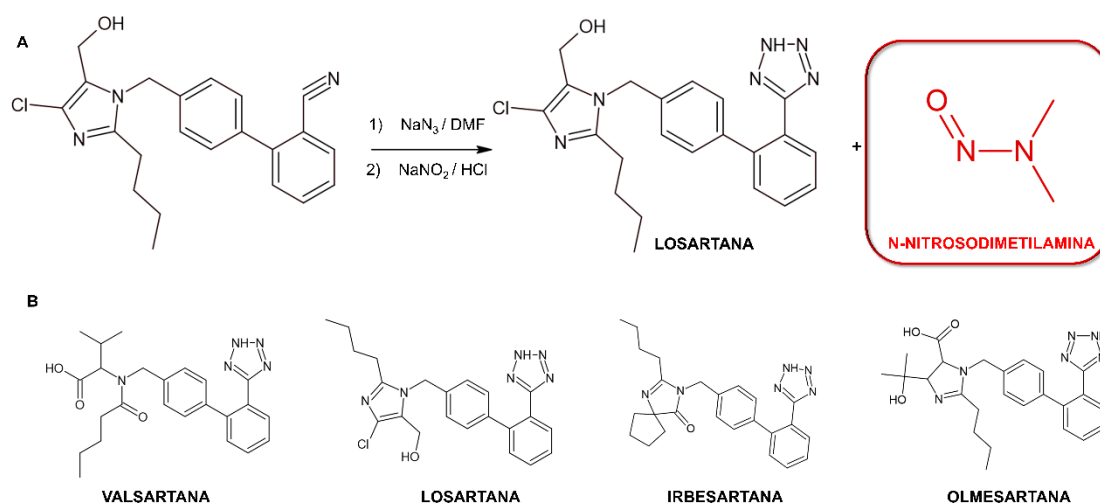
Ademais, alimentos fermentados, como salsichas fermentadas, também já demonstraram incidência dessas moléculas uma vez que moléculas precursoras das NAs podem ser formadas no processo de degradação proteica na fermentação, como a dimetilamina [11,16,17]. Ainda é importante ressaltar que o teor de NAs nesses alimentos pode aumentar através do cozimento desses alimentos, uma vez

que a temperatura pode catalisar as reações de nitrosação de aminas [11,17].

Em junho de 2018, NAs foram encontradas em medicamentos contendo valsartana, princípio ativo da família sartana que são medicamentos de uso contínuo que atuam como controladores da pressão arterial, bloqueando receptores angiotensina II [18,19]. Em medicamentos sartana, a ocorrência das NAs foi inicialmente atrelada à síntese do insumo farmacêutico ativo (IFA), uma vez que o meio reacional pode haver aminas precursoras das NAs, bem como um agente nitrosante. Com estudos mais aprofundados, foi comprovado que a degradação do IFA ou sua interação de IFAs com a embalagem poderiam levar a formação das NAs [3,20].

No que compete os medicamentos contendo valsartana, a formação das NAs tem relação com a etapa de síntese do anel tetrazol (**Figura 6 A**), presente no princípio ativo [2,21]. Essa etapa tem como reagente uma bifenilnitrila e um sal de azida (geralmente NaN_3). O sal de azida não reagente necessita ser eliminado uma vez que é altamente tóxico e explosivo, e a alternativa é a adição de nitrito com a finalidade de formar óxidos nitrosos. Em consequência, as NAs também são formadas uma vez que é possível ter dialquilaminas no meio reacional [2,21]. De acordo com a Agência Europeia de Medicamentos (*European Medicines Agency - EMA*), outros IFAs da família sartana (**Figura 6 B**) que possuem o anel tetrazol, como o losartana e irbesartana, são potenciais fontes das NAs [22].

Figura 6: A: Etapa de síntese do anel tetrazol; **B:** Estrutura molecular dos fármacos sartana

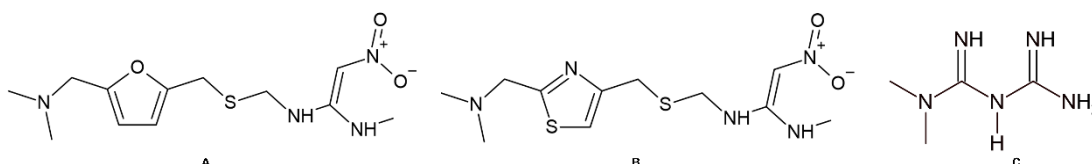


Fonte: Adaptado de Akkaraju e colaboradores [21].

Ademais, as NAs relacionadas a fármacos podem ter origem decorrente do solvente utilizado na reação, como o uso de dimetilformamida (DMF) que leva a formação da NDMA. Assim, em medicamentos, apresenta-se em maior quantidade as dimetilaminas e dietilaminas, que geram NDMA e NDEA, mas ainda há a incidência de outras NAs, dependendo de fontes da fração dialquilamina [2,21]. Além disso, reagentes como dimetilamina, trielilamina e ácido N-metil-4-aminobutanóico também são possíveis precursores das NAs encontradas em medicamentos [2,21,23].

Estudos iniciais relacionados aos medicamentos sartana levou ao estudo de outros medicamentos acerca da ocorrência das NAs, como a ranitidina, metformina e nizatidina (**Figura 7**). A ranitidina é um agente antiulceroso que foi removido do mercado dado a ocorrência da NDMA em lotes do medicamento. Nesse caso, a rota de formação das NAs no medicamento ainda é incerta, mas estudos da Administração Federal de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (U.S. *Food and Drug Administration* - FDA) demonstraram que o teor de NDMA aumenta com o tempo de prateleira do produto, indicando que a ranitidina é precursora de NAs [3,21].

Figura 7: Estrutura molecular dos IFAs: **A:** Ranitidina, **B:** Nizatidina e **C:** Metformina



Fonte: do autor.

Um estudo da FDA objetivou a degradação forçada da ranitidina, submetendo o medicamento a temperatura de 70 °C durante 12 dias, o que demonstrou que o teor de NDMA passou de 18 para 142 ng [24]. Assim, o mais provável é que a degradação do IFA leva a formação dessas impurezas, uma vez que a molécula apresenta grupo amina e grupo nitroso [3,21]. Além disso, a formação da NDMA nesses medicamentos também pode estar atrelada a síntese do IFA, uma vez que é usado nitrito de sódio como reagente [25]. No que tange medicamentos contendo metformina, a ocorrência de NAs foi relacionada ao uso de

DMF na síntese do IFA, uma vez que pode haver DMF residual no produto final, podendo reagir com grupos nitrosos de outras fontes, como os excipientes [20,26].

Recentemente, estudos relataram que a interação dos compostos do medicamento com a embalagem do produto final pode induzir a formação de NAs [20]. A EMA reportou que o uso de nitrocelulose como blister nas embalagens de medicamentos pode favorecer a formação das NAs, uma vez que o material pode interagir com aminas presentes no medicamento [20,27]. Outros estudos mais recentes também indicaram a presença de NAs em diversos outros medicamentos comerciais, como em maleato de enalapril [28] e em rifampicina [29].

2. LIMITES ACEITÁVEIS DE N-NITROSAMINAS

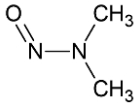
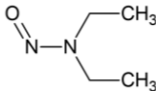
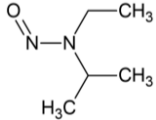
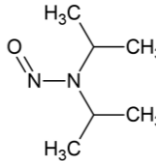
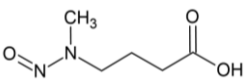
A exposição a NAs diariamente já está bem estabelecida em fontes como a fumaça de cigarro e carnes processadas. Estudos apontam que consumidores de carne processada são expostos a NDMA diariamente, variando de 0,0004 a 0,23 µg por dia quando ingerido carne dessecada e de 0,0004 a 1,02 µg por dia para carnes defumadas [18]. Já a exposição diária de NAs em água está em torno de 0,6 ng por dia para NDMA e de 0,8 ng por dia para NDEA [18,30].

Em medicamentos, a abordagem padrão para delimitar limites aceitáveis de substâncias mutagênicas é empregar a extrapolação linear de baixa dose a partir dos dados de resposta à dose carcinogênica, de acordo com o Conselho Internacional para Harmonização de requisitos técnicos para medicamentos de uso humano (*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use - ICH*). O guia M7 (R1) do ICH de 25 de agosto de 2015 avalia e gerencia a qualidade e segurança de medicamentos, estabelecendo limites aceitáveis de impurezas mutagênicas e cancerígenas nos insumos farmacêuticos, de acordo com o uso do produto. Ademais, a diretriz aplica um Limiar de Preocupação Toxicológica (*Threshold of Toxicological Concern -TTC*) que define doses aceitáveis de substâncias que foram pouco estudadas que apresentam tais riscos à saúde [31]. Assim, com a descoberta das NAs em medicamentos, o ICH M7(R1) inclui essas impurezas no “grupo de preocupação” dado seu alto potencial cancerígeno e define que seu TTC é menor que outras substâncias cancerígenas que não se enquadram no grupo de preocupação e de tal modo esse limiar não se aplica às NAs [8].

Nesse sentido, a EMA apresenta duas abordagens para delimitar limites aceitáveis dessas impurezas. A primeira se baseia em um TTC de caráter preventivo e conservador de 18 ng por dia para a N-nitrosamina com maior potencial mutagênico. A outra opção permite derivar um limite aceitável apropriado por meio de uma avaliação utilizando um método comparativo por interpolação. Nesse método, dados de carcinogenicidade em animais para moléculas relacionadas às NAs são usados para estimar a dose necessária para induzir uma chance de 50% de incidência de tumor com exposição ao longo da vida (TD₅₀) para a molécula de N-nitrosamina com potencial carcinogênico desconhecido [8,18,30].

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) promoveu a inspeção de diversos medicamentos e seus produtores a fim de investigar a presença das NAs nos medicamentos comercializados. A agência disponibilizou o Guia sobre o Controle de Nitrosaminas em Insumos Farmacêuticos Ativos e Medicamentos que estipula a responsabilidade de empresa, recomenda estratégias de controle de NAs e impõem limites aceitáveis (**Tabela 1**) [5].

Tabela 1: Limite diário aceitável de NAs em medicamentos

Nitrosamina (sigla)	Nomenclatura	Molécula	Dose aceitável (ng/dia)
NDMA	N-dimetilnitrosamina		96,0
NDEA	N-dietilnitrosamina		26,5
EIPNA	N- etilisopropilnitrosamina		26,5
DIPNA	N- di-isopropilnitrosamina		26,5
NMBA	N-nitroso-N-metil-4- mminobutírico		96,0

Os limites estipulados para as NAs estão em concordância com princípios estipulados pelo guia M7(R1) do ICH e com os cálculos provisórios elaborados pela EMA e a FDA que se embasaram em estudos de carcinogenicidade em animais. Utilizando tais valores, é possível estipular limites aceitáveis de NAs em medicamentos (**Tabela 2**) [5].

Tabela 2: Limites provisórios de NDMA, NDEA e NMBA em medicamentos da família sartana

Medicamento	Dose diária máxima / mg	Limite (ng/mg)		
		NDMA	NDEA	NMBA
Valsartana	320	0,300	0,083	0,300
Losartana	100	0,960	0,265	0,960
Irbesartana	300	0,320	0,088	0,320
Olmesartana	40	2,400	0,663	2,400
Candesartana	32	3,000	0,828	3,000
Telmisartana	80	1,200	0,331	1,200

Consoante a ANVISA, a Resolução RDC Nº 677, de 28 de abril de 2022, dispõe sobre avaliação de risco e controle de NAs potencialmente carcinogênicas em IFAs e medicamentos de uso humano. A RDC estabelece regras de avaliação de risco, execução de testes confirmatórios e controle de NAs em medicamentos. Ainda preconiza que as indústrias responsáveis pela fabricação desses medicamentos devem avaliar reagentes, solventes, reuso de solventes, degradação do IFA e contaminações cruzadas entre processos [32].

3. ANÁLISE DE N-NITROSAMINAS EM MEDICAMENTOS

O desafio de analisar NAs em medicamentos reside na baixa concentração que esses analitos, uma vez que são encontrados nessa matriz na ordem de ng/mg. Assim, dado a necessidade de avaliar o teor dessas impurezas presentes em medicamentos comercializados, métodos analíticos sensíveis, eficientes e específicos têm sido desenvolvidos [2]. A farmacopeia brasileira ainda não dispôs um método padrão para análise de NAs em medicamentos [5].

A literatura apresenta diversos métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas (*mass spectrometry* - MS) aplicados em tais análises (Tabela 3).

Tabela 3: Métodos de análise para detecção de NAs em medicamentos reportada na literatura

Técnica de análise	Matriz	Limite de Detecção	Limite de Quantificação	Referência
LC-APCI-MS	Losartana	NDMA: 0,10 ng/mL NDEA: 0,32 ng/mL	NDMA: 1,0 ng/mL NDEA: 1,0 ng/mL	[33]
LC-APCI-MS/MS	Visine (Solução oftalmológica)	NDMA: 0,06 ng/mL NDEA: 0,04 ng/mL	NDMA: 20,0 ng/mL NDEA: 10,0 ng/mL	[34]
LC-APCI-MS/MS	Valsartana Losartana Irbesartana	NDMA: 20,0 ng/g NDEA: 20 ng/g	NDMA: 50,0 ng/g NDEA: 50 ng/g	[35]
LC-ESI-HRMS	Metformina	NDMA: 0,50 ng/mL NDEA: 0,20 ng/mL	NDMA: 1,0 ng/mL NDEA: 2,0 ng/mL	[36]
DICM-LC-APCI-MS	Valsartana Losartana	NDMA: 0,20 ng/mL NDEA: 0,20 ng/mL	NDMA: 0,50 ng/mL NDEA: 0,50 ng/mL	[37]
SPE-GC-MS	Valsartan	NDMA: 0,30 ng/mg NDEA: 0,07 ng/mg	NDMA: 0,90 ng/mg NDEA: 0,30 ng/mg	[26]
DLLME-GC-MS	Ranitidina	NDMA: 6,6 ng/g NDEA: 0,29 ng/g	NDMA: 21 ng/g NDEA: 0,96 ng/g	[3]
SALLE-LC-APCI-MS/MS	Mab A (Anticorpo monoclonal)	NDMA: 0,05 ng/mL NDEA: 0,01 ng/mL	NDMA: 0,50 ng/mL NDEA: 0,50 ng/mL	[38]

NDMA: N-nitrosodimetilamina.; NDEA: N-nitrosodietilamina; LC: Cromatografia líquida; GC: Cromatografia gasosa; MS: Espectrometria de massas; ESI: *Electrospray*; SPE: Extração em fase sólida; APCI: Ionização química a pressão atmosférica; SALLE: Extração líquido-líquido com adição de sal; DLLME: Microextração líquido-líquido dispersiva; DICM: Microextração complexa de inclusão dispersiva

Métodos utilizando a cromatografia líquida (*liquid chromatographic* - LC) e utilizando a cromatografia gasosa (*gas chromatographic* - GC) se apresentam como métodos sensíveis e seletivos para análise de NAs em medicamentos [3,33,36,39]. Mesmo que as técnicas baseadas em GC se mostram robustas para a análise de NAs, são limitantes para moléculas que não são termicamente estáveis [39]. Ademais, estudos de degradação de medicamentos sugerem que as NAs relacionadas a fármacos podem ser formadas em altas temperaturas aplicadas em métodos de GC, o que compromete a análise para alguns medicamentos [2]. Desta forma, métodos de LC apresentam vantagens frente a GC para análises de NAs, como permitir a análise de compostos termicamente instáveis [40].

Devido à presença do IFA na amostra e a baixa concentração dessas impurezas, a determinação de NAs pode ser comprometida por diversos fatores. O método está suscetível a sofrer o efeito de matriz, o qual influencia na capacidade de separação cromatográfica do método aplicado por alterar o comportamento de retenção dos analitos, implicando em erros na sua quantificação e identificação. A não utilização de uma técnica de preparo de amostras pode ocasionar o carregamento de substâncias indesejadas presentes na injeção do equipamento, o que compromete a assertividade dos resultados. Outro ponto a se considerar é a possibilidade de ocorrer retenção prolongada do analito, resultando no efeito denominado *carryover*, ou também conhecido como efeito de memória [1]. Assim, a etapa de preparo de amostra se mostra importante, visando a extração, purificação e pré-concentração do analito [41].

3.1 Técnicas de Preparo de Amostra

Um procedimento analítico pode ser dividido em etapas como: amostragem, preparo de amostra, detecção e análise de dados [42]. A análise de matrizes complexas e concentradas pode apresentar desafios quanto a detecção do analito devido a interferentes intrínsecos da matriz, dificultando ensaios qualitativos e quantitativos. Assim, não há dúvidas que a etapa do preparo de amostra é crucial para o sucesso da análise[42,43]. O objetivo dessa etapa é separar e pré-concentrar os analitos que estão presentes em uma matriz, proporcionando alta precisão e sensibilidade nos métodos analíticos [44].

As técnicas de preparo de amostra empregadas nos diversos procedimentos analíticos devem considerar as propriedades físico-químicas dos analitos, da matriz em que ele está inserido e do meio extrator. As interações entre essas fases são determinantes para a separação do componente desejado. De tal modo, propriedades intrínsecas do analito podem contribuir com a transferência entre fases imiscíveis durante os processos de extração, como o peso molecular, a pressão de vapor, a solubilidade, o equilíbrio ácido-base e a hidrofobicidade [45].

Nesse cenário, algumas técnicas tradicionais como a extração líquido-líquido (*liquid-liquid extraction* - LLE) e a extração em fase sólida (*solid phase extraction* - SPE) são comumente empregadas na etapa de preparo de amostra por se apresentarem como alternativas eficazes para eliminar interferentes inerentes da matriz e realizar a extração e pré-concentração de analitos. Se baseiam nessas propriedades dos analitos e da fase extratora para o seu sucesso [44–46]. A LLE se baseia em duas fases líquidas imiscíveis, sendo geralmente uma fase aquosa e uma fase orgânica. Seu sucesso depende da afinidade do analito na fase extratora, uma vez que o analito se distribui entre as duas fases, dependendo da sua solubilidade em cada solvente [44,45].

Já a SPE se utiliza da interação da amostra em fase líquida e a fase sólida extratora. Essa técnica de extração não se baseia no equilíbrio entre as fases e é considerada uma extração exaustiva, se baseando na retenção dos analitos na fase extratora pela afinidade dessa fase e do analito [44,45,47]. No entanto, esta técnica apresenta difusão lenta dos analitos, o que torna a técnica dispendiosa e com baixa frequência analítica. A SPE ainda apresenta desvantagens como a considerável quantidade de amostra e solvente utilizados e o alto custo dos aparatos [48]. Uma alternativa seria a utilização da fase sólida dispersiva, o que proporciona maior contato entre o sorvente e o analito, favorecendo a transferência de massa entre as fases e diminuindo assim o tempo de extração, assim como, os volumes de amostra e solventes empregados [47].

Muitas dessas técnicas tradicionais de preparo de amostra se apresentam satisfatórias em diversas aplicações analíticas por apresentarem boa reprodutibilidade e recuperação e estando de acordo com regulamentações vigentes. Contudo, essas técnicas podem apresentar processos laboriosos e

demorados, além de requererem um grande consumo de fase extratora e/ou solvente orgânico [49–51]. Tais características não se adequam nos processos mais sustentáveis de análise. Assim, em meados dos anos 90, técnicas miniaturizadas de preparo de amostra emergiram como alternativas mais sustentáveis, uma vez que prometeram a redução do volume de solvente e fase extratora [51,52]. Nesse cenário, microextração em fase sólida (*solid phase microextraction* – SPME), surgiu como uma técnica de preparo de amostra miniaturizada que vem sendo vastamente aceita uma vez que objetiva a amostragem, extração e pre-concentração dos analitos utilizando de baixas quantidades de fase extratora, solvente e amostra. A seguir, diversas outras técnicas miniaturizadas de preparo de amostra ganharam espaço por demonstrarem fácil manuseio e rapidez, além de serem compatíveis com métodos sustentáveis de análise [51].

No tocante a análises de impurezas presentes em baixas concentrações em produtos farmacêuticos, a etapa de preparo de amostra é fundamental para garantir e assegurar a detecção e quantificação dessas moléculas, evitando efeitos inerentes da matriz [53]. Durante a síntese e a formulação desses produtos, impurezas podem ser formadas, advindas da rota de síntese, do uso de solventes e mesmo dos excipientes e matérias de embalagem empregados, como é o caso das NAs. Para sua determinação, é essencial a etapa de preparo de amostra [53,54].

Para determinação de NAs em medicamentos, a aplicação das técnicas tradicionais de preparo de amostra já estão bem consolidadas [54]. A maior parte dos métodos de LLE para determinação de NAs em medicamentos faz o uso de diclorometano como solvente de extração, visto sua afinidade com essas impurezas [54]. Campillo e colaboradores utilizaram a microextração líquido-líquido dispersiva para a extração de nove NAs em ranitidina. Os autores utilizaram metanol como solvente dispersante e clorofórmio como solvente de extração, e o extrato foi analisado por GC-MS. Foi demonstrado a excelência na extração conjunta dessas nove NAs em matriz de ranitidina, demonstrando baixo coeficiente de variação e alto rendimento [3].

A SPE se apresenta como um método sensível para a extração e pré-concentração de NAs em diversos métodos na literatura. Um estudo de Lim e

colaboradores [26] utilizou cartuchos SPE de carvão ativado para a extração da NDMA e NDEA de medicamentos comerciais para posterior análise por GC-MS, demonstrando que o método de separação e pré-concentração dessas moléculas foi eficiente. Outra fase extratora vastamente utilizada para extração das NAs por SPE é uma fase comercial HLB que é um material polimérico de fase reversa. Yamamoto e colaboradores utilizaram essa fase para a extração de NDMA presente em metformina, ranitidina e medicamentos sartana, demonstrando resultados satisfatórios na extração e pré-concentração desses analitos [1].

A literatura também reporta o uso de técnicas miniaturizadas derivadas da SPE para análise de NAs. Um recente estudo de Santos e colaboradores [55] aplicou a microextração por sorvente empacotado para determinação de NAs em losartana para posterior análise por LC-MS. Dentre diversas fases extratoras, os autores demonstraram a eficiência de uma fase composta por poliestireno e divinilbenzeno para a extração dessas impurezas. Os autores ainda demonstraram a otimização univariada e multivariada dos parâmetros mais influentes na extração, levando a boa recuperação das NAs. De tal modo, os métodos miniaturizados de preparo de amostra se mostram eficazes para análise de NAs em medicamentos.

3.2 Cromatografia Líquida – LC

A cromatografia líquida é um método físico-químico fundamentado na separação de substâncias que é amplamente difundido em diversas aplicações de identificação e quantificação. Os métodos atuais baseados na cromatografia líquida são geralmente empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography* – HPLC) ou a cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (*ultraperformance liquid chromatography* – UHPLC). Essa técnica é amplamente utilizada na separação de misturas complexas, apresentando até mesmo capacidade de separação de isômeros [56,57].

A técnica se baseia na partição dos analitos entre uma fase estacionária (FE) e uma fase móvel (FM). O modo de eluição pode ser ditado quanto a polaridade dessas fases. Os primeiros métodos cromatográficos utilizavam a FE polar e a FM menos polar, conhecida como LC de fase normal. Com o avanço

da técnica e com o intuito de diminuir o uso de solventes apolares tóxicos, a modificação de matérias permitiu o uso da FE menos polar e o uso de solventes na FM mais polares, como água e acetonitrila, conhecido como LC de fase reversa [57,58]. Ainda é importante considerar a força de solvente, que é determinada pela habilidade do eluente em influenciar a retenção do analito. Em modo normal de eluição, o hexano é considerado o eluente menos forte, enquanto a água é o eluente menos forte na fase reversa. Hoje, diversos métodos que empregam a cromatografia líquida de fase reversa utilizam FE modificadas quimicamente com ligantes apolares, como cadeias C18, C8, fenil e outros, contudo a cromatografia de fase normal ainda é bastante empregada [58–60].

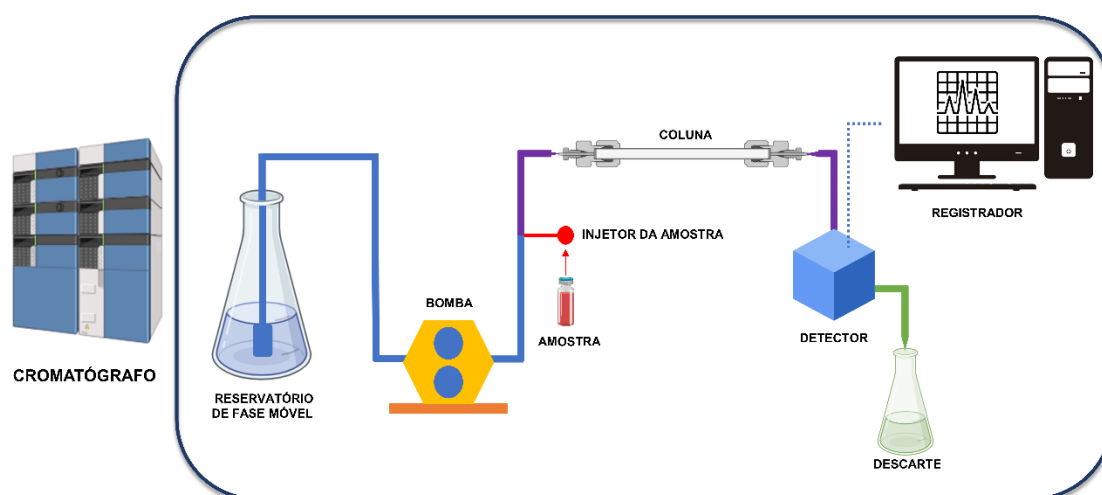
O mecanismo de separação por LC pode ser explicado pela adsorção, que há a competição dos analitos entre os sítios ativos da FE, ou partição dos analitos entre as fases, que é baseada na distribuição dos analitos entre as fases. Dos parâmetros acerca dos métodos de LC, o tempo de retenção do analito é de extrema importante uma vez que é dependente das interações dos analitos com a FM e a FE, da polaridade dessas fases, do pH do meio e da temperatura. Se tratando de LC de fase reversa, a exemplo, quanto maior o tempo de retenção do analito, menos polar o analito é. Empregando as mesmas condições cromatográficas, considerando a composição de FE e FM, espera-se que o analito obtenha sempre o mesmo tempo de retenção, visto que as interações entre o analito com a FM e a FE são as mesmas [60,61].

Ademais, a técnica permite a utilização de mais de um solvente como FM, de acordo com o método. O modo de eluição da FM ainda pode ter a composição entre os solventes fixas durante toda análise cromatográfica, o que é chamado de composição isocrática da FM. Nesse caso, a força do solvente de eluição permanece constante durante toda análise cromatográfica. Há a possibilidade de mudança na composição da FM durante a corrida, o que permite análises cromatográficas em modo gradiente de eluição da FM. Isso permite a variação da força do solvente de eluição durante a análise cromatográfica, o que pode favorecer a separação de compostos. Ainda existem diversos parâmetros relacionados à análise por LC que podem contribuir para a melhora da separação cromatográfica, como o fluxo de FM, temperatura da coluna e as características intrínsecas da coluna, como tamanho de partícula e o empacotamento da coluna

[62,63].

Os cromatógrafos à líquido modernos apresentam como componentes reservatório de FM, bombas, injetor de amostra (manual ou automático), coluna, sistema de detecção e um registrador (**Figura 8**). Esses equipamentos podem apresentar diversos métodos de detecção. Dos métodos existentes, destaca-se o uso de detectores UV-VIS, arranjo de diodos, fluorescência e espectrometria de massas, sendo esses vastamente empregados em diversos métodos [61,62]. Os métodos de LC que utilizam a espectrometria de massas (LC-MS) como sistema de detecção se destacam pela sua alta sensibilidade e especificidade, além da versatilidade quanto a fonte de ionização e ao analisador do espectrômetro de massas [64].

Figura 8: Componentes de um cromatógrafo líquido



Fonte: do autor (criado com BioRender.com - 2023)

Dentre as diversas aplicações dos métodos de LC, destacamos os métodos aplicados na indústria farmacêutica. O controle de qualidade de medicamentos é alvo de diversas pesquisas uma vez que os medicamentos necessitam ser seguros e eficazes, assim a indústria farmacêutica se apresenta como uma das indústrias mais reguladas em todo o mundo [65]. Assim, métodos cromatográficos são geralmente os métodos escolhidos quanto a ensaios de pureza, controle de qualidade, controle de impurezas, estudos farmacocinéticos e de metabolismo de medicamentos, uma vez que esses ensaios requerem

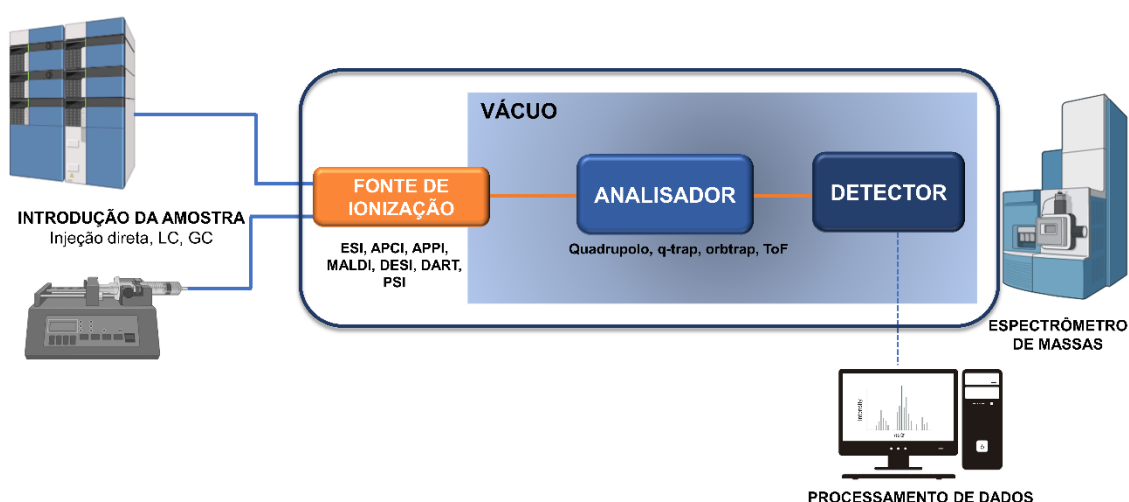
separações de alto rendimento [63,65]. A farmacopeia americana apresenta em torno de 44% dos métodos padrões de análise de insumos farmacêuticos baseados nas técnicas de LC uma vez que apresentam alta sensibilidade e reprodutibilidade [62].

3.3 Espectrometria de Massas – MS

A técnica de espectrometria de massas é atualmente considerada uma das ferramentas analíticas mais potentes, e seu emprego está se expandindo em diversas áreas científicas devido à sua elevada sensibilidade, seletividade e precisão [66]. Se baseia na discriminação de íons de acordo com a sua razão massa/carga (m/z) e, para tanto, a amostra deve estar em fase gasosa. Ao medir a razão m/z do analito e dos seus fragmentos (MS/MS), a técnica consegue oferecer informações estruturais sobre o analito. Dentre sua vasta aplicação, destaca-se análises forenses, análises de alimentos, análises de doping e análises farmacêuticas [66,67].

O espectrômetro de massas é composto pela fonte de ionização, o analisador de massa e o detector (**Figura 9**). A introdução da amostra pode ser realizada de modo direto, com o auxílio de bombas seringas, ou a introdução através de métodos de separação, como LC e GC[66].

Figura 9: Componentes de um espectrômetro de massas



Fonte: do autor (criado com BioRender.com - 2023)

Os analitos introduzidos no espectrômetro de massas devem ser

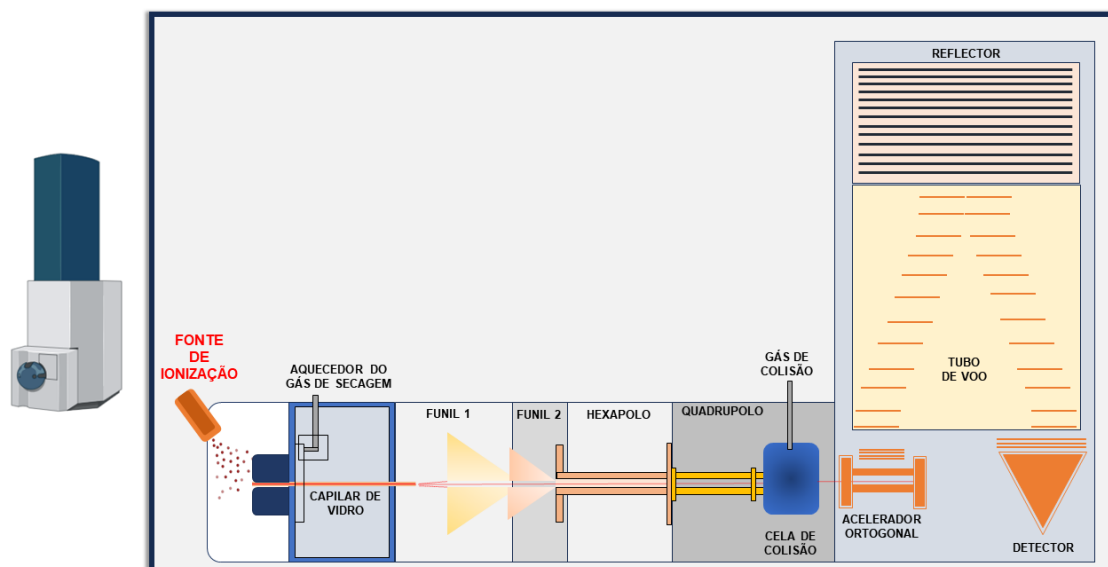
transformados em íons em fase gasosa. Para tal, existem diversas técnicas de ionização amplamente utilizadas nesses equipamentos. Os primeiros métodos de ionização envolviam um processo de ionização através de feixes de elétrons, que trabalha em vácuo, e os analitos devem estar em fase gasosa, que ainda é muito utilizado. Atualmente, existem diversas técnicas de ionização, cada uma com suas próprias vantagens e aplicações ideais. A escolha da fonte de ionização pode impactar significativamente na análise. O método de ionização ideal é selecionado em relação aos analitos de interesse, quanto sua estrutura e propriedades. Assim, estão difundidas diversas técnicas de ionização a pressão atmosférica, como o *electrospray* (ESI) e ionização química à pressão atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization* – APCI) [67].

Outro componente de grande importância em um espectrômetro de massas é o analisador de massa. Nessa parte do equipamento, os íons são discriminados em relação a sua razão m/z . Existem diferentes tipos de analisadores de massas disponíveis, que aferem de modo diferente essa razão. Dos parâmetros acerca do analisador, é importante entender a precisão e exatidão de cada um [68]. O poder de resolução do analisador de massas tem relação de como cada um dos analisadores discriminam as m/z adjacentes, podendo ser medido utilizando a relação $m/\Delta m$. Medidas de massa exata tem relação com a medição com um número suficiente de algarismos significativos que permite uma determinação da composição elementar. Dos analisadores disponíveis, podemos citar o quadrupolo, armadilha de íons, tempo de voo (*time of flight* – ToF) e ressonância ciclôtrica de íons com transformada de Fourier [67,68].

Dos analisadores de massas de alta resolução, destaca-se os analisadores do tipo quadrupolo – ToF (qToF), sendo um dos mais utilizados atualmente, comercializado por diversas empresas (**Figura 10**) [69]. Nesse tipo de analisador, os íons introduzidos pela fonte de ionização são inicialmente filtrados no quadrupolo com a utilização de correntes diretas e radiofrequências, gerando movimentos de oscilação aos íons. Isso possibilita a seleção dos íons, sendo apenas aqueles que são estáveis nas condições aplicadas encaminhados para um analisador ToF, que diferenciará os íons pelo tempo de voo necessário para cada íon percorrer uma distância conhecida. Para tanto, os íons são acelerados por um campo elétrico, refletidos e finalmente detectados. Isso

confere aos equipamentos alta resolução, alta exatidão na medição das m/z e ainda possibilita ensaios MS/MS [68,69].

Figura 10: Representação de um tipo de espectrômetro de massas com analisador de massas qToF



Fonte: do autor (criado com BioRender.com - 2023)

Uma tendência em MS são as técnicas de ionização ambiente, que surgem em meados de 2000 e foram definidas como "técnicas de ionização de amostras não processadas ou minimamente modificadas em seu ambiente nativo, e normalmente se refere à ionização de amostras de fase condensada no ar" [70]. Nessas técnicas, os íons são gerados em condições atmosféricas e posteriormente conduzidos para dentro do instrumento. Tais técnicas permitem análise de amostras *in situ*, e muitas vezes de forma não destrutível. As técnicas de ionização ambiente pioneiras foram a dessorção por *electrospray* (*desorption electrospray ionization* - DESI) e análise direta em tempo real (*direct analysis in real time* - DART), em 2004. Com a grande aceitação das técnicas, atualmente existem diversas outras, como ionização por *paperspray* (PSI) e ionização em probe (*Probe Electrospray Ionization* - PESI) [70–72].

O uso de métodos de MS para análises farmacêuticas vem crescendo nos últimos anos, e diversos métodos farmacopeicos apresentam a técnica como método padrão de análise. A maior parte desses métodos são acoplados às

técnicas de separação (LC e GC). No tocante a análise de NAs em medicamentos, as técnicas de MS geralmente empregadas são aquelas que se utilizam de técnicas de separação, como LC e GC (**Tabela 3**). Contudo, métodos farmacopeicos já fazem uso de MS para a identificação e quantificação de impurezas em medicamentos sem o uso de técnicas de separação [73].

Em métodos de LC-MS, a literatura reporta a vasta utilização da ionização por APCI. Até o momento, poucos métodos de ionização ambiente se propuseram a analisar NAs em medicamentos. Um recente trabalho de McDaniel e colaboradores [74] demonstrou a aplicação da técnica PSI e de *filter cone spray ionization* (FCSI), uma variação de PSI, para análise de NAs em amostras de medicamentos *in situ*. Os autores apresentam as técnicas como alternativas para rápida detecção de NAs em medicamentos, conseguindo analisar esses analitos a nível traço, sem preparo de amostra. Outras técnicas de ionização ambiente aplicadas as análises de NAs em medicamentos ainda não são reportadas na literatura. Essas técnicas podem se apresentar como alternativas para rápida detecção e quantificação dessas impurezas, uma vez que muitos não requerem extensivo preparo de amostra e não requerem o uso de grandes quantidades de solvente, o que se mostra adequado às técnicas mais sustentáveis de análise.

4. ANÁLISES SUSTENTÁVEIS

Termos referentes a sustentabilidade foram introduzidos à química ainda na década de 80 buscando criar processos mais “verdes” e limpos [75]. A química verde foi então definida como “planejamento de produtos e processos químicos para reduzir ou eliminar o uso e geração de substâncias perigosas” [76]. Harmônico a essa definição, surgiram doze princípios da química verde que são diretrizes de planejamento que auxiliam os processos químicos a alcançar sustentabilidade. Envolvem o planejamento dos processos em relação a prevenção e segurança, economia atômica, redução de produtos tóxicos e energia, além da redução de resíduos, o que contribui a redução de impactos adversos. Então, em síntese, química verde abrange o planejamento em todas as fases do ciclo de vida de produtos químicos, visa reduzir a periculosidade dos produtos e processos, e funciona como um sistema coeso de princípios ou critérios de planejamento [75,76].

Com o surgimento da química verde, diversos protocolos analíticos não se adequaram com os princípios mais sustentáveis postulados. Assim, o termo “química analítica verde” surgiu com o objetivo de adequar tais protocolos [77]. Galuszka e colaboradores [78] sugeriram doze princípios referentes a química analítica verde (**Figura 11**), que rapidamente tiveram grande aceitação pela literatura. Esses doze princípios fundamentais demonstram a disposição de cuidar do meio ambiente e da segurança humana durante o desenvolvimento e aplicação de procedimentos analíticos [78,79]. Foram postulados com o objetivo de prevenção de resíduos gerados em análises químicas, a redução de reagentes e sua segurança, o comprometimento em eficiência energética e a redução em derivatização, concordantes com alguns dos princípios iniciais [78].

Figura 11: Princípios da química analítica verde sugeridos por Galuszka e colaboradores



Fonte: do autor

Existem várias abordagens para incorporar os princípios da química analítica verde em protocolos de análise, sendo as mais usuais a miniaturização das técnicas de preparo de amostras e dos equipamentos de determinação, além da redução ou eliminação de solventes e a utilização de solventes menos tóxicos [80]. Como procedimentos complexos e composto por diversas etapas, as

metodologias analíticas podem ser avaliadas em cada ponto para chegarem a alternativas mais sustentáveis. É importante considerar os princípios para a adequação de métodos sem afetar a funcionalidade e excelência da metodologia, que pode ser expressa em relação a figuras de mérito como precisão e exatidão. Além disso, parâmetros como tempo de análise, custo do aparato e a simplicidade da metodologia também devem ser considerados [79]. Assim, mediante a avaliação de todos os processos de um protocolo, é possível verificar o grau de sustentabilidade do processo [78,81].

Os protocolos padrão para análise de NAs em medicamentos podem ser adequados em relação aos princípios mais sustentáveis de análise já citados (**Figura 11**) [33,36]. Parâmetros como a redução de solvente e amostra, o uso de solventes tóxicos e tempo de análise devem ser considerados nesses protocolos para atingirem maior grau de sustentabilidade. Nesse sentido, aqui é abordado o desenvolvimento de metodologias analíticas capazes de separar, identificar e quantificar as NAs relacionadas a fármacos utilizando técnicas miniaturizadas de preparo de amostra seguidas por detecção LC-MS além de abordagens de ionização ambiente de NAs para análise de MS, considerando os princípios sustentáveis da química analítica.

CAPÍTULO I

DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO SORTIVA EM PONTEIRA DE MICROPIPETA (*DISPOSABLE PIPETTE EXTRACTION - DPX*) PARA DETERMINAÇÃO DE N-NITROSAMINAS EM MEDICAMENTOS POR LC-MS

RESUMO I

A presença de N-Nitrosaminas (NAs) em medicamentos se tornou um assunto pertinente na indústria farmacêutica visto o alto potencial carcinogênico dessas moléculas. De tal modo, o controle da ocorrência dessas moléculas em medicamentos comerciais é de grande importância. Visando a quantificação dessas moléculas de modo assertivo, é crucial realizar o preparo da amostra para extrair, purificar e pré-concentrar o analito, assegurando resultados precisos. Técnicas miniaturizadas de preparo de amostra têm demonstrado diversas vantagens comparadas a técnicas tradicionais por tornarem os processos mais acessíveis economicamente, se mantendo sensíveis e seletivos. Ademais, são alinhados com os princípios da química analítica verde por reduzir significativamente o consumo de solventes, amostra, fase extratora, tempo de análise e consumo energético. Assim, o capítulo I apresenta o desenvolvimento e otimização de um método analítico baseado na extração sortiva em ponteira de micropipeta (*Disposable Pipette Extraction* - DPX) para identificação e quantificação de NAs presentes em medicamentos através da cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massas (LC-MS). As análises por LC-MS foram realizadas em fase reversa e utilizando a fonte ionização *electrospray* (ESI) no modo positivo. Foram avaliadas seis NAs relacionadas a fármacos: N-nitroso-N-metiletilamina (NMEA), N-nitrosopirrolidina (NPIR), N-dietilnitrosamina (NDEA), N-nitrosopiperidina (NPIP), N-nitrosomorfolina (NMOR) e N-nitroso-N-dibutilamina (NDBA). Os parâmetros de extração DPX foram otimizados de modo univariado avaliando a fase extratora e o solvente de dessorção e multivariado empregando um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} e um planejamento de composto central avaliando pH da amostra, tempo de equilíbrio e ciclos de extração e dessorção. Os resultados apontaram a significância da fase extratora, solvente de dessorção, pH da amostra, ciclos de dessorção e tempo de equilíbrio para a extração desses analitos. Apenas o ciclo de dessorção não foi significativo. Assim, foi atingido um ponto ótimo para a extração de seis NAs simultaneamente por DPX usando uma fase extratora C18, metanol como solvente de dessorção, pH 7, 30 segundos de tempo de equilíbrio, 2 ciclos de extração e 5 ciclos de dessorção. Considerando esse método, foi possível obter uma etapa de preparo de amostra para análise de NAs em medicamentos utilizando pouca quantidade de fase extratora, amostra e solvente de dessorção. Ademais, o procedimento total de extração torna possível a extração de NAs em torno de 4 minutos com recuperação das NAs de até 98%. Assim, as figuras de mérito do método DPX-LC-MS para determinação da NMEA, NPIP, NDEA, NPIR, NMOR e NDBA em medicamentos demonstraram a eficiência do método em quantificar essas moléculas, cumprindo requisitos acerca da validação de métodos preconizado pela ANVISA, com precisão e exatidão abaixo de 15%, limite de detecção de 0,5 ng/mL e limite de quantificação de 1 ng/mL, linearidade na faixa de concentração de NAs de 1 a 150 ng/mL, além de demonstrar recuperação variando entre 63 e 107%. O método foi aplicado com sucesso em amostras reais de losartana potássica e valsartana para quantificação de NAs nesses medicamentos.

ABSTRACT I

The presence of N-Nitrosamines (NAs) in medicines has become a relevant issue in the pharmaceutical industry, given the high carcinogenic potential of these molecules. Therefore, the control of Nas occurrence in commercial medicines is of great importance. In order to accurately quantify these molecules, a step of sample preparation is crucial to extract, purify, and pre-concentrate the analytes. Miniaturized sample preparation techniques have demonstrated several advantages compared to traditional methods by making processes more economically accessible while remaining sensitive and selective. Moreover, these miniaturized methods are aligned with the principles of green analytical chemistry by significantly reducing solvent, extractor phase and sample consumption, reducing analysis time, and reducing energy consumption. Thus, Chapter I presents the development and optimization of an analytical method based on Disposable Pipette Extraction (DPX) for the identification and quantification of NAs in medicines using liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS). LC-MS analyses were performed in reverse phase and applying electrospray ion source (ESI) in positive mode. Six NAs related to drugs were evaluated: N-nitroso-N-methylethylamine (NMEA), N-nitrosopyrrolidine (NPIR), N-diethylnitrosamine (NDEA), N-nitrosopiperidine (NPIP), N-nitrosomorpholine (NMOR), and N-nitroso-N-dibutylamine (NDBA). The main DPX extraction parameters were optimized through univariate analysis of the extractor phase and desorption solvent, and multivariate analysis using a fractional 2^{4-1} factorial design and a central composite design evaluating sample pH, equilibrium time, and extraction and desorption cycles. The results indicated the significance of the extractor phase, desorption solvent, sample pH, desorption cycles, and equilibrium time for the extraction of these analytes. Only the desorption cycle was not significant for extracting NAs in medicines. Thus, an optimum point for the simultaneous extraction of six NAs by DPX was achieved using a C18 extractor phase, methanol as the desorption solvent, pH 7, 30 seconds equilibrium time, 2 extraction cycles, and 5 desorption cycles. Considering this optimized method, it was possible to achieve a sample preparation step for the analysis of NAs in medicines using a minimal amount of extractor phase, sample, and desorption solvent. Furthermore, the total extraction procedure enables the extraction of NAs in around 4 minutes with NAs recovery up to 98%. Thus, the figures of merit of the DPX-LC-MS method for the determination of NMEA, NPIP, NDEA, NPIR, NMOR, and NDBA in medicines demonstrated the method's efficiency in quantifying these molecules, aligning to the validation requirements set by ANVISA. The method showed precision and accuracy below 15%, a detection limit of 0.5 ng/mL, and a quantification limit of 1 ng/mL, linearity in the concentration range of NAs from 1 to 150 ng/mL, and recovery ranging between 63 and 107%. The method was successfully applied to real samples of losartan potassium and valsartan for the quantification of NAs in these medicines.

1. INTRODUÇÃO

A ocorrência de N-nitrosaminas (NAs) em medicamentos levou ao desenvolvimento de diversos métodos de análise com o intuito de identificar e quantificar essas moléculas. Dentre esses, os métodos que empregam a cromatografia líquida (*liquid chromatographic* - LC) acoplada à espectrometria de massas (*mass spectrometry* -MS) se destacam por demonstrar sensibilidade e acurácia no resultado [1,2].

A presença do insumo farmacêutico ativo (IFA) e de outros componentes na amostra pode afetar a determinação de NAs devido ao efeito de matriz (efeito de outros componentes presentes na amostra), alterando a separação cromatográfica e levando a erros na quantificação e identificação. Ademais, a falta de preparo de amostra pode resultar no carregamento de substâncias indesejadas no equipamento, comprometendo a precisão dos resultados [1]. Portanto, é crucial realizar o preparo da amostra para extrair, purificar e pré-concentrar o analito, assegurando resultados precisos [41].

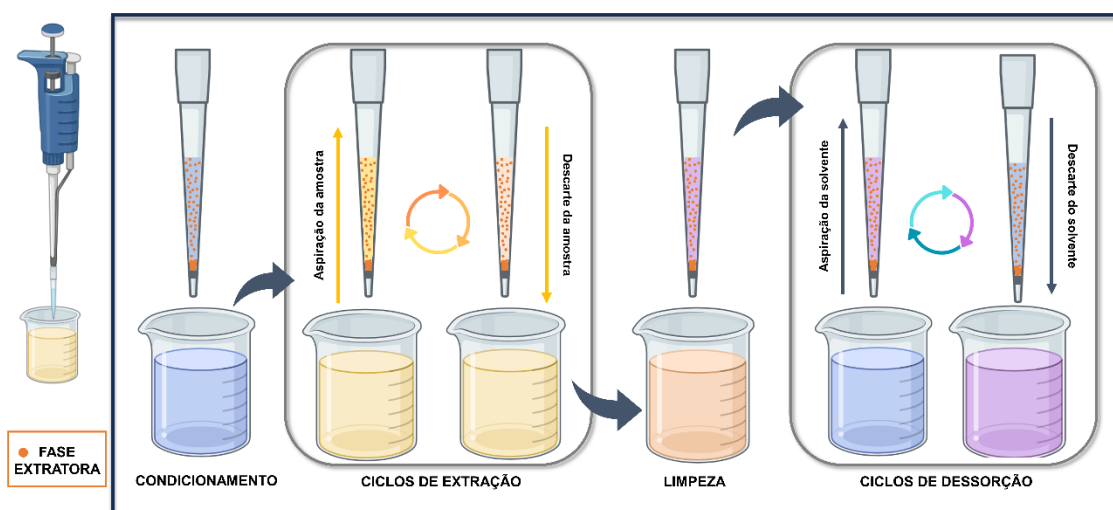
A extração em fase sólida (*solid phase extraction* - SPE) aplicada a extração de NAs se mostra promissora através do uso de fases sólidas sorventes disponíveis comercialmente e adequadas a diversos tipos de amostra. Há grande incidência da aplicação de sorventes inorgânicos à base de sílica e sorventes poliméricos orgânicos, apresentando eficiência na extração SPE [82]. Contudo, além de apresentar desafios em relação a difusão lenta dos anatos e custo elevado do aparato, não se adequa aos princípios mais sustentáveis de análise [48].

A miniaturização das técnicas de preparo de amostra supera limitações das abordagens clássicas, tornando os processos mais acessíveis economicamente, sensíveis, seletivos e alinhados com os princípios da química verde, ao reduzir significativamente o consumo de solventes, amostra e fase extratora [41,47,48]. Dentre as técnicas de extração miniaturizadas baseadas na SPE destaca-se a extração sortiva em ponteira de micropipeta (*Disposable Pipette Extraction* – DPX) proposta em 2003 pelo Dr. William Brewer (Universidade da Carolina do Sul, USA). Esta técnica utiliza pequenas quantidades de fase sólida sorvente confinada em uma ponteira de micropipeta [48,83].

O aparato requerido pela técnica se limita a uma ponteira de micropipeta (1 ou 5 mL) que contém a fase extratora responsável pela sorção, usualmente colocada

entre dois filtros. O filtro inferior tem por objetivo a sucção e liberação de ar, amostra e solvente, sem a perda da fase extratora, enquanto o filtro superior evita possíveis contaminações provenientes da micropipeta. A técnica se resume nas etapas de sorção do analito pela fase sólida, mistura e posterior eluição do analito representadas na **Figura 1.1** [83,84]. O sucesso da DPX dependerá da afinidade entre a fase sólida extratora e o analito durante a sorção, do tempo de equilíbrio entre as fases, dos ciclos de extração e dessorção, e ainda da afinidade do analito com o solvente de eluição [48]. A DPX apresenta vantagens como alta taxa de transferência do analito, mantendo a versatilidade da fase extratora, tempo de extração reduzido, além de demonstrar alta eficiência e recuperação do analito [84].

Figura 1.1: Modelo esquemático da técnica DPX



Fonte: do autor (criado com BioRender.com - 2023)

Além disso, alguns parâmetros referentes ao processo de extração podem ser otimizados levando o procedimento de extração a melhor recuperação e reprodutibilidade [48]. De modo a avaliar diversos parâmetros da extração simultaneamente, e a influência de cada variável, ferramentas quimiométricas, como planejamentos experimentais, têm sido aplicadas. Envolve a realização de uma série de experimentos nos quais alterações são feitas nas variáveis de entrada (parâmetros de extração) do sistema para identificar quais têm impacto na variável dependente. Essa otimização multivariada busca extrair a máxima informação com

a menor quantidade de experimentos, alterando simultaneamente fatores relevantes [48,85].

Assim, diante do exposto, é possível afirmar que a técnica de preparo de amostra por DPX para determinação de NAs se mostra uma alternativa frente aos métodos convencionais. Ademais, o uso de planejamentos de experimentos se mostra promissor para a otimização do sistema de extração, de modo a levar o melhor rendimento e reprodutibilidade do método desenvolvido.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este capítulo teve por objetivo o desenvolvimento e otimização de um método analítico de extração de NAs presentes em medicamentos utilizando a extração sortiva em ponteira de micropipeta e posterior identificação e quantificação por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

2.2 Objetivos Específicos

- Aplicação e otimização da técnica de extração sortiva em ponteira de micropipeta para a extração das NAs presentes em medicamentos;
- Otimização do método de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas para quantificação das N-nitrosaminas;
- Avaliação das figuras de mérito para o método DPX-LC-MS para análises de NAs em medicamentos;
- Quantificação de NAs em medicamentos comerciais contendo valsartana e losartana em suas formulações;

3. METODOLOGIA

3.1 Reagentes

Metanol, acetonitrila e isopropanol (>99,9%) foram adquiridos pela Tedia (Ohio, USA). Cafeína-(trimetil-¹³C) (>99%) e o padrão de NAs (2,0 mg/mL) composto por uma mistura de N-nitroso-N-metiletilamina (NMEA), N-nitrosopirrolidina (NPIR), N-dietilnitrosamina (NDEA), N-nitrosopiperidina (NPIP), N-nitrosomorfolina (NMOR) e N-nitroso-N-dibutilamina (NDBA), foram adquiridos pela Sigma-Aldrich (Pensilvânia, USA). Ácido fórmico e hidróxido de sódio foram adquiridos pela Sigma-Aldrich (Alemanha), e água ultra purificada por sistema Milli-Q (condutividade de 18,2 MΩ.). As fases extratoras utilizadas no presente estudo foram retiradas de cartuchos SPE comerciais: Superclean LC-C18 (C18), DSC-C8 (C8), Superclean ENVI-Carb, DSC-CN, DSC-PH e DSC-NH₂ adquiridos pela Supleco (Bellfonte, USA), e Polymer-Based HLB (HLB) adquirido pela SiliCycle (Quebec, Canadá).

3.2 Obtenção e preparo de amostra

As amostras de medicamentos (n=5) foram obtidas em drogarias locais (Goiânia, Brasil), contemplando diferentes marcas para os seguintes medicamentos: losartana potássica (50 e 100 mg), valsartana (160 e 320 mg) e ibuprofeno (600 mg). Os comprimidos desses medicamentos foram macerados solubilizados em água na concentração de 30 mg/mL para extração DPX. Para análise do extrato por LC-MS, foi adicionado cafeína-(trimetil-¹³C) na concentração de 500 ng/mL como padrão interno (PI).

3.3 Parâmetros LC-MS

As análises por LC-MS foram realizadas em um cromatógrafo modelo LC-20A (Shimadzu, Kyoto, Japão) acoplado a um espectrômetro de massas modelo micrOTOF-Q III (Bruker, Bremen, Alemanha). As análises cromatográficas foram conduzidas utilizando uma coluna de fase reversa C-18 (3,6 d.i. x 100 mm, 2,7 µm) em temperatura ambiente, com injeção de 10 µL de amostra sob uma vazão de fase móvel de 0,200 mL/min. A fase móvel foi avaliada entre soluções aquosas de ácido fórmico 0,1% (v/v), formiato de amônio 0,05 mol/L, e acetato de amônio a 0,05 mol/L (fase A) e metanol ou acetonitrila (fase B), em condição de gradiente. A análise

por espectrometria de massas se deu no modo positivo de ionização utilizando a fonte ionização por *electrospray* (ESI). As condições de análises do espectrômetro de massas foram: voltagem do capilar de 4 kV, vazão do gás de secagem de 8 L/min, pressão do nebulizador em 4 bar e temperatura do capilar em 180 °C.

3.4 Otimização da extração por DPX

As ponteiros para extração DPX foram preparadas utilizando ponteiros de micropipeta de 1 mL vedadas em sua parte inferior com lã de vidro. Nessas ponteiros, foram adicionados 20 mg da fase extratora (C18, C8, ENVI-Carb, CN, PH, NH₂ e HLB). Os parâmetros intrínsecos da extração foram avaliados de forma uni e multivariada utilizando um planejamento fatorial fracionário e um planejamento de composto central. Os experimentos para a otimização uni e multivariada foram conduzidos por LC-MS, com adição do PI a 500 ng/mL. Os dados brutos foram tratados empregando o software DataAnalysis versão 5.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Posteriormente, a recuperação para cada NA presente na solução padrão foi calculada, e seus valores foram utilizados como respostas para análises estatísticas. O software Statistica versão 7.0 ® foi utilizado para os cálculos dos fatores mais significativos para a extração de NAs.

Otimização univariada

A otimização dos parâmetros de extração por DPX foi inicialmente conduzida utilizando 1 mL da solução padrão de NAs na concentração de 300 ng/mL em água ultra purificada. O primeiro parâmetro otimizado foi a fase extratora para DPX, sendo avaliadas sete sorventes comerciais diferentes (C18, C8, ENVI-Carb, CN, PH, NH₂ e HLB), mantendo constantes o solvente de dessorção (1 mL de acetonitrila), número de ciclos de extração e dessorção (n = 2), e tempo de equilíbrio (10 s). Após a seleção da fase extratora que apresentou a maior eficiência de extração para as NAs alvo, o solvente de dessorção foi avaliado entre metanol, acetonitrila e isopropanol. Nesta etapa, a fase extratora com melhor eficiência, número de ciclos de extração e dessorção (n = 2) e tempo de equilíbrio (10 s) foram mantidos constantes.

Otimização multivariada

A otimização multivariada teve como objetivo avaliar quatro parâmetros

influentes na extração por DPX, sendo eles o pH da amostra, tempo de equilíbrio (TE), ciclo de extração (CE) e ciclo de dessorção (CD). Para tanto, foi inicialmente realizado uma triagem dos fatores mais influentes na extração através de um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} , onde cada um dos parâmetros foi avaliado em dois níveis diferentes. A seguir, os parâmetros mais influentes para a extração foram avaliados por um planejamento de composto central para a construção de uma superfície de resposta e determinação de um ponto ótimo de extração das NAs por DPX.

3.5 Performance analítica do método DPX-LC-MS

A performance analítica foi realizada pela avaliação das figuras de mérito do método DPX-LC-MS para análise de seis NAs em medicamentos. Para tal, o guia de controle de nitrosaminas da ANVISA preconiza que o método seja adequado de acordo com a RDC N° 166 de 24 de julho de 2017 que dispõe sobre a validação de métodos analíticos. Ainda foi utilizada como parâmetro a RDC N° 27 de 17 de maio de 2012 que dispõe sobre requisitos mínimos para validação de métodos bioanalíticos [23,32,86].

Para tanto, foram utilizados como branco de referência comprimidos de ibuprofeno macerados e solubilizados em metanol (30 mg/mL) posteriormente enriquecidos com solução padrão de NAs nas concentrações de 0,5, 1, 5, 10, 25, 50, 100 e 150 ng/mL (n=5). Os comprimidos de ibuprofeno foram utilizados como branco de referência uma vez que não apresentam NAs em sua composição. Foi utilizado como resposta analítica a razão da área do pico de cada NA pela área do pico do PI obtido através do cromatograma do íon extraído (*extract ion chromatogram* - EIC) adquirido por LC-MS. Assim, a linearidade da faixa de concentração estudada foi avaliada atribuindo o eixo **x** como concentração da amostra e eixo **y** a resposta analítica relativa.

O efeito matriz foi avaliado comparando os coeficientes angulares da curva de calibração feita a partir da extração DPX das NAs em solvente com as amostras em matriz de ibuprofeno enriquecidas pela solução de NAs submetidas a mesma extração DPX. Ainda, o efeito foi também avaliado em relação ao fator de matriz normalizado (FMN) nas concentrações de 10, 100 e 150 ng/mL, de acordo com a equação 1, a qual AM representa a resposta analítica para o analito em matriz e AS a resposta analítica do analito em solução.

$$FMN\% = \frac{AM}{AS} \cdot 100 \quad \text{Equação 1}$$

A precisão (P%) e a exatidão (E%) foram calculadas intradia para ensaios realizados em quintuplicata no mesmo dia, e interdica para ensaios realizados em quintuplicata em três dias diferentes utilizando as equações 2 e 3, respectivamente, onde DP é o desvio padrão das concentrações determinadas experimentalmente, CMD é a concentração média determinada entre replicatas e CT é a concentração teórica. Esses parâmetros foram calculados para as concentrações de 10, 100 e 150 ng/mL. A recuperação (R%) foi calculada mediante a equação 4, a qual utiliza a razão dos valores de concentração experimental (Cexp) e CT.

$$P\% = \frac{DP}{CMD} \cdot 100 \quad \text{Equação 2}$$

$$E\% = \frac{CMD-CT}{CT} \cdot 100 \quad \text{Equação 3}$$

$$R\% = \frac{C_{exp}}{CT} \cdot 100 \quad \text{Equação 4}$$

Já os valores de limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram atribuídos com base na razão sinal/ruído (S/R) obtidos experimentalmente de 3:1 e 10:1, respectivamente.

3.6 Extração de NAs em amostras reais

A quantificação das NAs em medicamentos comerciais utilizando o método DPX-LC-MS se deu utilizando três marcas de losartana potássica e duas marcas de valsartana na concentração de 30 mg/mL em água. 1 mL dessa solução foi submetida a extração por DPX com o método desenvolvido, e o extrato foi analisado pelo método LC-MS, adicionando PI a 500 ng/mL. Os dados foram tratados empregando o software DataAnalysis versão 5.0 (Brucker Daltonics, Bremen, Alemanha).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo objetivou a aplicação da extração DPX e análise por LC-MS para determinação de NAs em medicamentos. Assim, o método LC-MS foi otimizado de modo a obter a melhor resposta analítica para as seis NAs aqui avaliadas. Ademais, os parâmetros da extração DPX foram otimizados para maior eficiência de extração desses analitos. A seguir, a performance analítica do método DPX-LC-MS foi avaliada quanto a determinação dessas NAs em medicamentos e, por fim, aplicado em amostras reais de losartana potássica e valsartana.

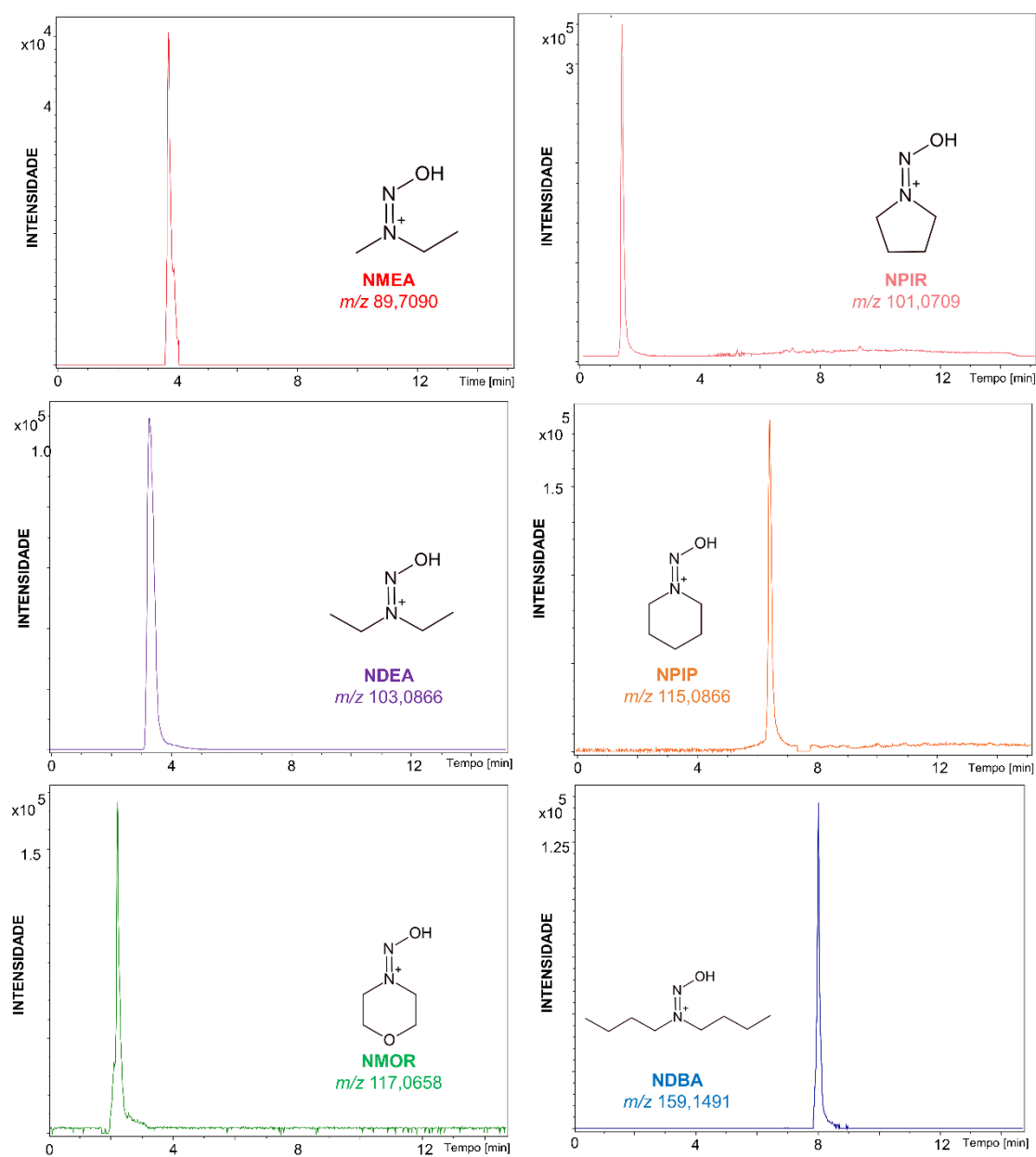
4.1 Método LC-MS

A análise por MS foi testada tanto no modo de ionização positivo quanto no modo negativo, e foi observado que as NAs ionizam com maior eficiência no modo positivo. Também foi testado a eficiência de ionização das NAs utilizando a ionização química a pressão atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization* – APCI) frente a fonte ESI. O teste apresentou a maior eficiência da fonte ESI em comparação a fonte APCI e de tal modo os parâmetros de análise com fonte de ionização ESI foram otimizados.

O método de análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas foi desenvolvido de modo a obter o melhor resultado para as seis NAs analisadas. Para a corrida cromatográfica, foram testadas como a fase móvel aquosa (Fase A) as soluções de ácido fórmico a 0,1% (v/v), acetato de amônio e formiato de amônio, ambas a 0,05 mol/L, e para a fase móvel orgânica (Fase B) foram avaliadas pela performance do metanol e acetonitrila.

Foi utilizado o EIC para avaliar a separação cromatográfica de acordo com a m/z atribuída a cada nitrosamina, o que está de acordo com o método previsto pela FDA [33]. A solução de ácido fórmico a 0,1% (v/v) em água e o metanol foram escolhidos como fase móvel uma vez que apresentaram melhor resposta analítica, concordante com métodos descritos na literatura [34]. A otimização dos parâmetros proporcionou uma análise cromatográfica de 15 minutos em modo gradiente mantendo 10% da fase B de 0 a 3 minutos e aumentando a sua concentração para 90% de 3-5 minutos e mantida de 6-12 minutos, voltando às condições iniciais em 13 minutos (10% da fase B) (**Figura 1.2**). A **Tabela 1.1** dispõe o tempo de retenção de cada analito.

Figura 1.2: Cromatograma do íon extraído para cada N-nitrosamina analisada pelo método de LC-ESI-MS



Fonte: do autor

Tabela 1.1: Tempo de retenção para cada analito avaliado pelo método

Analito	Fórmula Molecular	m/z	Tempo de retenção / min
NMEA	C ₃ H ₈ N ₂ O	89,0709	3,6
NPIR	C ₄ H ₈ N ₂ O	101,0709	1,6
NDEA	C ₄ H ₁₀ N ₂ O	103,0866	3,2
NPIP	C ₅ H ₁₀ N ₂ O	115,0866	6,5
NMOR	C ₄ H ₈ N ₂ O ₂	117,0658	2,2
NDBA	C ₈ H ₁₈ N ₂ O	159,1491	8,1
Cafeína- (trimetil-¹³C)	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	198,0876	5,3

4.2 Otimização da extração DPX

Todos os experimentos foram realizados com 20 mg de fase extratora e utilizando 1 mL da solução padrão de seis NAs (300 ng/mL em água) como amostra, e 1 mL de solvente de dessorção. A etapa de condicionamento da fase extratora foi realizada com água. Desse modo, a extração das seis NAs foi avaliada simultaneamente. Alguns parâmetros de extração são importantes o sucesso da extração por DPX e cada etapa deve ser otimizada [48]. Assim, parâmetros relacionados a natureza da amostra e às etapas de extração foram otimizados de mono univariado e multivariado, considerando a resposta das seis NAs avaliadas. A otimização da extração, tanto uni quanto multivariada, utilizou a razão da área pico do analito pela área do pico do PI obtida pelo EIC.

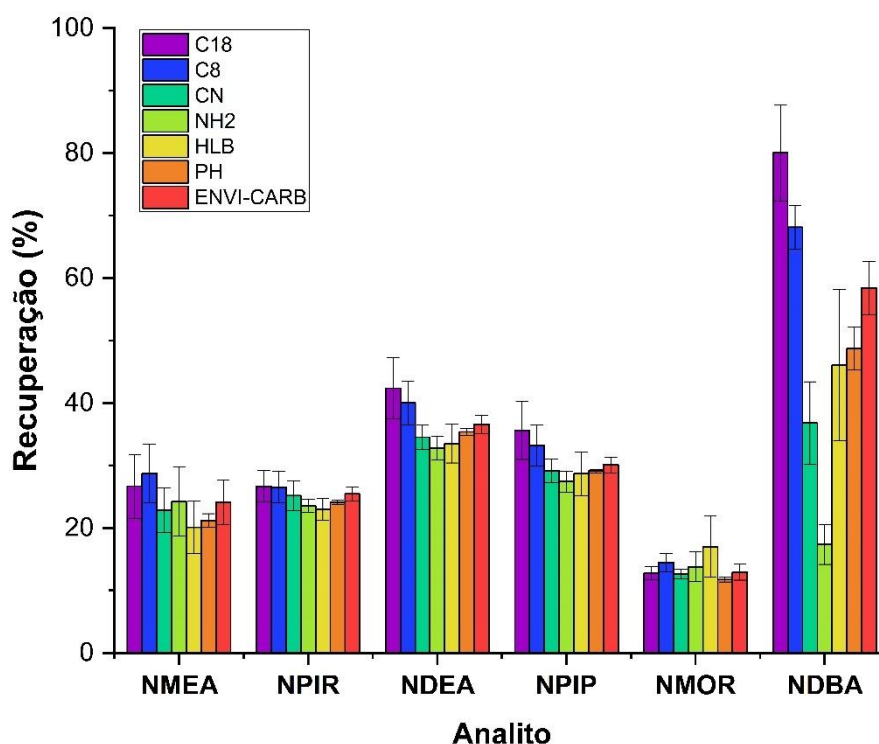
Otimização Univariada

A fase extratora é um importante parâmetro para a extração por DPX, uma vez que o sucesso da extração depende das interações fase extratora-analito [48]. Portanto, este parâmetro foi o primeiro a ser avaliado. A literatura reporta o uso de fases comerciais baseadas em carvão ativado, fases C18 e HLB, fases trocadoras iônicas, entre outras [26,87]. A escolha da fase extratora adequada para a extração das NAs deve considerar as características estruturais dessas moléculas, como sua polaridade. As NAs possuem um grupo

polar (N_2O), mas a polaridade da molécula ainda depende da cadeia alquil, e quanto maior essa cadeia, menos polar é a N-nitrosamina [88].

Considerando a polaridade dessas moléculas e estudos prévios, aqui avaliamos diversas fases extratoras comerciais, sendo fases reversas como C18 e C8, fases polares como fase ciano (CN), fenil (PH) e amino (NH_2), fases baseadas em carvão ativado ENVI-Carb e a fase HLB, que é uma resina de equilíbrio hidrofílico-lipofílico. Nessa etapa de escolha da fase extratora, foi utilizado acetonitrila como solvente de eluição, 2 ciclos de extração e dessorção e tempo de equilíbrio de 10 segundos, sem alterações do pH da amostra. Os resultados de recuperação de cada analito extraído por cada fase extratora foram calculados (**Figura 1.3**).

Figura 1.3: Comparação da recuperação obtida para cada analito em cada fase extratora avaliada (n=3)



*Barra de erros referente ao desvio padrão

Fonte: do autor.

Através da **Figura 1.3**, podemos notar que as fases extratoras mais polares não apresentaram boa recuperação para as NAs estudadas. Essas fases extratoras tendem a realizar interações do tipo dipolo-dipolo permanente e ligações de hidrogênio, e esse resultado indica que esse mecanismo não é eficiente para a extração de NAs presente em um meio aquoso, o que já é reportado na literatura [55]. Já a fase extratora ENVI-Carb é uma fase extratora apolar baseada em carvão ativado, que apresentou boa recuperação por DPX para a maioria das NAs, contudo alguns estudos sugerem que essas fases de carvão ativado podem induzir a formação de novas NAs no processo de preparo de amostra [89]. De fato, a melhor recuperação para as NAs aqui observada foi utilizando as fases extratoras C18 e C8, indicando que as interações hidrofóbicas dos analitos em fase aquosa com a fase extratora levam a melhor recuperação.

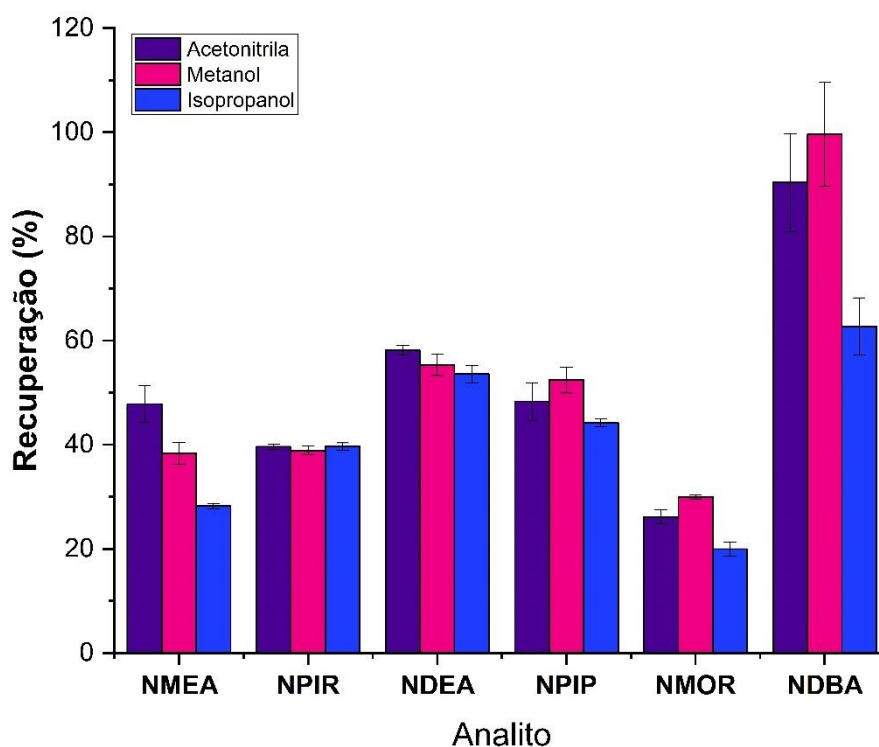
Assim, considerando os valores de recuperação para cada experimento, foi aplicado uma análise de variância (ANOVA) para cada analito utilizando do *valor p* como parâmetro de significância. Se o *valor p* da ANOVA for menor que 0,05 os métodos são significativamente diferentes. Através desse teste, foi observado que a variação da fase extratora foi significativa para a extração de NDEA, NPIP e NDBA. Isso aponta que a recuperação obtida para as outras NAs estudadas não apresentou variação significativa. Portanto, considerando a recuperação obtida para a extração de NDEA, NPIP e NDBA, a fase extratora C18 foi escolhida para os ensaios seguintes.

Avaliou-se, em seguida, o solvente de dessorção. Este solvente deve possuir uma polaridade adequada e interagir eficientemente com os analitos para garantir uma recuperação otimizada, evitando os efeitos inerentes da matriz. Além disso, é crucial que o solvente escolhido seja compatível com o sistema de análise e detecção, sendo preferível optar por solventes menos tóxicos [48,90].

Entre os solventes de dessorção utilizados na literatura, aqui avaliamos a dessorção das NAs promovida por metanol, acetonitrila e isopropanol, os quais apresentam média polaridade, assim como esse analitos, além de serem solventes compatíveis com o sistema LC-MS. Nessa etapa, foi utilizado a fase extratora C18, 2 ciclos de extração e dessorção e tempo de equilíbrio de 10 segundos foram mantidos constantes, além do pH da amostra não ser alterado.

Os resultados de recuperação de cada analito extraído para cada um dos solventes de dessorção foi calculada (**Figura 1.4**).

Figura 1.4: Comparação da recuperação obtida para cada solvente de dessorção (n=3)



*Barra de erros referente ao desvio padrão

Fonte: do autor.

Outra vez a ANOVA foi aplicada para avaliação dos valores de recuperação de cada analito. A análise estatística apontou que não houve variação significativa para a dessorção da NMEA, NPIR e NDEA, entretanto foi significativo para a dessorção do NPIP, NMOR e NDBA. Assim, o metanol foi escolhido como solvente de eluição visto a maior recuperação desses analitos que apresentaram significância.

Otimização multivariada

Inicialmente, os parâmetros mais influentes da extração das NAs por DPX foi avaliada através de uma otimização multivariada. Essa otimização avaliou quatro parâmetros da extração DPX através de um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} , sendo o pH da amostra, o ciclo de extração (CE) e dessorção (CD) e o tempo de equilíbrio (TE). Esses parâmetros foram avaliados simultaneamente em dois níveis, de acordo com a **Tabela 1.2**. Utilizando o planejamento fracionário, a quantidade de experimentos diminuiu pela metade, mantendo a avaliação dos efeitos principais e da interação até de terceira ordem dos efeitos [85]. De tal modo, 8 experimentos foram realizados em triplicata e de forma aleatória.

Tabela 1.2: Experimentos realizados no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}

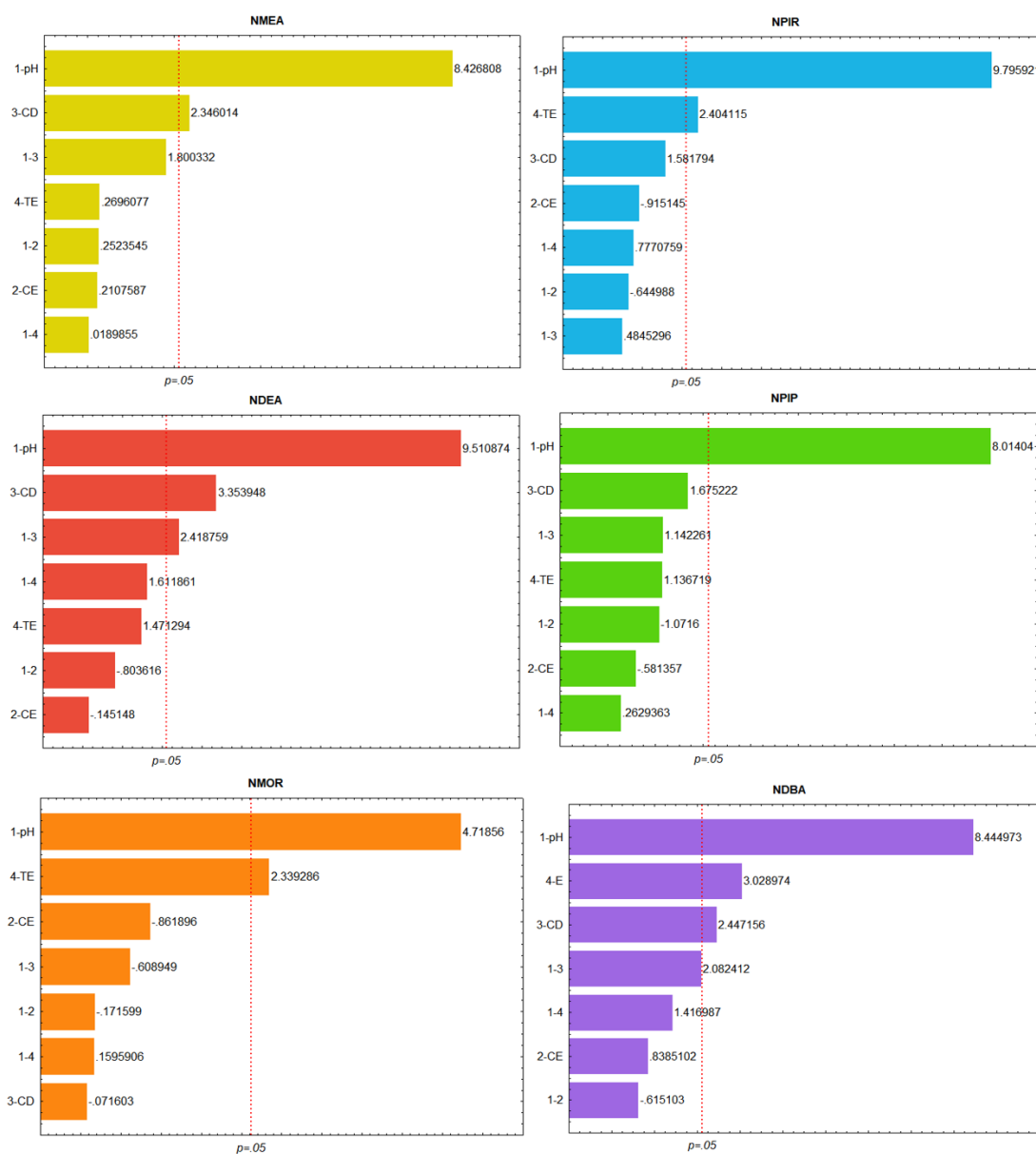
Experimento	pH	CE	CD	TE / s
1	3	2	2	10
2	10	2	2	60
3	3	8	2	60
4	10	8	2	10
5	3	2	8	60
6	10	2	8	10
7	3	8	8	10
8	10	8	8	60

A recuperação de cada experimento foi calculada, e utilizada como resposta para a análise estatística no software Statistica versão 7.0®. O tratamento estatístico possibilitou determinação dos efeitos significativos para a extração DPX em cada variável, podendo ser mais bem visualizado pelos gráficos de Pareto (**Figura 1.5**), construído para cada analito.

Foi possível observar que o pH foi um parâmetro significativo para todas NAs estudadas pelo planejamento, sendo o pH da amostra no seu nível mais alto uma vez que o *valor p* foi menor que 0,05 e o *t valor* foi positivo. Esse comportamento é previsto para as NAs uma vez que essas moléculas são, em geral, moléculas ácidas com pKa em torno de 3,5. Sendo assim, mantendo essas moléculas em pH básico é garantido que a molécula esteja na sua fórmula molecular (não carregada), o que

diminui a solubilidade dessas moléculas em água e auxilia a promover as interações com a fase C18, sendo essas interações de dipolo-dipolo induzidas (força de dispersão de London). Essas interações são preferíveis uma vez que permite a adsorção das NAs pela fase extratora de modo reversível. Assim, é possível fazer a adsorção pela fase extratora para posterior dessorção pelo solvente escolhido.

Figura 1.5: Gráficos de Pareto para cada analito avaliado pelo planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}



Fonte: do autor.

Contudo, a escolha do pH ótimo da extração ainda deve considerar a natureza da fase extratora. A literatura reporta que fases extratoras de sílica modificada, como a C18, têm faixa de pH de trabalho de 2 a 8, e acima desse pH essa fase pode sofrer degradação [91]. Mesmo que o pH mais alto possa demonstrar melhores valores de recuperação para as NAs, o método de extração pode não apresentar reprodutibilidade uma vez que alterações na fase extratora podem estar sendo promovidas.

Os ciclos de extração e dessorção podem ser influentes na extração DPX uma vez que se trata de sucessivas aspirações e descarte da amostra/solvente de dessorção. Para o ciclo de extração, isso permite maior contato da fase extratora e dos analitos, o que pode garantir maior recuperação dos analitos. Já no ciclo de dessorção, a mesma alíquota de solvente deve ser submetida aos ciclos para garantir melhor dessorção, mantendo a pré-concentração dos analitos [48].

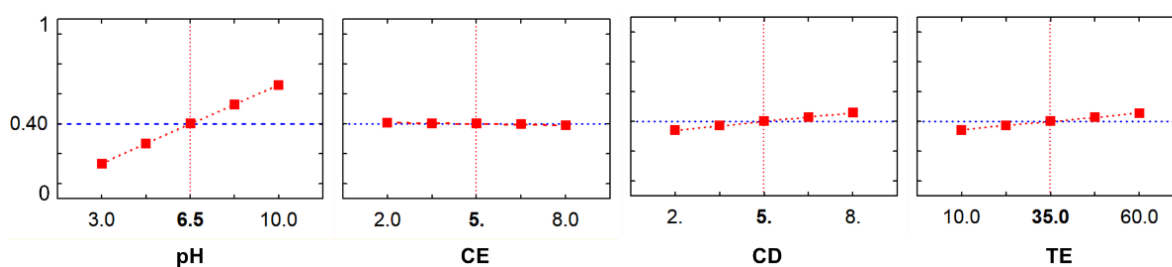
Observando a **Figura 1.5**, foi possível perceber que o ciclo de dessorção também foi significativo para a NMEA, NDEA e NDBA com o *t valor* positivo, o que indica que o nível superior favorece a dessorção das NAs. Esse parâmetro é esperado como influente na extração DPX uma vez que a maior quantidade de ciclos de dessorção empregada garante que a maior parte dos analitos adsorvidos pela fase extratora sejam dessorvidos pelo solvente de dessorção [48]. Já os ciclos de extração não se demonstraram significativos para a extração das NAs.

Mesmo que a extração DPX permite maior contato entre as fases para minimizar o tempo de equilíbrio pela dispersão da fase extratora, é esperado que os processos requiram algum tempo de equilíbrio. Tradicionalmente, métodos de extração DPX aplicam entre 5 e 60 segundos de equilíbrio para favorecer a recuperação. Aqui, o tempo de equilíbrio também foi um parâmetro significativo para a extração da NPIR, NMOR e NDBA com *t valor* positivo, sugerindo que o maior tempo de equilíbrio garante a melhor extração e dessorção das NAs.

O planejamento fatorial fracionário também possibilitou a construção dos perfis de valores preditos de desejabilidade, uma vez que se trata de um planejamento com 6 respostas visto que foram seis analitos avaliados pelo planejamento. Se trata de uma função padronizada que, quanto mais próximo de 1, mais a condição é desejável. Por meio desses perfis (**Figura 1.6**), considerando a resposta analítica de todas as variáveis, é possível observar novamente que apenas

o ciclo de extração foi o parâmetro não significativo para a extração das NAs por DPX. Assim, pode-se verificar graficamente como a resposta analítica varia com o aumento de pH, CD e TE, o qual a linha azul tracejada demonstra o valor médio de recuperação obtido (resposta do planejamento).

Figura 1.6: Perfil de valores preditos de desejabilidade



Fonte: do autor

O planejamento fatorial fracionário aqui apresentado possibilitou fazer uma triagem a respeito dos parâmetros mais significativos da extração. De tal modo é possível avaliar que o ciclo de extração não apresenta importância significativa para o aumento da recuperação dos analitos, além de demonstrar que os níveis mais altos do pH, CD e TE favoreceram a extração.

De modo atingir o ponto ótimo de processos, o planejamento de composto central se apresenta como uma ferramenta ideal. Contudo, um planejamento experimental prévio é importante para seleção das variáveis influentes e seus níveis de melhor resposta. A limitação da região de estudo de um planejamento de composto central consegue promover respostas mais assertivas acerca do ponto ótimo do sistema e possibilita previsões nessa região. Esse planejamento é formado por uma parte fatorial, uma parte axial e n ensaios de ponto central, C [85].

De tal modo, os parâmetros significativos na extração das NAs indicados pelo planejamento previamente realizado, em seus níveis favoráveis à extração, foram avaliados através de um planejamento de composto central. A **Tabela 1.3** apresenta os experimentos, que foram realizados de forma aleatória.

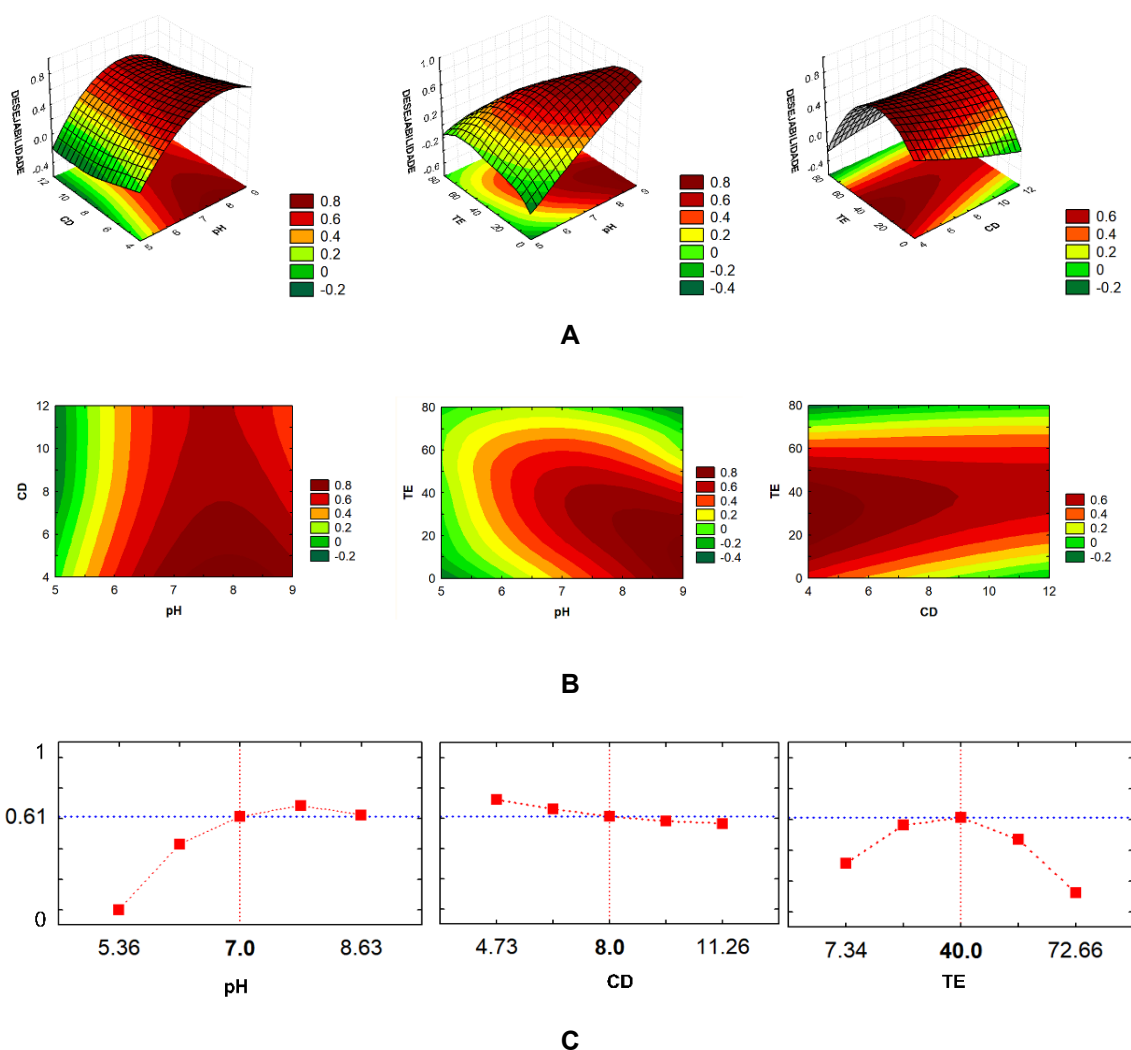
Tabela 1.3: Experimentos realizados no planejamento de composto central

Experimento	Bloco	pH	CD	TE / s
1	1	6,0	6	20,0
2	1	6,0	10	60,0
3	1	8,0	6	60,0
4	1	8,0	10	20,0
5 (C)	1	7,0	8	40,0
6 (C)	1	7,0	8	40,0
7	2	6,0	6	60,0
8	2	6,0	10	20,0
9	2	8,0	6	20,0
10	2	8,0	10	60,0
11 (C)	2	7,0	8	40,0
12 (C)	2	7,0	8	40,0
13	3	5,3	8	40,0
14	3	8,6	8	40,0
15	3	7,0	4,7	40,0
16	3	7,0	11,2	40,0
17	3	7,0	8	7,3
18	3	7,0	8	72,6
19 (C)	3	7,0	8	40,0
20 (C)	3	7,0	8	40,0

Os experimentos foram realizados utilizando os parâmetros otimizados de modo univariado, e considerando que os ciclos de extração não foram significativos para a extração das NAs, foi mantido 2 ciclos de extração, e os pontos axiais foram arredondados para um valor inteiro. Mais uma vez, o planejamento realizado utilizou a razão da área do pico do analito pela área do pico do PI do EIC obtido pela análise LC-MS, e essa razão foi utilizada para o cálculo da recuperação de cada analito. Esses valores calculados foram utilizados como resposta para a análise estatística no software Statistica versão 7.0 ®. Com a resposta do planejamento de composto

central, foi possível determinar o ponto ótimo de cada parâmetro utilizando os dados de desejabilidade, que considera as seis respostas do planejamento (**Figura 1.7**).

Figura 1.7: Perfil de desejabilidade obtido através do planejamento de composto central: **A:** Superfície de desejabilidade; **B:** Contorno de desejabilidade; **C:** Valores preditos de desejabilidade



Fonte: do autor

Delimitando a região de estudo através desse planejamento, é possível observar como a variação dos parâmetros significativos contribuem para a melhor extração das NAs que apenas no planejamento fatorial não foi possível perceber. As **Figuras 1.7 A e B** apresentam a superfície e o contorno de desejabilidade dos parâmetros, que nos permite avaliar as interações de segunda ordem desses

parâmetros, enquanto a **Figura 1.7 C** apresenta os valores de desejabilidade para cada uma dessas variáveis.

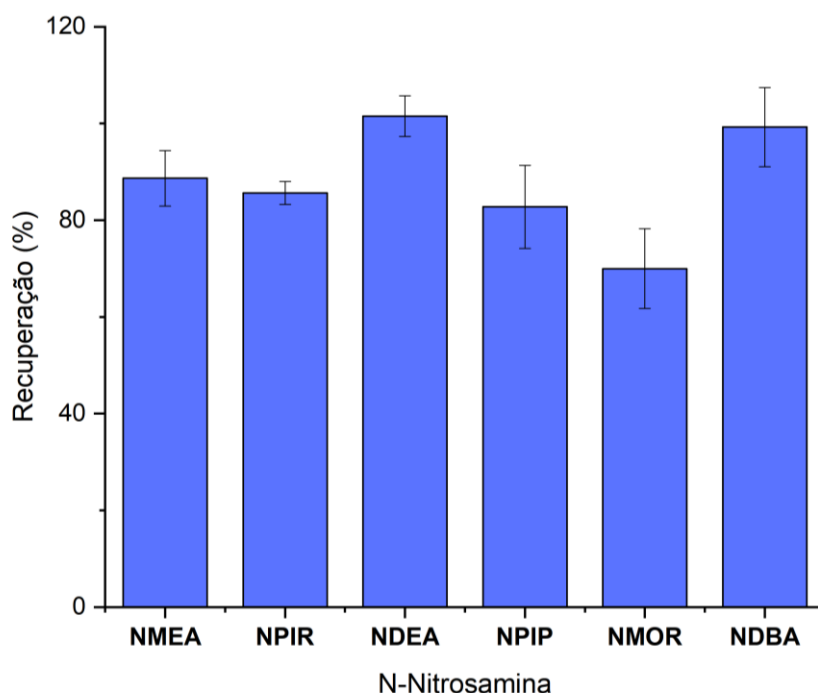
Podemos perceber que os melhores valores de desejabilidade são apresentados quando o ciclo de dessorção está em torno de 5 e o tempo de equilíbrio em torno de 30 segundos. Em relação ao pH, como já percebido anteriormente, seu aumento tem grande influência na recuperação das NAs. Contudo, considerando a faixa de pH de trabalho da fase extratora e os resultados observados na **Figura 1.7 C**, o uso do pH 7 consegue gerar uma boa resposta para a recuperação dos analitos, tendo pouca variação quando aumentado a pH 8. Considerando todas as etapas de otimização apresentadas, a **Tabela 1.4** sumariza o método otimizado de extração de NAs por DPX.

Tabela 1.4: Método de extração das NAs por DPX otimizado

Parâmetro	Condição ótima
Fase extratora	C18
Solvente de dessorção	Metanol
Ciclos de extração	2 ciclos
Ciclos de dessorção	5 ciclos
Tempo de equilíbrio	30 segundos
pH da amostra	7,0

Para avaliar a recuperação das NAs pelo método otimizado, ensaios foram realizados utilizando NAs a 100 ng/mL. O método de extração DPX proposto demonstrou recuperação satisfatório para as seis NAs aqui avaliadas (**Figura 1.8**), obtendo valores entre 69 e 101% de recuperação.

Figura 1.8: Recuperação das NAs pela extração por DPX após otimização (n=3)



*Barra de erros referente ao desvio padrão

Fonte: do autor.

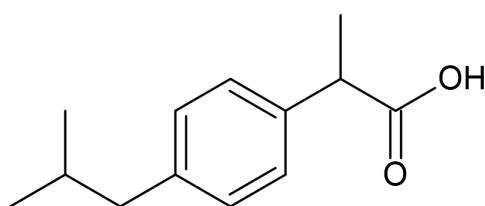
Considerando esse método, foi possível obter uma etapa de preparo de amostra para análise de NAs em medicamentos utilizando pouca quantidade de fase extratora, amostra e solvente de dessorção. Ademais, o procedimento total de extração torna possível a extração de NAs em torno de 4 minutos. Métodos tradicionais de extração de NAs apresentam o uso de cartuchos de SPE contendo em torno de 2 g de fase extratora, o uso de maiores volumes de solventes tóxicos como diclorometano e com o tempo de extração mais elevado (10 minutos com o sistema sob vácuo) [26,92].

4.3 Performance Analítica DPX-LC-MS

Para a avaliação do método de extração DPX seguido por análise LC-MS, foi realizado uma curva de calibração em matriz em matriz de medicamento utilizando como matriz branco de referência comprimidos de ibuprofeno, e realizado a avaliação das figuras de mérito. Esse medicamento foi escolhido como matriz de referência uma vez que não apresenta grupos amina e grupos nitro em molécula

(**Figura 1.9**), além de não haver incidência de NAs nesses medicamentos. Além disso, cabe uma comparação da formulação desses medicamentos com a formulação dos medicamentos sartana (losartana potássica e valsartana). Através da **Tabela 1.5**, é possível notar que a formulação do ibuprofeno se assemelha com a formulação dos medicamentos estudados no que tange o uso de excipientes, indicando que a matriz de ibuprofeno é adequada como matriz.

Figura 1.9: Estrutura molecular do ibuprofeno



Fonte: do autor.

Tabela 1.5: Comparação entre as formulações dos medicamentos comerciais de ibuprofeno e dos medicamentos sartana

Medicamento Comercial	Formulação
Losartana Potássica	Lactose monoidratada, celulose microcristalina, amido, dióxido de silício, croscamelose sódica, estearato de magnésio, dióxido de titânio, macrogol, hipromelose
Valsartana	Celulose microcristalina, dióxido de silício, lactose monoidratada, crospovidona, álcool polivinílico, estearato de magnésio, dióxido de titânio, macrogol, talco, óxido de ferro.
Ibuprofeno	Lactose monoidratada, celulose microcristalina, croscamelose sódica, dióxido de silício, hipromelose, dióxido de titânio, estearil sódio, macrogol, álcool etílico

Portanto, a curva analítica foi construída através da adição de soluções de ibuprofeno (30 mg/mL) em água, enriquecendo com a solução padrão das NAs, variando sua concentração de 0,5 a 150 ng/mL. Essas soluções foram submetidas a extração DPX e o extrato obtido foi analisado por LC-MS,

adicionando PI a 500 ng/mL. Os resultados demonstraram que todas NAs estudadas aqui apresentaram linearidade na faixa de concentração estudada uma vez que as regressões das curvas apresentaram coeficiente de determinação (r^2), apresentando valores entre 0,996 e 0,999 (**Tabela 1.6**). Para avaliação do LD e LQ de cada analito, foi avaliado a S/R de cada pico, dado experimentalmente. O primeiro ponto da curva (0,5 ng/mL) apresentou S/R em torno de 3 para todos os analitos, sendo assim o valor de LD do método DPX-LC-MS. Já o ponto da curva de concentração 1 ng/mL apresentou S/R acima de 10, estando dentro dos limites de quantificação aceitáveis pela ANVISA.

Tabela 1.6: Linearidade, LD e LQ para análise das seis NAs em medicamento por DPX-LC-MS

Analito	Regressão linear	r^2	LD (ng/mL)	LQ (ng/mL)
NMEA	$y = 0,0004x + 0,0116$	0,9961	0,50	1,0
NPIR	$y = 0,0413x - 0,0045$	0,9992	0,50	1,0
NDEA	$y = 0,0222x + 0,0246$	0,9960	0,50	1,0
NPIP	$y = 0,0294x + 0,0217$	0,9988	0,50	1,0
NMOR	$y = 0,0031x + 0,0093$	0,9981	0,50	1,0
NDBA	$y = 0,0551x + 0,0419$	0,9971	0,50	1,0

A precisão e exatidão foram avaliados intradia e interdia nas concentrações de 10, 100 e 150 ng/mL para as seis NAs avaliadas (**Tabela 1.7**). A precisão intradia foi calculada mediante a quintuplicata realizada no mesmo dia, apresentando variação de 2,2 a 13,3% para os níveis de concentração avaliados e para a precisão interdia foi avaliado os mesmos três níveis de concentração em três dias diferentes, apresentando variação de 0,9 a 6,7%. Já para os valores de exatidão intradia foi observado a variação de 1,2 a 12,2% nos níveis de concentração selecionados e os valores de exatidão interdia para os três pontos selecionados em três dias diferentes variaram de 0,1 a 12,6%. Tais valores de precisão e exatidão foram comparados com os valores estipulados pela RDC Nº 27 que determina que esses valores não devem estar acima de 15%. Os valores obtidos aqui para precisão e exatidão do método DPX-LC-MS apresentaram valores abaixo do estipulado, o que demonstra a capacidade do método proposto em quantificar as seis NAs em medicamentos [86].

Tabela 1.7: Valores de precisão (P%) e exatidão (E%) intradia e interdia, e recuperação (R%) para a análise das seis NAs por DPX-LC-MS (n=5)

NA	Concentração (ng mL)	Intradia		Interdia		R %
		P %	E %	P %	E %	
NMEA	10	7,2	9,7	4,4	8,4	82,1
	100	6,5	-10,1	2,3	-10,4	91,7
	150	6,3	-7,7	1,5	-10,0	92,2
NPIR	10	11,0	-5,5	3,6	-9,6	83,5
	100	8,3	2,2	1,7	0,2	88,2
	150	7,4	-1,2	1,2	-0,1	85,1
NDEA	10	6,7	-12,2	1,8	-11,8	99,1
	100	7,2	3,2	6,5	-1,6	106,3
	150	5,4	-3,1	2,0	-2,3	98,8
NPIP	10	10,7	2,7	2,7	-0,9	88,8
	100	2,2	2,7	2,2	4,9	86,5
	150	2,5	-1,7	1,6	-1,9	72,9
NMOR	10	13,3	-1,5	6,7	-12,6	79,2
	100	7,6	4,6	2,4	2,0	67,8
	150	5,7	-2,1	5,6	-8,4	63,0
NDBA	10	4,3	7,7	1,9	-10,3	107,6
	100	2,4	4,4	1,4	2,3	98,4
	150	3,4	-2,8	0,9	-2,3	91,3

A recuperação das seis NAs foi calculada mediante a equação 4 em três níveis (10, 100 e 150 ng/mL), apresentando valores entre 63,0 e 107,6 % (**Tabela 1.7**). É esperado que esses valores devem estar entre 80 e 120% [93]. Dentre as seis NAs avaliadas, apenas a NMOR apresentou valores de recuperação abaixo de 80%, estando fora do esperado. Contudo, deve-se considerar que a técnica DPX não é uma técnica exaustiva de extração, mas sim baseada no equilíbrio, e assim a literatura aponta que valores de recuperação acima de 50% são aceitáveis [94]. Concordante, a ANVISA permite valores abaixo do esperado caso o método apresente precisão e exatidão abaixo de 15%, o que foi demonstrado aqui.

O efeito matriz foi avaliado na faixa de linearidade do método proposto (1

a 150 ng/mL). De tal modo, foi comparado a extração DPX das NAs realizada em matriz de medicamento em relação a extração DPX em solvente (**Figura 1.10**). Para tanto, foi aplicado o teste t em par para médias considerando os pontos das curvas analíticas, avaliando assim o paralelismo entre as retas das regressões lineares das curvas analíticas em solvente e em matriz. O teste utilizou a hipótese nula que não há diferença significativa entre os coeficientes angulares das retas (diferença = 0). A hipótese nula empregada no teste é aceita para valores de *P bicaudal* menor que 0,05.

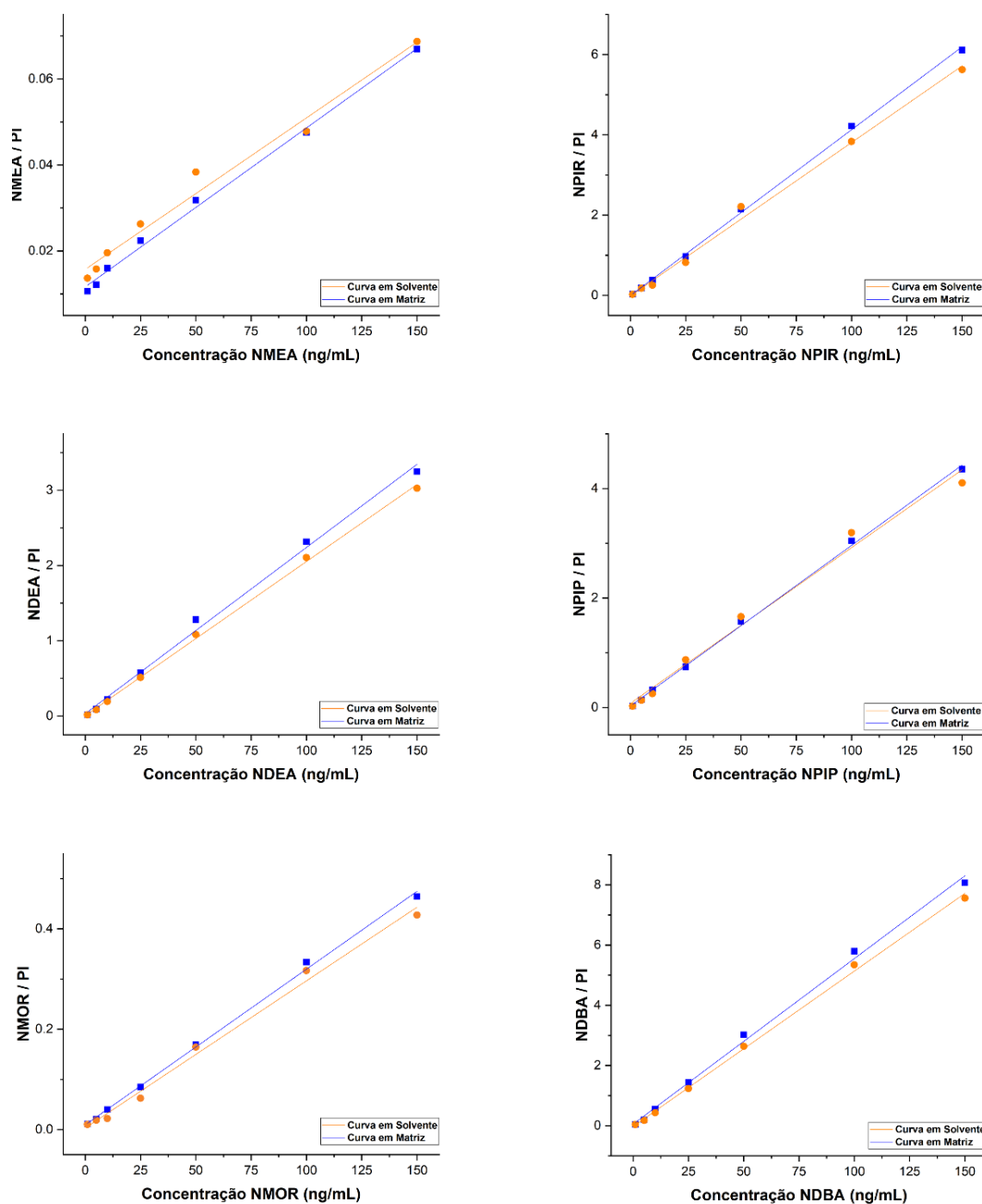
O teste apresentou que o efeito matriz foi significativo para a extração da NPIR e NPIP, uma vez que apresentou valor de *p bicaudal* maior que 0,05 enquanto não foi significativo para a extração da NMEA, NDEA, NMOR e NDBA (**Tabela 1.8**). Além disso, foi comparado o efeito matriz nos três níveis de concentração selecionados (10, 100 e 150 ng/mL) para cada analito que foi calculada mediante a equação 1, que indica que o efeito não é significativo para valores entre 80 e 120% [95].

Tabela 1.8: Valores relacionados aos testes de efeito matriz para as seis NAs avaliadas

	Analito					
	NMEA	NPIR	NDEA	NPIP	NMOR	NDBA
Concentração (ng/mL)						
10	84,7	151,7	108,7	128,4	111,8	113,4
100	99,4	110,5	110,0	95,2	105,3	108,3
150	97,4	108,6	107,4	106,1	108,6	106,7
<i>p-Valor</i>	0,040	0,089	0,037	0,091	0,024	0,023

Para a NMEA, NDEA, NMOR e NDBA, os valores são próximos a 100%, enquanto para NPIR e NPIP esses valores dispersam de 100%, corroborando com o resultado do teste t realizado. Ainda podemos perceber que essa dispersão ocorre apenas para concentrações baixas dessas analitos (ponto de 10 ng/mL), sendo indicado que em baixas concentrações de NPIR e NPIP a matriz apresenta maior influência na extração.

Figura 1.10: Comparação da curva analítica em matriz com a curva analítica em solvente como parâmetro de avaliação para o efeito matriz para as seis NAs



Fonte: do autor.

Mesmo apresentando efeito matriz significativo na quantificação da NPIP e NPIR, e baixa recuperação da NMOR, o método de extração DPX e determinação por LC-MS se apresenta adequado para a análise de NAs em medicamentos, uma vez que demonstra LD e LQ baixos, além de precisão e exatidão dentro do estipulado pela ANVISA.

4.4 Quantificação de NAs em medicamentos por DPX-LC-MS

A quantificação das NAs em medicamentos utilizando o método DPX-LC-MS foi possível através das regressões construídas (**Tabela 1.8**). Assim, os analitos foram quantificados em medicamentos comerciais de losartana potássica e valsartana. De tal modo, soluções desses medicamentos a 30 mg/mL foram submetidas a extração por DPX e posterior análise por LC-MS, com adição do PI a 500 ng/mL. A presença das NAs em medicamentos foi analisada em três marcas de losartana e duas marcas de valsartana. Cada marca foi avaliada utilizando três comprimidos do medicamento de mesmo lote. Os resultados de quantificação estão dispostos na **Tabela 1.9**.

Tabela 1.9: Concentração encontrada experimentalmente de NAs por DPX-LC-MS para amostras reais de medicamentos (n=3)

Medicamento	Dose (mg)	NMEA		NPIR		NDEA		NPIP	
		ng/mg	DP	ng/mg	DP	ng/mg	DP	ng/mg	DP
LOSARTANA POTÁSSICA									
Marca 1	50	1,41	0,10	0,03	0,01	0,21	0,02	0,04	0,2
Marca 2	100	0,67	0,10	0,094	0,01	ND	-	0,01	0,4
Marca 3	100	1,15	0,80	ND	-	0,17	0,05	0,05	0,4
VALSARTANA									
Marca 1	160	3,01	0,30	0,21	0,01	0,17	0,02	0,03	0,7
Marca 2	320	2,89	0,02	ND	-	0,27	0,05	0,02	0,1

DP: Desvio padrão
ND: Não detectado

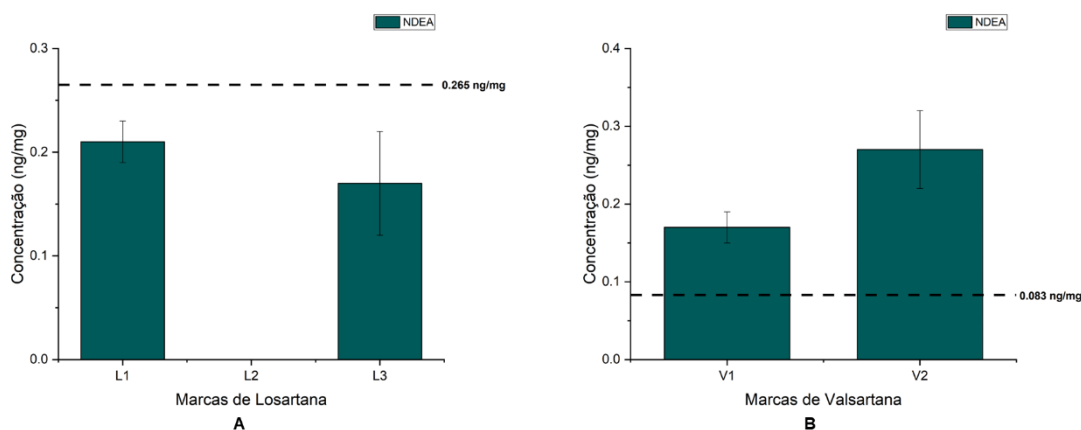
A **Tabela 1.9** apresenta a concentração da NMEA, NPIR, NDEA e NPIP encontradas em medicamentos comerciais para 1 mg do comprimido do medicamento de modo a ser comparados com limites aceitáveis estipulados pela ANVISA e pela FDA [5]. Os limites estipulados consideram a dose diária máxima do medicamento e a potência carcinogênica da N-nitrosamina para determinação da dose aceitável. Para medicamentos da família sartana, os limites devem ser baixos uma vez que esses medicamentos são de uso contínuo [32]. O guia de controle de NAs disponibilizado pela ANVISA permite o cálculo do limite e assim estão dispostos na **Tabela 1.10**.

Tabela 1.10: Limite tolerável de NPIR, NDEA e NPIP em medicamentos sartana

IFA	Dose Máxima (mg/dia)	NPIR		NDEA		NPIP	
		Dose tolerável (ng)	Limite (ng/mg)	Dose tolerável (ng)	Limite (ng/mg)	Dose tolerável (ng)	Limite (ng/mg)
Valsartana	320	1700	5,313	26,5	0,083	1300	4,063
Losartana	100		17,000		0,265		13,000

Desse modo, é possível comparar os resultados encontrados da concentração de NAs em medicamentos de valsartana e losartana potássica com os limites estipulados pelas regulamentações vigentes. Das NAs avaliadas pelo método, apenas a NMEA não se encontra na regulamentação da ANVISA [5]. Foi possível perceber que, das três marcas de losartana potássica avaliadas, nenhuma se encontra acima dos limites estipulados de NDEA, NPIP e NPIR. Já para os casos de valsartana, a concentração de NDEA encontrada nas duas marcas é superior a 0,083 ng/mg, o que está fora do estipulado (**Figura 1.11**).

Figura 1.11: Concentração de NDEA determinadas por DPX-LC-MS em relação ao limite estabelecido pela ANVISA: **A:** Marcas de losartana; **B:** Marcas de valsartana



*Barra de erros referente ao desvio padrão

Fonte: do autor

Ainda se faz importante ressaltar que, de acordo com a ANVISA, esses limites demonstrados na **Tabela 1.10** consideram apenas a ocorrência de uma N-nitrosamina no medicamento. Contudo, se considerado a concentração de

todas as NAs presentes no medicamento concomitantemente, os limites são menores uma vez que a soma das concentrações não pode ser superior ao limite da N-nitrosamina de maior potencial carcinogênico (no caso, a NDEA).

4.5 Comparação do método DPX-LC-MS com a literatura

A **Tabela 1.11** sumariza alguns métodos para análise de NAs em medicamentos dispostos na literatura para comparação com o método aqui proposto.

Tabela 1.11: Métodos de análise para detecção da NDEA em medicamentos reportada na literatura

Método	Matriz	LD e LQ	Tempo de Análise *	Referência
LC-MS	Losartana	LD: 0,32 ng/mL LQ: 1,0 ng/mL	25 minutos	[33]
DICM-LC-MS	Valsartana Losartana	LD: 0,2 ng/mL LQ: 0,5 ng/mL	26 minutos	[37]
SPE-GC-MS	Valsartana	LD: 0,07 ng/mg LQ: 0,3 ng/mL	25 minutos	[26]
In Tube SPME-LC-MS	Metformina	LD: 0,1 ng/mL LQ: 1,0 ng/mL	30 minutos	[96]
SALLE-LC-APCI-MS/MS	Mab A (Anticorpo monoclonal)	LD: 0,01 ng/mL LQ: 0,5 ng/mL	56 minutos	[38]
DPX-LC-MS	Valsartana Losartana	LD: 0,5 ng/mL LQ: 1,0 ng/mL	19 minutos	Presente estudo

*Tempo de análise considerando a etapa de preparo de amostra e a corrida cromatográfica
 SPE: Extração em fase sólida
 SALLE: Extração líquido-líquido com adição de sal.
 DICM: Microextração complexa de inclusão dispersiva
 SPME: Microextração em fase sólida

Diversos métodos de análise de NAs em medicamentos reportados na literatura se baseiam na técnica LC-MS. Muitos deles, como é o caso de alguns

métodos padrão da FDA [33,36], não apresentam a etapa de preparo de amostra precedente a análise, o que pode induzir a erros na quantificação desses analitos a nível traço. Além disso, o sistema LC-MS pode ser comprometido pelo entupimento de tubulações e da coluna cromatográfica, além da contaminação do detector [55]. Ademais, muitos protocolos de análise ainda não estão adequados com os princípios mais sustentáveis de análise.

Lim e colaboradores [26] utilizaram a SPE como preparo de amostra para posterior análise por GC-MS. Para tanto, os autores utilizaram cartuchos comerciais de SPE de carvão ativado (aproximadamente 2 g) e usaram de 11 mL de diclorometano como solvente de dessorção. A etapa de extração levou 10 minutos sob vácuo. Além disso, ao extrato, os autores adicionaram sulfato de sódio para remoção de interferentes da matriz.

Aqui, demonstramos que o método DPX-LC-MS aplicado para análise de NAs em medicamentos fez uso de 1 mL de amostra e 1 mL de solvente de dessorção (metanol) e 20 mg de fase extratora (C18). Assim, podemos perceber que o método desenvolvido atende a critérios da química analítica verde por reduzir etapas de análise, reduzir consumo de solventes tóxicos, reduzir energia gasta no processo, além da redução amostral e redução de resíduos. Ainda podemos citar como vantagem a manutenção do sistema analítico LC-MS por promover uma etapa de amostra com baixo custo e rápida, o que favorece a alta frequência analítica do método.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Diversas técnicas miniaturizadas de preparo de amostra vêm sendo aplicadas para a determinação de NAs em medicamentos. Até então, a técnica DPX ainda não é apresentada na literatura como uma alternativa para a determinação dessas impurezas, mesmo estando bem consolidada como uma técnica vantajosa e promissora em diversas áreas.

De modo a aplicar a técnica para determinação de NAs em medicamentos, os parâmetros influentes na extração DPX foram aqui avaliados de forma uni e multivariada para alcançar a melhor recuperação de seis NAs relacionadas a medicamentos. A fase extratora C18 e metanol como solvente de dessorção se mostraram eficientes para a extração das NAs nas etapas de otimização univariada. Já parâmetros como pH da amostra, ciclos de extração e dessorção e o tempo de equilíbrio referente à extração DPX foram avaliados de forma multivariada. Para uma triagem inicial, um planejamento fatorial fracionário demonstrou que apenas os ciclos de extração não foram influentes na extração das NAs. A seguir, avaliando apenas os parâmetros significativos, um planejamento de composto central possibilitou a determinação do ponto da extração das NAs por DPX.

As figuras de mérito do método DPX-LC-MS foram avaliadas segundo os parâmetros estipulados pela ANVISA, o que demonstrou a eficiência na quantificação de NAs pelo método uma vez que os valores de recuperação, precisão e exatidão estão de acordo com o esperado pelas regulamentações vigentes. Ademais, o método possibilitou a quantificação precisa das NAs em medicamentos comerciais de losartana potássica e valsartana.

Em suma, a técnica DPX-LC-MS se firma como uma abordagem rápida e mais econômica em comparação com as técnicas convencionais de preparo de amostra e análise de NAs em medicamentos. A técnica DPX ainda se destaca por sua sustentabilidade ambiental ao gerar uma quantidade reduzida de resíduos e diminuir o consumo de solventes. Assim, espera-se que esse método possa explorar novas possibilidades no que diz respeito à identificação de impurezas em diversos medicamentos, contribuindo com a indústria farmacêutica na segurança e controle dos medicamentos comercializados.

CAPÍTULO II

DETERMINAÇÃO DE N-NITROSAMINAS EM COMPRIMIDOS DE MEDICAMENTOS POR *DIRECT ANALYSIS IN REAL TIME MASS SPECTROMETRY* (DART-MS)

RESUMO II

Como apresentado, a incidência de N-Nitrosaminas (NAs) em medicamentos comerciais é uma preocupação atual dado a periculosidade de ingestão diária de doses dessas moléculas carcinogênicas. Em sua maioria, os métodos para análise de NAs se utilizam das técnicas cromatográficas acopladas a espectrometria de massas. Tais métodos podem apresentar alto consumo de solventes, de amostra e tempo elevado de análise, o que dificulta análise em larga escala e não condiz com princípios da química analítica verde. Uma vertente que vem crescendo no campo da espectrometria de massas são as chamadas Técnicas de Ionização ambiente por serem análises rápidas com mínimo consumo de solvente e amostra. Dentre essas técnicas, a análise direta em tempo real (*Direct Analysis in Real Time* - DART) se destaca como uma técnica de ionização ambiente amplamente empregada acoplada a espectrometria de massas (DART-MS) e que se utiliza de um gás metaestável para promover dessorção e ionização de compostos. Assim, aqui apresentamos a avaliação da técnica DART-MS frente à análise e quantificação de NAs em medicamentos. A análise por DART-MS foi realizada em modo positivo de ionização e parâmetros referentes a fonte foram otimizados (distância da fonte, tipo de gás e temperatura do gás) para melhor resposta analítica da análise direta e da análise em solução dos medicamentos. Foram avaliados medicamentos comerciais de losartana potássica, valsartana e nimesulida em relação a presença de NAs. Para avaliar a quantificação de NAs por DART-MS, foram estudadas as figuras de mérito do método, como linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação e efeito matriz. Para tanto, foram utilizadas soluções de ibuprofeno comercial (branco de referência) enriquecidas com padrão de seis NAs relacionadas a fármacos: N-nitroso-N-metiletilamina (NMEA), N-nitrosopirrolidina (NPIR), N-dietilnitrosamina (NDEA), N-nitrosopiperidina (NPIP), N-nitrosomorfolina (NMOR) e N-nitroso-N-dibutilamina (NDBA). A análise dos comprimidos por análise direta se mostrou interessante por permitir a avaliação de pontos específicos do comprimido em relação a presença de NAs, o que pode contribuir para identificar a origem da formação de NAs em medicamentos comerciais. O método otimizado de análise direta por DART-MS se mostrou sensível para a avaliação de NAs presentes em comprimidos sem nenhum preparo de amostra. Considerando as figuras de mérito, a técnica demonstrou-se adequada para quantificação de NAs em medicamentos para a análise da solução. Foi demonstrado a linearidade do método na faixa de concentração das seis NAs de 1-200 ng/mL, com limites de detecção entre 0,1-0,25 ng/mL, além de apresentar precisão e exatidão inferior a 15% e não apresentar efeito matriz significativo. A técnica DART-MS possibilita o uso da matriz a 50 mg/mL sem extenso preparo de amostra e sem prejudicar a quantificação das NAs nos medicamentos, gerando uma resposta analítica rápida e eficaz (30 segundos). O método viabilizou os limites estipulados pela performance analítica aqui demonstrados e sem apresentar efeito matriz. Além do mais, o consumo de solventes orgânicos é minimizado quando comparado ao volume de solventes gastos em métodos cromatográficos. De tal modo, a técnica DART-MS se apresenta como uma técnica para determinação de NAs em medicamentos que se alinha com os princípios da química analítica verde.

ABSTRACT II

As mentioned earlier, the incidence of N-Nitrosamines (NAs) in commercial medicines is a current concern due to the potential danger of daily intakes of these carcinogenic molecules. Most methods for NAs analysis rely on chromatographic techniques coupled with mass spectrometry (MS). Such methods may entail elevated solvent and sample consumption and prolonged analysis times, hindering large-scale analysis and not aligning with the principles of green analytical chemistry. A growing trend in mass spectrometry is the use of Ambient Ionization Techniques for their rapid analyses with minimal solvent and sample consumption. Among these techniques, Direct Analysis in Real Time (DART) stands out as a widely employed ambient ionization technique coupled with mass spectrometry (DART-MS), which utilize a metastable gas to promote desorption and ionization of compounds. Thus, here we present the evaluation of the DART-MS technique for the analysis and quantification of NAs in medicines. DART-MS analysis was performed in positive ionization mode, and parameters regarding the ion source were optimized (source and mass spectrometer inlet distance, employed gas, and gas temperature) for better analytical response in both direct analysis and solution analysis of medicines. Commercial medicines containing losartan potassium, valsartan, and nimesulide were evaluated regarding the presence of NAs. Analytical performance of DART-MS in quantifying NAs in medicines was evaluated regarding linearity, precision, accuracy, detection and quantification limits, and matrix effect. For this purpose, solutions of commercial ibuprofen (reference blank) enriched with a standard of six NAs related to drugs were used: N-nitroso-N-methylethylamine (NMEA), N-nitrosopyrrolidine (NPIR), N-diethylnitrosamine (NDEA), N-nitrosopiperidine (NPIP), N-nitrosomorpholine (NMOR), and N-nitroso-N-dibutylamine (NDBA). Direct analysis of the tablets by DART-MS proved to be interesting as it allowed the assessment of specific points on the tablet regarding the presence of NAs, which can contribute to identifying the origin of NAs formation in commercial medicines. The optimized method of direct analysis by DART-MS proved to be sensitive for evaluating NAs present in tablets without any sample preparation. Considering the analytical performance, the technique was found to be suitable for the quantification of NAs in medicines for solution analysis. The method demonstrated linearity in the concentration range of the six NAs from 1-200 ng/mL, with limit of detection ranging from 0.1-0.25 ng/mL. It exhibited precision and accuracy below 15% and showed no significant matrix effect. The DART-MS technique allows the use of a matrix at 50 mg/mL without extensive sample preparation, without compromising the quantification of NAs in medicines and providing a rapid and effective analytical response (30 seconds) with no matrix effect significance. Moreover, the consumption of organic solvents is minimized compared to the volume of solvents used in chromatographic methods. Thus, the DART-MS technique emerges as an approach for determining NAs in medications that aligns with the principles of green analytical chemistry.

1 INTRODUÇÃO

Como apresentado no capítulo I, a análise de N-Nitrosaminas (NAs) em medicamentos se utilizam das técnicas cromatográficas acopladas a espectrometria de massas (*mass spectrometry* – MS) [1,2]. Mesmo com tantas vantagens, as técnicas cromatográficas podem apresentar obstáculos quanto ao tempo de análise e grande consumo de solventes, o que não se adequa a técnicas mais sustentáveis de análise. Atualmente, as técnicas cromatográficas miniaturizadas se apresentam como alternativas para tais impasses, mas ainda apresentam alto valor de mercado [2,97].

Ademais, estudos da FDA demonstram que alguns métodos cromatográficos podem induzir a erros pela co-eluição de compostos com massas próximas à NAs relacionadas a medicamentos. De tal modo, dados de massa exata obtidos por espectrômetros de massas de alta resolução são de grande importância para a identificação e quantificação das NAs em medicamentos [2].

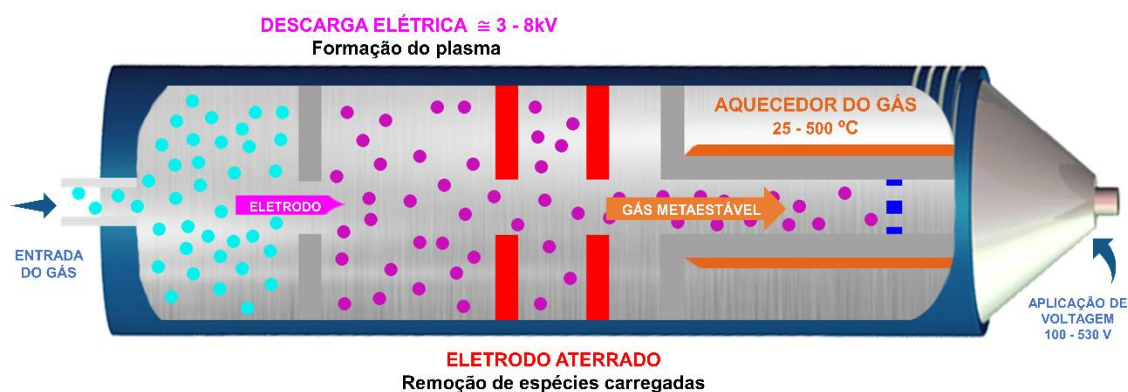
A literatura reporta a utilização das fontes de ionização à pressão atmosférica como as fontes *electrospray* (ESI) e ionização química à pressão atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization* – APCI) em métodos baseados em MS para NAs. Essas fontes de ionização requerem uso de técnicas de preparo de amostra dispendiosas, além de fazerem uso de potenciais elétricos e correntes de gás de alta velocidade, o que requer fontes fechadas e aterradas para manutenção da segurança do operador [2,98].

Nesse sentido, técnicas de ionização ambiente acopladas à MS vêm ganhando destaque na literatura por serem técnicas alternativas que não requerem tratamentos extensivos da amostra, além de permitirem a análise em ambiente aberto [70]. Dentre essas, a análise direta em tempo real (*Direct Analysis in Real Time* – DART) se destaca por ser uma técnica de ionização ambiente amplamente utilizada acoplada à espectrometria de massas (DART-MS). Apresenta grande aplicabilidade em ciências forenses, em análise de contaminantes, explosivos, análises farmacêuticas e análises relacionadas à segurança alimentar. [99]. A literatura aponta o uso desta técnica para a análise de NAs relacionadas a fumaça de cigarro, mas ainda até o momento, não há literatura sobre a análise das NAs relacionadas a fármacos com o uso de DART-MS [100,101].

DART-MS foi proposta em 2005 por Cody e colaboradores como uma fonte de ionização ambiente que se utiliza de gás nitrogênio ou hélio para promover a ionização de compostos. Para tanto, o gás deve estar na sua forma metaestável, condição alcançada através da aplicação de uma descarga corona que é responsável por gerar o plasma composto de espécies iônicas, elétrons livres e espécies excitadas [99,102].

A fonte de ionização DART é dividida em três câmaras (**Figura 2.1**), as quais promovem a metaestabilidade do gás, filtram as espécies carregadas e as espécies radicais e por fim aquecem o gás [103]. Ainda há uma voltagem aplicada na saída do gás responsável por eliminar possíveis espécies carregadas e cluster de gás metaestável formado [104]. Dessa forma, o gás que sai da fonte de ionização contém apenas espécies neutras eletronicamente excitadas, as quais reagem com a amostra adicionada entre a fonte e a entrada do espectrômetro de massas. Essa interação permite a análise direta em tempo real das substâncias presentes na amostra, tornando o DART-MS uma técnica poderosa para a análise de compostos em várias aplicações analíticas [103,105].

Figura 2.1: Representação da fonte de ionização DART

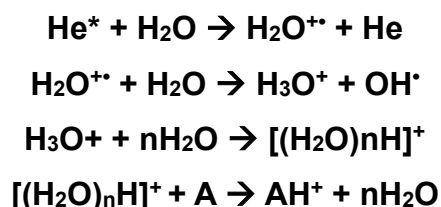


Fonte: do autor.

Portanto, a depender da amostra e do gás de ionização, ionização pela fonte DART é baseada no mecanismo de dessorção térmica seguida de ionização de Penning [102]. No modo positivo de ionização, esse mecanismo segue o **Esquema 2.1**, o qual sugere que o gás excitado (He^*) interage com moléculas de água do ambiente, produzindo clusters de água carregado

positivamente que conseguem assim formar o aduto do analito (AH^+). A formação desse aduto ainda depende da massa molecular, da volatilidade e polaridade do analito [102,106].

Esquema 2.1: Mecanismo de ionização de Penning no modo positivo utilizando gás hélio por DART.



A técnica DART-MS se popularizou pela sua versatilidade e praticidade possibilitando realizar análises diretas nas superfícies de amostras, uma vez que o gás metaestável produzido pela fonte consegue dessorver termicamente com eficiência a amostra *in situ*. Assim, a técnica promove a análise de amostras gasosas, líquidas e sólidas [107]. Dentre suas vantagens, pode-se destacar a alta sensibilidade mesmo para analitos a nível traço, não requer uso de solventes e o mínimo ou nenhum preparo de amostra, além de ionizar moléculas de baixa a alta polaridade e moléculas de massa molecular baixa a média massa (até 1000 Da) [105,107].

Com base no exposto, pode-se afirmar que a técnica DART-MS apresenta um método alternativo e promissor para a avaliação de NAs. Portanto, este estudo propõe avaliar a aplicação da técnica DART-MS para a identificação e quantificação de NAs em medicamentos. Até onde sabemos, é a primeira vez que este método é utilizado para a determinação de NAs em medicamentos diretamente usando comprimidos, o que abre um novo horizonte para a indústria de controle de segurança de medicamentos. O DART-MS oferece uma determinação rápida e precisa de NAs, está de acordo com os requisitos dos produtores farmacêuticos e também é uma técnica de química verde, contribuindo para uma análise mais sustentável.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este capítulo tem como objetivo avaliar a aplicação da técnica de análise direta em tempo real acoplada a espectrometria de massas para identificação e quantificação de NAs em medicamentos.

2.2 Objetivos específicos

- Otimização dos parâmetros da fonte DART para análise direta dos medicamentos;
- Avaliação do conteúdo de NAs em medicamentos por análise direta utilizando a técnica DART-MS;
- Desenvolvimento do método de quantificação de NAs em medicamentos por DART-MS;
- Avaliação das figuras de mérito do método proposto;
- Análise de NAs em medicamentos comerciais de losartana potássica, valsartana e nimesulida por DART-MS.

3 METODOLOGIA

3.1 Reagentes

Metanol (>99,9%) foi adquirido pela Tedia (Ohio, USA). Cafeína-(trimetil-¹³C) (>99%) e o padrão de NAs (2,0 mg/mL) composto por uma mistura de N-nitroso-N-metiletilamina (NMEA), N-nitrosopirrolidina (NPIR), N-nitrosodietilamina (NDEA), N-nitrosopiperidina (NPIP), N-nitrosomorfolina (NMOR) e N-nitroso-N-dibutilamina (NDBA), foram adquiridos pela Sigma-Aldrich (Pensilvânia, USA).

3.2 Obtenção e preparo de amostras

As amostras de medicamentos (n=10) foram obtidas em drogarias locais (Goiânia, Brasil), contemplando diferentes marcas para os seguintes medicamentos: losartana potássica (50 e 100 mg), valsartana (160 e 320 mg), nimesulida (100 mg) e ibuprofeno (600 mg). Para análise direta, o comprimido foi analisado *in situ* sem preparo de amostra. Para ensaios quantitativos, os comprimidos foram macerados solubilizados em metanol na concentração de 50 mg/mL e adicionado cafeína-(trimetil-¹³C) a 1,5 µg/mL como padrão interno (PI).

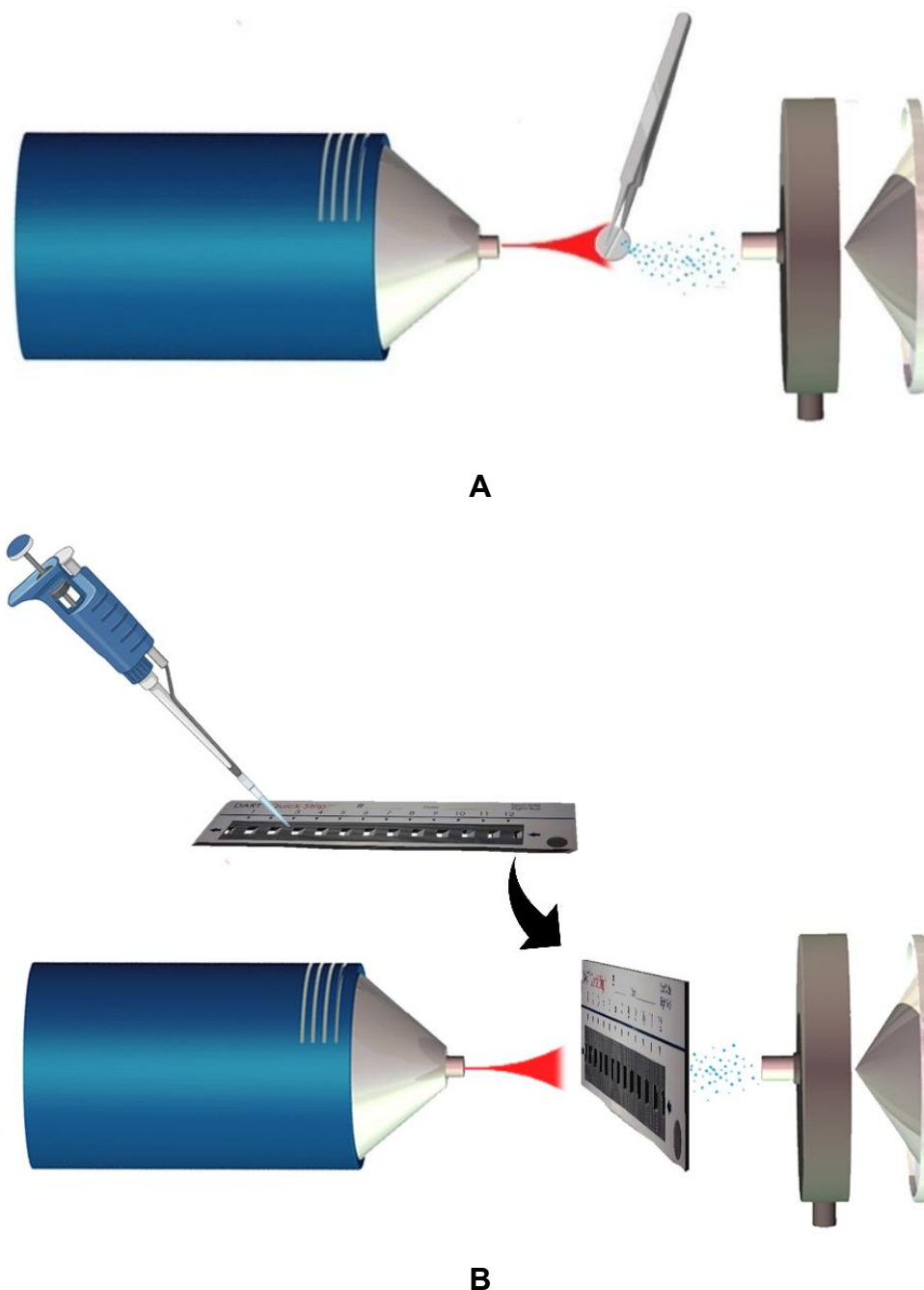
3.3 DART-MS

A análise de DART-MS foi realizada em um espectrômetro de massas modelo micrOTOF-Q III (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) equipado com a fonte de ionização DART-VSP (IonSense, Massachusetts, EUA) no modo positivo de ionização. Os gases hélio e nitrogênio foram utilizados como gás de ionização para a fonte de DART avaliada de 25 a 400 °C, fluxo de gás de 3,0 L/min e aplicando a voltagem de 350 V. As análises de espectrometria de massas foram realizadas na faixa de massas de m/z 50-250 Da com tempo de aquisição de 30 segundos. Os espectros de massas foram tratados empregando o software DataAnalysis versão 5.0.

A **Figura 2.2 A** esquematiza a análise direta dos comprimidos de losartana potássica, valsartana e nimesulida por DART-MS, a qual foi feita na superfície externa dos comprimidos e na superfície interna de comprimidos divididos ao meio. Com o auxílio de uma pinça, a amostra foi posicionada centralizada entre a fonte de ionização DART e a entrada do espectrômetro de massas. A fonte DART foi disposta a uma distância de 3 mm da entrada do espectrômetro de

massas. As análises em solução foram conduzidas adicionando 5 μL da solução em um cartão modelo QuickStrip™ (**Figura 2.2 B**), que foi posicionado em um QuickStrip™ *holder* próprio da fonte DART centralizado entre a fonte e a entrada do espectrômetro de massas, mantendo a fonte de ionização a uma distância de 3 mm.

Figura 2.2: Representação da análise por DART-MS. **A:** Análise direta dos comprimidos; **B:** Análise da solução utilizando um cartão modelo QuickStrip



Fonte: do autor.

3.4 Performance analítica

A performance analítica foi realizada pela avaliação das figuras de mérito do método DART-MS para análise de NAs em medicamentos. Para tal, o guia de controle de nitrosaminas da ANVISA preconiza que o método seja adequado de acordo com a RDC N° 166 de 24 de julho de 2017 que dispõe sobre a validação de métodos analíticos. Ainda foi utilizada como parâmetro a RDC RDC N° 27 de 17 de maio de 2012 que dispõe sobre requisitos mínimos para validação de métodos bioanalíticos [23,32,86].

Para as análises em solução, foram utilizados como branco de referência comprimidos de ibuprofeno macerados e solubilizados em metanol (50 mg/mL), posteriormente enriquecidos com solução padrão de NAs nas concentrações de 1, 5, 10, 25, 50, 100, 150 e 200 ng/mL (n=5). Os comprimidos de ibuprofeno foram utilizados como branco de referência uma vez que não apresentam NAs em sua composição. A razão da intensidade do pico do analito pela intensidade do pico do padrão interno foi utilizada como resposta analítica relativa. Assim, a linearidade da faixa de concentração estudada foi avaliada atribuindo o eixo **x** como concentração da amostra e eixo **y** a resposta analítica relativa.

Os valores de limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram atribuídos com base na razão sinal/ruído (S/R) obtidos experimentalmente de 3:1 e 10:1, respectivamente. O efeito matriz foi avaliado comparando os coeficientes angulares da curva de calibração feita a partir das NAs em solvente com as amostras enriquecidas pela solução de NAs e PI. em matriz de medicamento. Ainda, o efeito foi também avaliado em relação ao fator de matriz normalizado (FMN) nas concentrações de 10, 100 e 150 ng/mL, de acordo com a equação 1 a qual AM representa a resposta analítica para o analito em matriz e AS a resposta analítica do analito em solução.

$$FMN\% = \frac{AM}{AS} \cdot 100 \quad \text{Equação 1}$$

A precisão (P%) e a exatidão (E%) foram calculadas intradia para ensaios realizados em quintuplicata no mesmo dia, e interdia para ensaios realizados em quintuplicata em três dias diferentes utilizando as equações 2 e 3, respectivamente, onde DP é o desvio padrão das concentrações determinadas

experimentalmente, CMD é a concentração média determinada entre replicatas e CT é a concentração teórica. Tais parâmetros foram calculados para as concentrações de 10, 100 e 150 ng/mL.

$$P\% = \frac{DP}{CMD} \cdot 100 \quad \text{Equação 2}$$

$$E\% = \frac{CMD-CT}{CT} \cdot 100 \quad \text{Equação 3}$$

3.5 Quantificação de NAs em amostras reais

Para a quantificação de NAs nos medicamentos, foram utilizadas as soluções dos medicamentos losartana potássica, valsartana e nimesulida preparadas em metanol na concentração de 50 mg/mL. Foram adicionadas 5 µL da solução no cartão modelo QuickStrip™, posicionado no QuickStrip™ holder. Os resultados foram tratados empregando o software DataAnalysis versão 5.0 (Brucker Daltonics, Bremen, Alemanha).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo objetivou a aplicação da técnica DART-MS para determinação de NAs em medicamentos para análise direta (*in situ*), quando na análise da solução de medicamentos. Para tal, os parâmetros influentes na análise como a temperatura do gás de ionização e da distância da fonte DART, além das figuras de mérito referentes ao método de quantificação foram avaliadas.

4.1 Otimização da análise por DART-MS

O método de análise direta e da análise em solução por DART-MS foi desenvolvido em relação a resposta analítica obtidas para as NAs avaliadas nos medicamentos utilizando comprimidos de losartana potássica.

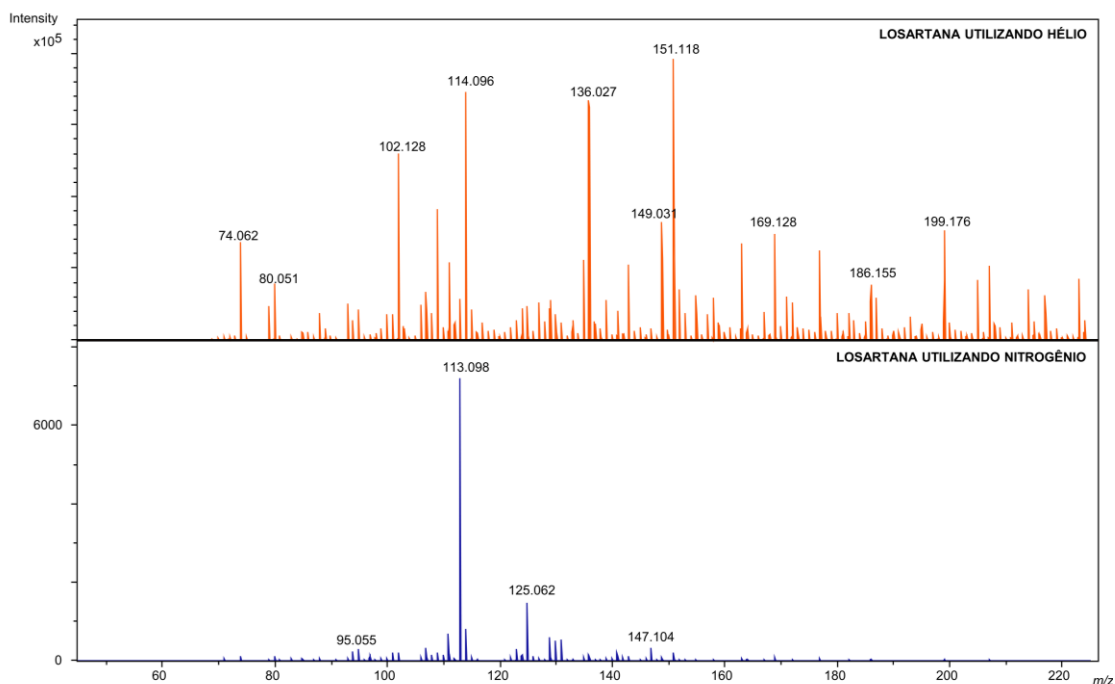
A distância da fonte DART da entrada do espectrômetro de massas se mostrou importante para o sinal analítico. É percebido que quanto menor a distância, maior a intensidade dos analitos uma vez que o caminho percorrido pelos íons formados é menor [108]. Contudo, as análises diretas requerem uma distância otimizada para obter bom sinal analítico sem promover a entrada de material particulado para o equipamento. Aqui, a distância de 3 mm foi ideal para os testes realizados, tanto para a análise direta quanto para a análise de solução utilizando o cartão QuickStrip™.

O gás da fonte de ionização DART também foi um parâmetro avaliado, comparando a performance de dessorção térmica e ionização promovida pelo gás hélio e gás nitrogênio. Essa avaliação comprovou que o uso do hélio como gás de ionização se mostrou mais eficiente para a dessorção dos compostos presentes nos medicamentos por gerar melhor resposta analítica (**Figura 2.3**). Essa diferença de sinal entre a ionização já é reportada na literatura, apresentando maior eficiência de ionização quando utilizado o gás hélio, mesmo aplicando menor fluxo de gás [109]. Ademais, a ionização utilizando gás hélio já é mais estudada do que a ionização por gás nitrogênio. A ionização ocorre pelo gás em seu estado metaestável, e enquanto a energia interna do estado excitado do N₂ pode variar ao seu máximo em torno 11,5 eV (N₂ possui alguns níveis de estados excitados estáveis), a energia interna do He é de 19,8 eV, o que justifica a ionização mais eficiente aplicando o hélio [110,111].

Dentre os mecanismos de ionização por DART-MS no modo positivo, o

mais aceito e discutido pela literatura é o mecanismo de ionização de Penning, que envolve a formação de clusters de água carregados positivamente, os quais são responsáveis por interagir com os analitos e os ionizar. De tal modo, a energia interna do gás na sua forma metaestável deve ser suficiente para a ionização da água presente na atmosfera. Assim, a maior energia interna do hélio frente a energia do nitrogênio justifica sua melhor performance na ionização [109,110,112]. Esse mecanismo de ionização é similar ao mecanismo de ionização por APCI. A literatura apresenta diversos métodos utilizando APCI como fonte de ionização para análise de NAs, uma vez que apresenta melhor eficiência de ionização frente a fontes como o ESI [34]. De tal modo, podemos afirmar que o mecanismo de ionização por DART-MS é apropriado para análise de NAs.

Figura 2.3: Comparação da análise direta da losartana por DART-MS utilizando hélio e nitrogênio como gás de ionização

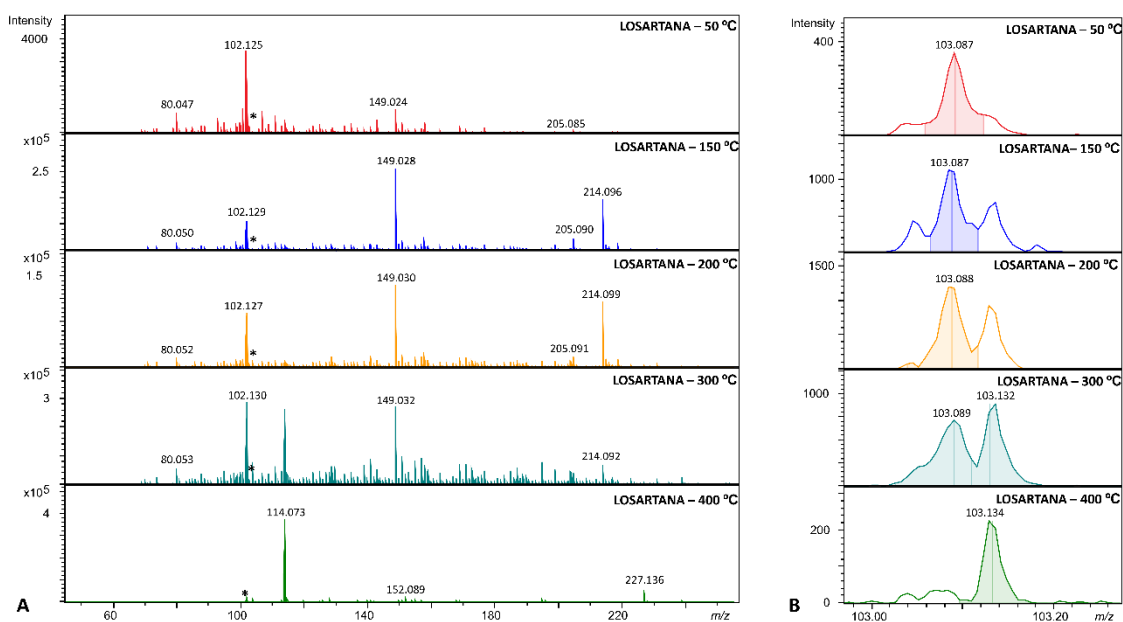


Fonte: do autor.

Outro parâmetro importante a se avaliar para o uso da fonte de ionização DART é a temperatura do gás, uma vez que o emprego de temperatura mais elevada pode favorecer a dessorção de mais compostos da matriz, incluindo aqueles que são pouco voláteis [105]. No entanto, a análise de NAs requer maior cuidado quanto a temperatura, visto que a literatura reporta que as nitrosaminas

podem ser formadas pela degradação do fármaco quando submetido altas temperaturas [2]. Assim, a ionização pela fonte DART foi avaliada de 50 a 400 °C (**Figura 2.4**). A avaliação da temperatura demonstrou que tal parâmetro apresenta grande significância nos compostos ionizados, uma vez que a maior temperatura consegue ionizar uma maior quantidade de moléculas presentes no medicamento.

Figura 2.4: Avaliação da variação de temperatura (50, 150, 200, 300 e 400 °C) na análise do medicamento losartana potássica no método de análise direta por DART-MS: **A:** Espectros de *full scan* para a faixa de 50 - 250 *m/z* (* pico referente a N-nitrosodietilamina); **B:** Resposta para a N-nitrosodietilamina (*m/z* 103,0866)



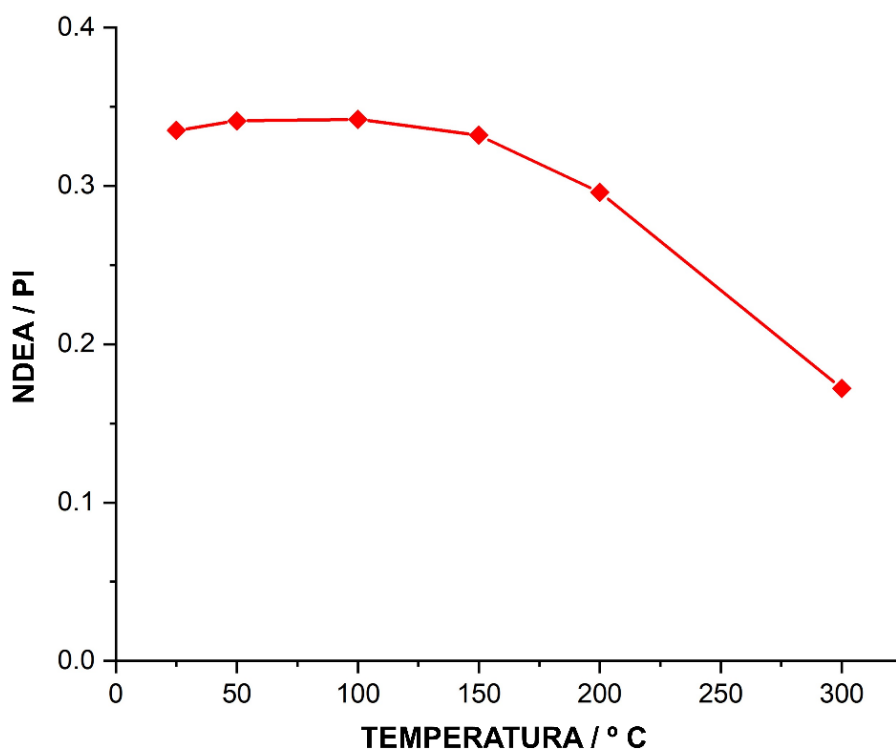
Fonte: do autor.

Na **Figura 2.4** é apresentado o espectro obtido para as temperaturas avaliadas e para a resposta da N-nitrosodietilamina (NDEA), N-nitrosamina encontrada nos medicamentos de losartana analisados. É possível observar que o espectro referente à temperatura de 50 °C demonstrou baixa intensidade, o que indica que a dessorção de componentes da amostra não foi favorecida utilizando essa baixa temperatura. A visualização da NDEA foi possível nessa temperatura, mas é inviável para análise das NAs de maior peso molecular e de menor volatilidade. Já a temperatura de 150 °C permite a visualização da NDEA e de outros compostos presentes na matriz, sem comprometer a avaliação do

analito. Temperaturas acima de 200 °C demonstraram grande quantidade de íons dessorvidos e com altas intensidades. Ainda é possível notar que o espectro referente ao emprego da temperatura de 400 °C apresentou a supressão iônica de compostos com baixa intensidade uma vez que favoreceu a ionização de outros compostos, além de impossibilitar a visualização da NDEA. Esse efeito de supressão iônica ocorre com analitos em baixas concentrações em análises por DART-MS por haver competição de ionização entre os analitos dessorvidos termicamente pela fonte DART [113].

Além disso, a temperatura também foi avaliada na análise da solução da losartana potássica comercial a 50 mg/mL, adicionado o PI a 1,5 µg/mL, e variando de 25 °C a 300 °C em triplicata. Essa avaliação teve objetivo de verificar se há variação na detecção de NDEA com a variação da temperatura. Foi notado que a resposta analítica da NDEA se mantém estável até 150 °C, e em temperaturas mais altas há um decréscimo (**Figura 2.5**).

Figura 2.5: Avaliação da quantificação da NDEA em relação a temperatura em solução por DART-MS (n=3)



Fonte: do autor.

Esse resultado corrobora com os resultados obtidos previamente da análise direta, mostrando que ocorre a supressão iônica desse analito em temperaturas elevadas. Outro ponto a considerar é que não houve formação da NDEA por efeito da temperatura aplicada na fonte DART. Assim, a temperatura da fonte de ionização DART foi mantida a 150 °C para as análises direta e as análises em solução, uma vez que apresentou boa resposta analítica para as NAs e evitando um possível efeito de supressão iônica.

4.2 Análise direta dos comprimidos por DART-MS

A literatura relata que a presença de NAs em medicamentos está relacionada à síntese e/ou degradação do medicamento, e até mesmo às interações entre o medicamento e o material de embalagem. No caso dos medicamentos sartanas, como valsartana e losartana, a ocorrência de NAs está relacionada a subprodutos e reagentes formados durante a síntese do medicamento [2,114]. Em alguns casos, a degradação do medicamento pode estar relacionada à formação de novas NAs, como relatado nos casos da ranitidina e nizatidina. A FDA observou que o teor de NDMA aumentou com a data de validade desses medicamentos, portanto, a degradação do medicamento pode originar essas impurezas [2,26]. Além disso, a EMA relatou que a interação entre os comprimidos do medicamento e as películas de lacre como material de embalagem, como a nitrocelulose, pode ser uma rota para a formação de NAs [20].

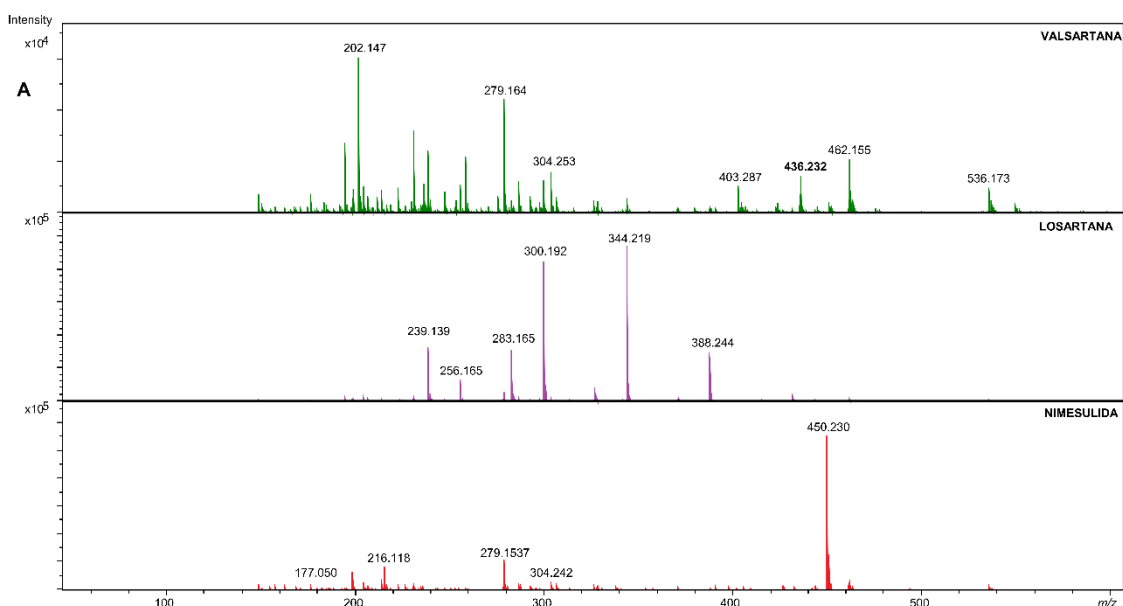
Portanto, a análise direta de comprimidos de medicamentos por DART-MS se mostra vantajosa uma vez que permite a avaliação do conteúdo de NAs em pontos específicos do comprimido. Essa análise pode indicar se o conteúdo de NAs é mais pronunciado na superfície externa do comprimido, no caso de impurezas produzidas pela interação entre o medicamento e a embalagem, o que pode indicar a origem das NAs [20,115]. Ademais, essa análise direta dos comprimidos pode fornecer uma resposta rápida e triagem em relação à presença de NAs nesses medicamentos comerciais.

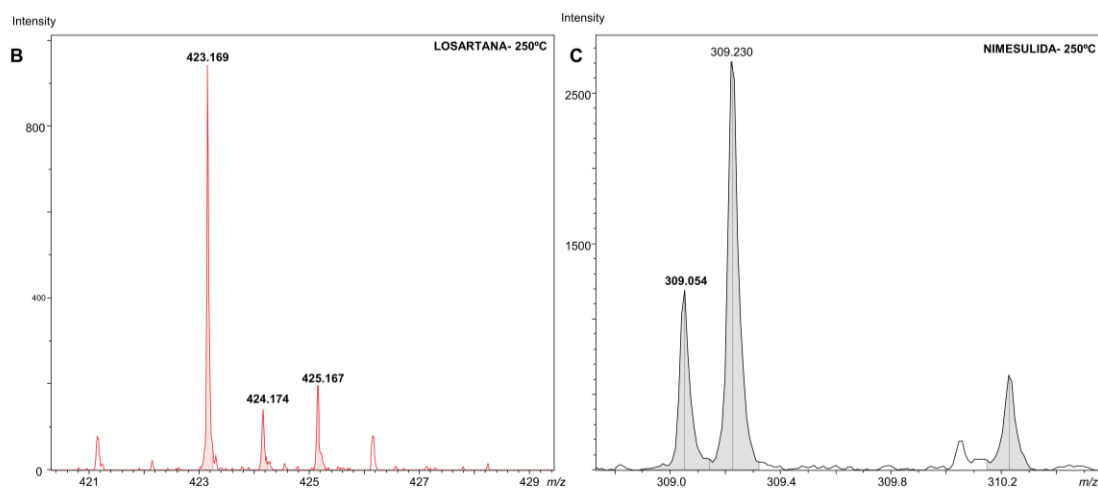
Os comprimidos dos medicamentos comerciais de valsartana, losartana potássica e nimesulida foram submetidos a análise direta por DART-MS, operando no modo positivo de ionização. Os comprimidos foram centralizados entre a fonte de ionização DART e o espectrômetro de massas com o auxílio de

uma pinça metálica.

Inicialmente, os comprimidos foram avaliados em relação aos íons relacionados ao medicamento, analisando o espectro de massa em uma faixa de m/z de 100 a 600 Da por meio de análise direta utilizando os parâmetros otimizados (**Figura 2.6**). O íon protonado de losartana (m/z 423,1694) não foi observado pela análise DART-MS, assim como o de nimesulida (m/z 309,0539). O íon protonado de valsartana foi detectado, demonstrando baixo erro de massa (m/z 436,2433). No entanto, tanto losartana quanto nimesulida foram observados usando uma temperatura do gás acima de 250 °C, com baixa intensidade, o que indica que as moléculas de losartana e nimesulida requerem uma temperatura mais elevada para serem desorvidas dos comprimidos.

Figura 2.6: Avaliação dos comprimidos por análise direta por DART-MS. **A:** Avaliação da valsartana, losartana e nimesulida no método otimizado; **B:** Avaliação da losartana utilizando 250 °C; **C:** Avaliação da nimesulida utilizando 250 °C.



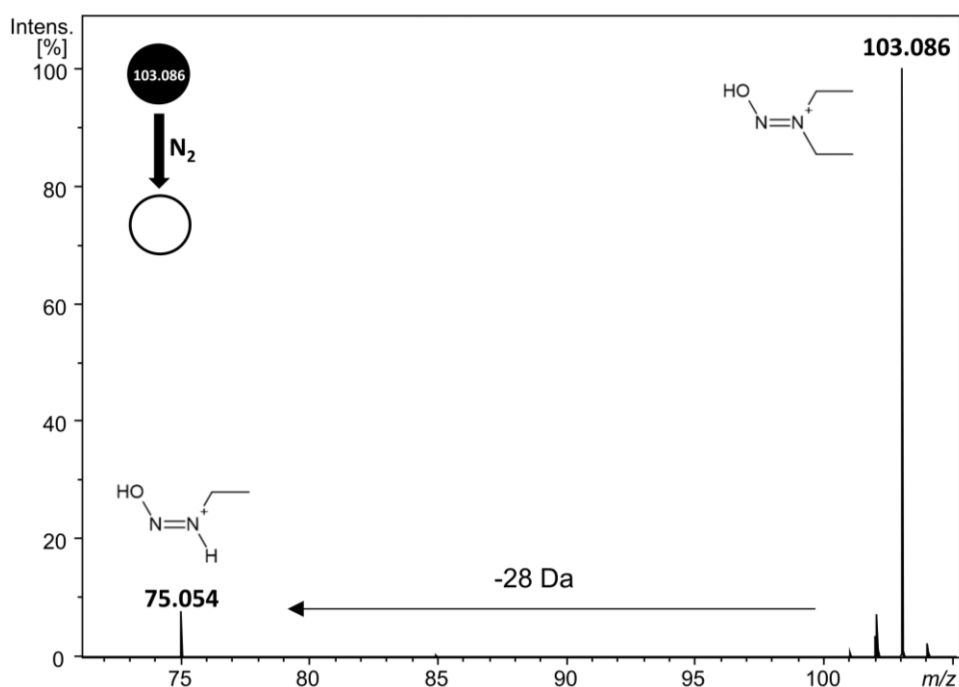


Fonte: do autor.

A fonte de ionização DART operando a 150 °C não forçou a degradação térmica dessas moléculas, uma vez que todos os fármacos estudados apresentam estabilidade térmica nessa temperatura. A literatura reporta que a losartana potássica demonstra estabilidade térmica até 285 °C [116], a valsartana apresenta estabilidade térmica até valores em torno de 170 °C [117] e a nimesulide se degrada apenas para temperaturas superiores a 200 °C [118]. Então, não foi observado produtos de degradação dessas moléculas.

A seguir, conteúdo de NAs foi avaliado em medicamentos comerciais de seis marcas diferentes de losartana potássica e duas marcas diferentes de valsartana. Os comprimidos foram analisados tanto na sua superfície externa quanto na superfície interna, partindo o comprimido ao meio. Foi verificado que a análise do comprimido internamente apresentou melhor resposta analítica. A majoritária parte dos comprimidos de losartana potássica e valsartana, das diferentes marcas, apresentaram NAs. Os medicamentos da família sartana apresentaram a NDMA (m/z 75,0553) e a NDEA (m/z 103,0866). Como a ocorrência da NDEA foi mais pronunciada, foi possível realizar sua fragmentação (**Figura 2.7**) sendo observada a perda de 28 Da referente a $-C_2H_5$, a qual é concordante com a literatura (m/z 103 \rightarrow 75) [119]. Das amostras analisadas, apenas uma marca de losartana potássica não apresentou a presença de NAs pela análise direta (**Tabela 2.1**).

Figura 2.7: Espectro de fragmentação do NDEA



Fonte: do autor.

Tabela 2.1: NAs encontradas nos medicamentos de losartana potássica e valsartana e sua *m/z* medida com o erro de massa obtidos pela análise direta por DART-MS.

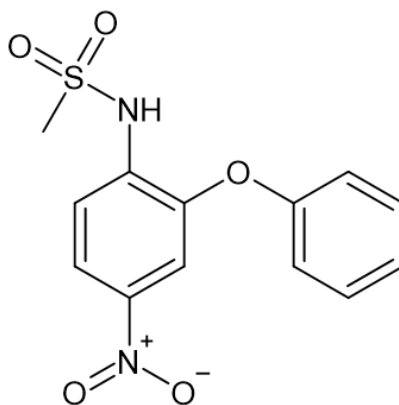
Medicamento	NDMA		NDEA		NPIP	
	<i>m/z</i>	EM(ppm)	<i>m/z</i>	EM(ppm)	<i>m/z</i>	EM(ppm)
Losartana Potássica						
MARCA 1	75,0556	4,0	103.0860	5,8	ND	ND
MARCA 2	75,0552	1,3	103,0859	6,6	115,0853	12,4
MARCA 3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MARCA 4	75,0651	10,6	103,0868	2,0	115,0853	12,4
MARCA 5	75,0551	2,6	103,0866	0,2	ND	ND
MARCA 6	75,0553	0,1	103,0870	3,8	115,0860	5,3
Valsartana						
MARCA 1	75,0651	10,7	103,0873	6,8	115,0868	1,6
MARCA 2	75,0551	2,5	103,0865	0,9	ND	ND

EM: Erro de Massa
ND: Não detectado

Além das reportadas na **Tabela 2.1**, a N-nitroso-N-metil-4-mminobutírico (NMBA) (m/z 147,0764) com erro abaixo de 1 ppm foi identificada na marca 1 de valsartana e a NMOR (117,0650) foi encontrada em uma marca de losartana potássica, com erro de massa de 7,4 ppm. Para NMBA, NPIP, NMOR e NDMA não foi possível obter o perfil de fragmentação uma vez que essas moléculas apresentaram baixa intensidade, mas o baixo erro de massa obtido é um forte indicativo da presença dessas moléculas.

Em seguida, o método avaliou medicamentos ainda não estudados pela literatura em relação a ocorrência de NAs, como a nimesulida que é um medicamento anti-inflamatório amplamente utilizado (**Figura 2.8**) [120]. Esse fármaco possui um grupo nitroso e uma amina secundária em sua molécula, assim como a ranitidina. A literatura reporta que a degradação da molécula de ranitidina está intrinsecamente ligada à ocorrência de NAs nesse medicamento. Assim, duas marcas diferentes do medicamento nimesulida foram avaliadas quanto a ocorrência de NAs.

Figura 2.8: Estrutura molecular da nimesulida



Fonte: do autor.

As análises referentes aos comprimidos de nimesulida foram conduzidas do mesmo modo que a valsartana e losartana. As duas marcas do medicamento comercial apresentaram NDMA e NDEA (**Tabela 2.2**). O método permitiu a fragmentação da NDEA, repetindo o perfil de fragmentação apresentado pela **Figura 2.7**, novamente confirmando a presença dessa molécula.

Tabela 2.2: NAs encontradas nos medicamentos de nimesulida e sua *m/z* medida com o erro de massa obtidos pela análise direta por DART-MS.

Medicamento	NDMA		NDEA	
	<i>m/z</i>	EM (ppm)	<i>m/z</i>	EM (ppm)
NIMESULIDA				
MARCA 1	75,0558	6,7	103,0870	3,5
MARCA 2	75,0557	5,4	103,0867	1,2

EM: Erro de Massa

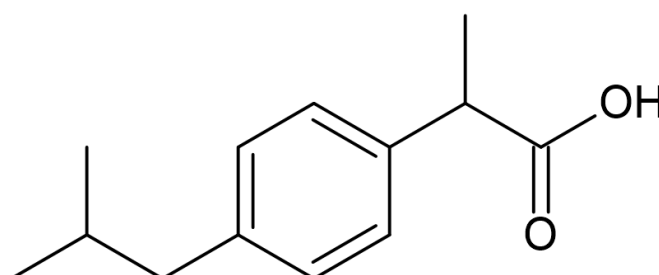
ND: Não detectado

A análise *in situ* dos comprimidos desses medicamentos comerciais por DART-MS se mostrou eficiente e sensível para detecção de NAs, uma vez que essas moléculas se apresentam em nível traço. Contudo, a quantificação das NAs *in situ* ainda é um desafio pela dificuldade de adicionar um PI aos comprimidos.

4.3 Performance analítica

Foi construída uma curva de calibração em matriz de medicamento utilizando como matriz branco de referência comprimidos de ibuprofeno (**Figura 2.9**), e realizado a avaliação das figuras de mérito. A escolha do ibuprofeno teve como critério a ausência das NAs estudadas no medicamento comercial, além de não ser reportado na literatura a incidência de NAs nesse medicamento. Ademais, a formulação do ibuprofeno se assemelha com a formulação dos medicamentos estudados no que tange o uso de excipientes, indicando que a matriz de ibuprofeno é adequada como matriz (**Tabela 2.3**).

Figura 2.9: Estrutura molecular do ibuprofeno



Fonte: do autor.

Tabela 2.3: Comparação entre as formulações dos medicamentos comerciais avaliados por DART-MS

Medicamento Comercial	Formulação
Losartana Potássica	Lactose monoidratada, celulose microcristalina, amido, dióxido de silício, croscamelose sódica, estearato de magnésio, dióxido de titânio, macrogol, hipromelose
Valsartana	Celulose microcristalina, dióxido de silício, lactose monoidratada, crospovidona, álcool polivinílico, estearato de magnésio, dióxido de titânio, macrogol, talco, óxido de ferro.
Nimesulida	Lactose monoidratada, celulose microcristalina, povidona, crospovidone, benzoato de sódio, docusato de sódio
Ibuprofeno	Lactose monoidratada, celulose microcristalina, croscamelose sódica, dióxido de silício, hipromelose, dióxido de titânio, estearil sódio, macrogol, álcool etílico

De tal modo, a curva analítica foi preparada através da adição de soluções de ibuprofeno (50 mg de comprimido por 1 mL de metanol) com a solução padrão das NAs, variando sua concentração de 1 a 200 ng/mL. Os resultados demonstraram que todas NAs estudadas aqui apresentaram linearidade na faixa de concentração estipulada. As regressões das curvas apresentaram coeficiente de determinação (r^2) superior a 0,99, o que confirma a linearidade do método. Para avaliação do LD e LQ de cada analito, testes foram realizados com concentrações abaixo de 1 ng/mL para determinação desses valores em relação à S/R (**Tabela 2.4**) [121]. Ainda foi notado também que houve maior variação do sinal analítico nos pontos em que as NAs estavam mais concentradas. Esse efeito já é reportado na literatura uma vez que o aumento da quantidade de analitos ionizáveis na amostra pode afetar a eficiência de ionização por DART, uma vez que há a competição por ionização dos analitos dessorvidos [122].

Tabela 2.4: Linearidade, LD e LQ para análise de seis NAs em medicamento por DART-MS

Analito	Regressão linear	r²	LD (ng/mL)	LQ (ng/mL)
NMEA	$y = 0,0197x + 0,3625$	0,9968	0,10	1,00
NPIR	$y = 0,0103x + 0,3663$	0,9997	0,10	1,00
NDEA	$y = 0,0103x + 0,0822$	0,9998	0,25	1,00
NPIP	$y = 0,0255x + 0,4918$	0,9996	0,10	1,00
NMOR	$y = 0,0109x + 0,3016$	0,9988	0,10	1,00
NDBA	$y = 0,0134x + 0,2014$	0,9992	0,10	1,00

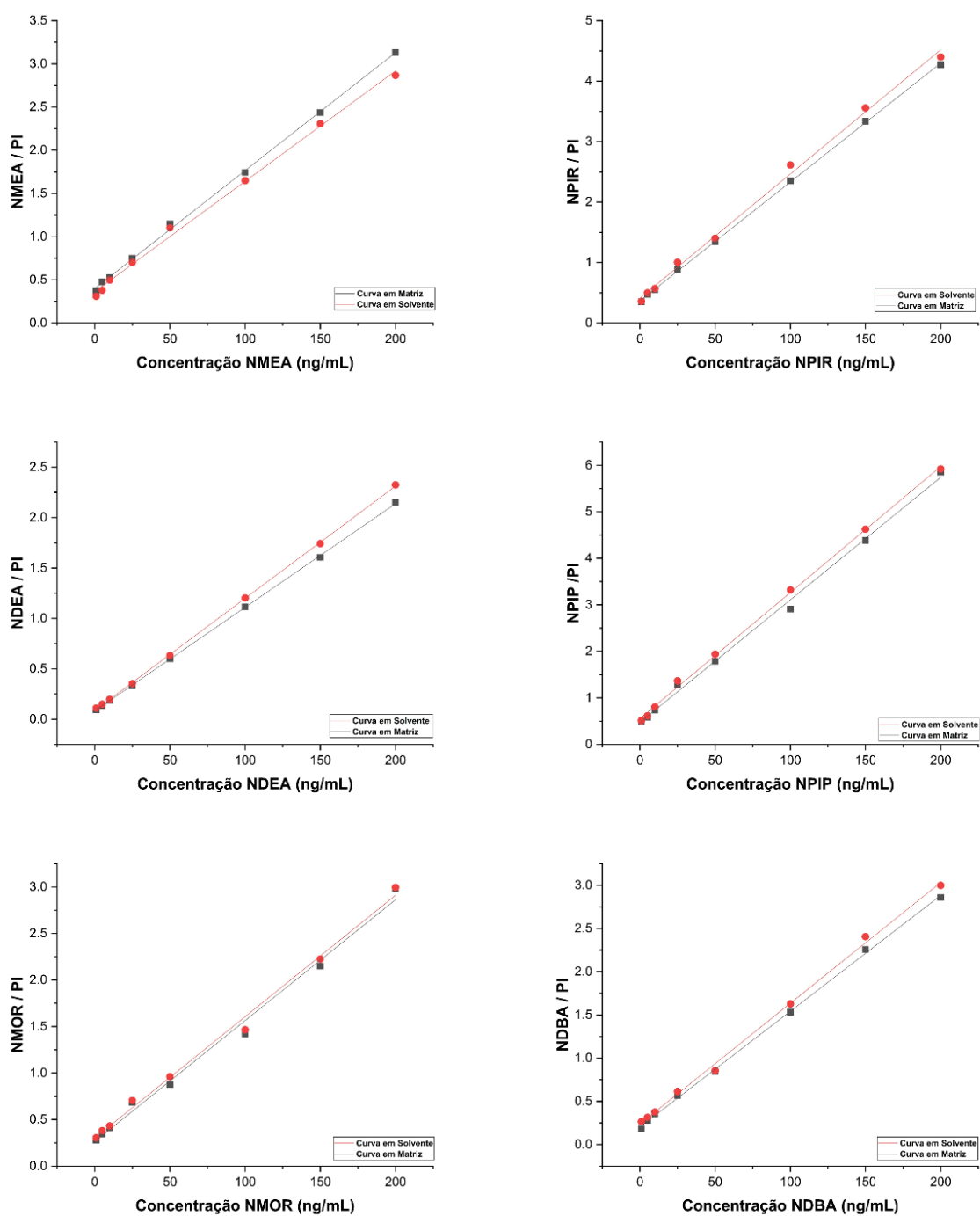
A precisão e exatidão foram avaliados intradia e interdia nas concentrações de 10, 100 e 150 ng/mL para as seis NAs avaliadas (**Tabela 2.5**). A precisão intradia foi calculada mediante a quintuplicata realizada no mesmo dia, apresentando variação de 3,2 a 13,6 % para os níveis de concentração avaliados e para a precisão interdia foram avaliados os mesmos três níveis de concentração em três dias diferentes com variação de 0,9 a 8,7 %. Já para os valores de exatidão intradia, foi observado a variação de 0,1 a 14,3 % nos níveis de concentração selecionados e os valores de exatidão interdia para os três pontos selecionados em três dias diferentes variaram de 0,1 a 7,7 %. Tais valores de precisão e exatidão foram comparados com os valores estipulados pela RDC Nº 27 que estipula que valores de precisão e exatidão não devem estar acima de 15 %. Os valores apresentados de precisão e exatidão obtidos apresentaram valores abaixo do estipulado, o que demonstra a excelência do método proposto em quantificar as 6 NAs em medicamentos [86].

Tabela 2.5: Valores de precisão (P%) e exatidão (E%) Intradia e Interdia para a análise das seis NAs por DART-MS (n=5)

NA	Concentração (ng mL)	Intradia		Interdia	
		P%	E%	P%	E%
NMEA	10	13,4	5,8	2,2	-5,7
	100	7,5	0,4	2,2	-1,0
	150	13,6	1,3	4,2	-4,0
NPIR	10	5,8	-9,5	3,0	-3,7
	100	6,6	0,8	1,0	0,3
	150	7,9	0,5	1,8	-1,4
NDEA	10	11,5	2,1	2,4	0,6
	100	6,2	0,1	1,4	-0,3
	150	11,3	-1,3	0,9	-1,2
NPIP	10	11,8	-3,4	1,6	-0,5
	100	10,7	-1,1	2,8	0,1
	150	7,4	-1,0	2,1	-0,6
NMOR	10	11,0	14,3	3,7	-0,1
	100	3,2	-11,2	2,9	-7,7
	150	6,1	-12,2	3,3	-7,2
NDBA	10	11,4	13,5	8,7	-0,1
	100	8,7	-0,8	1,5	-0,4
	150	12,1	2,1	2,4	1,4

O efeito matriz foi avaliado na faixa de linearidade do método proposto. Assim, a curva analítica em matriz de cada N-nitrosamina foi comparada com a de curva dos analitos em solvente (**Figura 2.10**). O efeito matriz foi analisado por meio do paralelismo entre as retas das regressões lineares das curvas analíticas em solvente e em matriz. Para tanto, foi realizado o teste t em par para médias nos dados das curvas analíticas, avaliando os pontos das curvas. A hipótese nula avaliada por esse teste foi de que não há diferença significativa entre os coeficientes angulares das retas (diferença = 0). Foi obtido o valor de *p bicaudal* menor que 0,05 para todas as curvas, sendo assim a hipótese nula empregada no teste é aceita (**Tabela 2.6**).

Figura 2.10: Comparação da curva analítica em matriz com a curva analítica em solvente como parâmetro de avaliação para o efeito matriz para as seis NAs



Fonte: do autor.

Ademais, foi comparado o efeito matriz nos três níveis de concentração selecionados (10, 100 e 150 ng/mL) para cada analito. Os valores calculados de efeito matriz para os três níveis de concentração escolhidos se aproximam de

100% (**Tabela 2.6**) corroborando com os dados do teste anterior, que o efeito matriz não é significativo [95].

Tabela 2.6: Valores relacionados aos testes de efeito matriz para as seis NAs avaliadas.

	N-Nitrosamina					
	NMEA	NPIR	NDEA	NPIP	NMOR	NDBA
Concentração (ng/mL)						
10	94,78	96,73	94,78	91,56	95,75	94,14
100	94,54	89,94	92,59	87,62	96,74	94,07
150	94,70	96,82	92,22	94,79	96,62	93,71
p-Valor	0,005	0,017	0,029	0,024	0,003	0,005

Os métodos tradicionais de análise de NAs em medicamentos, como o da FDA, apresentam valores de LD e LQ similares do que os apresentados aqui (**Tabela 3**). O método estipulado pela FDA de análise dessas moléculas em medicamentos sartana utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução apresentam LD de 0,05 - 0,32 ng/mL e LQ de 1 ng/mL para NAs utilizando o medicamento a 20 mg/mL [33]. Mesmo com tantas vantagens, o método se apresenta problemático visto o alto tempo de análise, em torno de 25 minutos desconsiderando o preparo de amostra, o que dificulta análises em larga escala.

Frente a isso, a técnica DART-MS possibilita o uso da matriz a 50 mg/mL sem extenso preparo de amostra e sem prejudicar a quantificação das NAs nos medicamentos, gerando uma resposta analítica rápida e eficaz (30 segundos). O método viabilizou os limites estipulados pela performance analítica aqui demonstrados e sem apresentar efeito matriz. Além disso, o método DART-MS atente a critérios da química verde por reduzir o uso de solventes orgânicos e geração de resíduos, além de apresentar a possibilidade da análise *in situ*, sem preparo de amostra e sem comprometer o espectrômetro de massas.

4.4 Quantificação de NAs em medicamentos por DART-MS

A quantificação das NAs em medicamentos por DART-MS procedeu utilizando as regressões construídas (**Tabela 2.4**). Assim, os analitos foram quantificados em medicamentos comerciais de losartana potássica, valsartana e nimesulida. Para tal, foi preparada a solução dos medicamentos na concentração de 50 mg/mL em metanol com adição de cafeína-(trimetil-¹³C) como padrão interno a 1,5 µg/mL. Posteriormente, 5 µL da solução do medicamento com PI foram depositados no cartão modelo QuickStrip™. A presença das NAs em medicamentos foi analisada em marcas diferentes desses medicamentos. Cada marca foi avaliada utilizando cinco comprimidos diferentes do medicamento de mesmo lote. Os resultados de quantificação estão dispostos na **Tabela 2.7**.

Tabela 2.7: Concentração encontrada experimentalmente de NAs por DART-MS para amostras reais de medicamentos (n=5)

Medicamento	Dose (mg)	NMEA		NPIR		NDEA		NPIP	
		ng/mg	DP	ng/mg	DP	ng/mg	DP	ng/mg	DP
LOSARTANA POTÁSSICA									
Marca 1	50	0,57	0,09	ND	-	0,64	0,01	0,19	0,01
Marca 2	100	0,84	0,10	0,22	0,12	0,06	0,02	0,14	0,01
Marca 3	50	2,06	0,14	0,10	0,03	ND	-	ND	-
Marca 4	100	0,60	0,08	0,55	0,13	0,34	0,01	0,04	0,00
Marca 5	50	ND	-	0,36	0,03	0,25	0,01	ND	0
Marca 6	100	ND	-	0,06	0,01	0,132	0,05	0,03	0,01
VALSARTANA									
Marca 1	320	2,19	0,05	1,69	0,08	0,76	0,10	ND	-
Marca 2	160	1,42	0,21	0,23	0,21	0,45	0,21	0,06	0,01
NIMESULIDA									
Marca 1	100	ND	-	ND	-	0,42	0,07	ND	-
Marca 2	100	ND	-	ND	-	0,62	0,21	ND	-

DP: Desvio padrão
ND: Não detectado

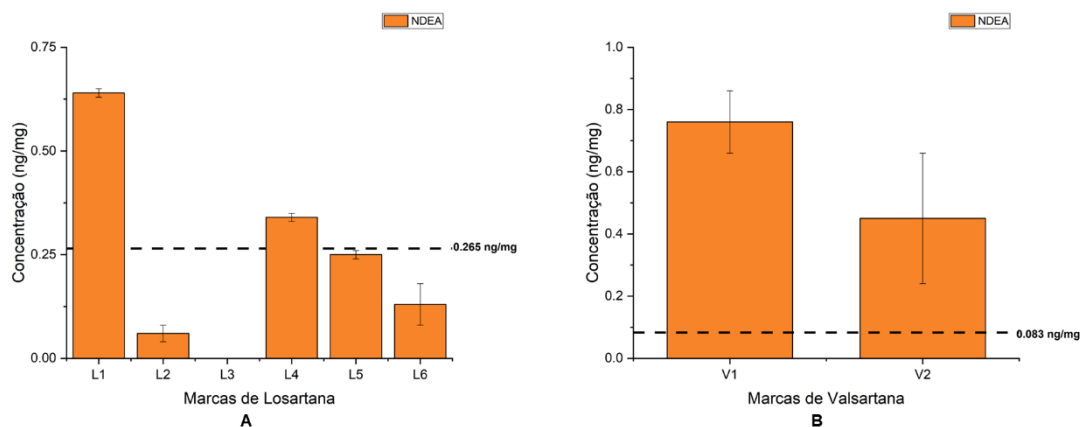
A **Tabela 2.7** apresenta a concentração da NDEA, NPIR, NDEA e NPIP encontradas em medicamentos comerciais para 1 mg do comprimido do medicamento de modo a ser comparados com limites aceitáveis estipulados pela ANVISA e pela FDA [5]. Tais limites foram estabelecidos em relação aos medicamentos sartana, considerando a dose diária do medicamento em relação ao potencial carcinogênico da N-nitrosamina. Esses dados estão dispostos na **Tabela 2.8** para a losartana e a valsartana.

Tabela 2.8: Limite tolerável de NPIR, NDEA e NPIP em medicamentos sartana

IFA	Dose Máxima (mg/dia)	NPIR		NDEA		NPIP	
		Dose tolerável (ng)	Limite (ng/mg)	Dose tolerável (ng)	Limite (ng/mg)	Dose tolerável (ng)	Limite (ng/mg)
Valsartana	320	1700	5,313	26,5	0,083	1300	4,063
Losartana	100		17,000		0,265		13,000

De tal modo, é possível verificar se os medicamentos sartana aqui avaliados por DART-MS estão dentro do esperado pela ANVISA. As seis marcas de losartana potássica avaliadas se encontram dentro do permitido na concentração de NPIP e NPIR, já em relação a concentração de NDEA, duas marcas se encontram acima do permitido (**Figura 2.11 A**).

Figura 2.11: Concentração de NDEA determinadas por DART-MS em relação ao limite estabelecido pela ANVISA: **A:** Marcas de losartana; **B:** Marcas de valsartana



*Barra de erros referente ao desvio padrão

Fonte: do autor

O mesmo ocorre nas duas marcas de valsartana avaliadas, estando dentro do permitido para NPIR e NPIP, mas demonstra concentração de NDEA superior ao esperado (**Figura 2.11 B**). A regulamentação da ANVISA ainda não disponibiliza esse limite tolerável para a NMEA.

No tocante aos medicamentos de nimesulida estudados, não há estudos que relatam a presença de NAs no medicamento e assim não há limites estipulados de NDEA no medicamento. Contudo, a concentração de NDEA encontrada em medicamentos comerciais de nimesulida é preocupante, uma vez que o medicamento representou cerca de 27% das vendas de anti-inflamatórios no Brasil em 2020 [123]. Até o momento, a presença das NAs nesse medicamento é negligenciada pelas agências reguladoras, como a ANVISA e a FDA.

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A técnica DART-MS já foi reportada pela literatura como adequada para análises diretas de compostos nível traço sem o preparo prévio da amostra, além de gerar respostas rápidas e sensíveis. A performance da técnica para a análise de N-nitrosaminas em medicamentos se mostrou aqui promissora por promover respostas rápidas e precisas.

A análise direta dos medicamentos por DART-MS foi adequada para a avaliação das NAs presentes nos medicamentos comerciais losartana potássica, valsartana e nimesulida. Foi possível avaliar a presença da NDMA, NDEA, NMOR, NPIP e NDBA mesmo em baixas concentrações.

A quantificação das NAs em medicamentos também se apresentou adequada. As figuras de mérito avaliadas no presente estudo se mostraram satisfatórias com os parâmetros preconizados pelas RDC N°166 e N°27 acerca da validação de métodos analíticos. Os valores de precisão e exatidão estão concordantes com os valores estipulados, além do método não apresentar efeito matriz significativo.

Por fim, também se considera que a técnica DART-MS mostrou vantagens quanto às técnicas convencionais uma vez que a resposta analítica é obtida rapidamente empregado um simples preparo de amostra para a quantificação e nenhum preparo de amostra na análise direta. Além do mais, o consumo de solventes orgânicos é minimizado quando comparado ao volume de solventes gastos em métodos cromatográficos. De tal modo, a técnica DART-MS se apresenta como uma técnica para determinação de NAs em medicamentos que se alinha com os princípios da química verde.

Assim a técnica DART-MS se consolida como uma técnica rápida e com menor custo quando comparada a técnicas convencionais de análise, além de ser ambientalmente sustentável por gerar menor quantidade de resíduos. De tal modo, espera-se que tal método possa abrir novos horizontes acerca da determinação de impurezas em medicamentos, contribuindo com o controle de qualidade e segurança de medicamentos amplamente utilizados pela população brasileira.

CONCLUSÃO GERAL

A ocorrência de NAs em medicamentos se tornou uma preocupação global nos últimos anos visto que essas moléculas apresentam alto potencial mutagênico. Com a necessidade de avaliar o teor e a presença de NAs em medicamentos, diversas técnicas já são reportadas na literatura, como técnicas clássicas de preparo de amostra seguida de análise por métodos cromatográficos acoplados a espectrometria de massas. Aqui, apresentamos novas abordagens para tal determinação.

Em um contexto mais amplo, ambas técnicas aqui apresentadas se mostraram satisfatórias e vantajosas na determinação de NAs em medicamentos. A abordagem DPX-LC-MS se destacou pela sua aplicação eficaz e econômica, superando métodos convencionais de preparo de amostra para análise de NAs em termos de rapidez e sustentabilidade ambiental, uma vez que é uma técnica miniaturizada que produz menor quantidade de resíduos, além de requerer baixo volume de solvente. A técnica DART-MS também se destacou por sua agilidade e sustentabilidade, além de demonstrar capacidade de realizar análises diretas nos comprimidos, avaliando NAs mesmo em nível traço direto na matriz. Ademais, a técnica DART-MS elimina a necessidade de preparo prévio da amostra, oferecendo respostas rápidas e precisas.

As duas técnicas mostraram conformidade com os requisitos estabelecidos pelas regulamentações vigentes, demonstrando precisão, exatidão e limites de detecção e quantificação adequados. Além disso, a aplicação dessas técnicas permitiu a determinação de NAs em medicamentos comerciais, colaborando para a segurança e controle de qualidade desses produtos.

REFERÊNCIAS

- [1] E. Yamamoto, H. Kan-no, N. Tomita, D. Ando, T. Miyazaki, K. Izutsu, Isolation of *N*-nitrosodimethylamine from drug substances using solid-phase extraction-liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J Pharm Biomed Anal* 210 (2022) 114561. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114561>.
- [2] B. Tuesuwan, V. Vongsutilers, Nitrosamine Contamination in Pharmaceuticals: Threat, Impact, and Control, *J Pharm Sci* 110 (2021) 3118–3128. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.04.021>.
- [3] C. Giménez-Campillo, M. Pastor-Belda, N. Campillo, M. Hernández-Córdoba, P. Viñas, Development of a new methodology for the determination of *N*-nitrosamines impurities in ranitidine pharmaceuticals using microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *Talanta* 223 (2021) 121659. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121659>.
- [4] Otto N. Witt, XXIII.—On aromatic nitrosamines, *Journal of the Chemical Society - Transactions* (1878) 202–211.
- [5] Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, Guia sobre o Controle de Nitrosaminas em Insumos Farmacêuticos Ativos e Medicamentos - Guia N°50/2021-Versão 3, 2023.
- [6] P N Magee, J M Barnes, The Production of Malignant Primary Hepatic Tumours in the Rat by Feeding Dimethylnitrosamine, *British Journal of Cancer* 10 (1956) 114–122.
- [7] Z. Chen, L. Yang, Y. Huang, P. Spencer, W. Zheng, Y. Zhou, S. Jiang, W. Ye, Y. Zheng, W. Qu, Carcinogenic risk of *N*-Nitrosamines in Shanghai Drinking Water: Indications for the Use of Ozone Pretreatment, *Environ Sci Technol* 53 (2019) 7007–7018. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b07363>.
- [8] K.L. Dobo, M.O. Kenyon, O. Dirat, M. Engel, A. Fleetwood, M. Martin, S. Mattano, A. Musso, J.C. McWilliams, A. Papanikolaou, P. Parris, J. Whritenour, S. Yu, A.S. Kalgutkar, Practical and Science-Based Strategy for Establishing Acceptable Intakes for Drug Product *N*-Nitrosamine Impurities, *Chem Res Toxicol* 35 (2022) 475–489. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.1c00369>.
- [9] S.H. Edwards, M.D. Hassink, K.M. Taylor, C.H. Watson, P. Kuklennyik, B. Kimbrell, L. Wang, P. Chen, L. Valentín-Blasini, Tobacco-Specific Nitrosamines in the Tobacco and Mainstream Smoke of Commercial Little Cigars, *Chem Res Toxicol* 34 (2021) 1034–1045. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.0c00367>.
- [10] P. Miralles, A. Chisvert, A. Salvador, Determination of *N*-nitrosamines in cosmetic products by vortex-assisted reversed-phase dispersive liquid–liquid microextraction and liquid chromatography with mass spectrometry, *J Sep Sci* 41 (2018) 3143–3151. <https://doi.org/10.1002/jssc.201800388>.
- [11] M.F. Kızılkaya, Z.F. Yılmaz Oral, S. Sallan, G. Kaban, M. Kaya, Volatile nitrosamines in a dry fermented sausage “sucuk”: Occurrence and effect of cooking on their formation, *Journal of Food Composition and Analysis* 119 (2023) 105284. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105284>.
- [12] E. Konstantinou, F. Fotopoulou, A. Drosos, N. Dimakopoulou, Z. Zagoriti, A. Niarchos, D. Makrynioti, D. Kouretas, K. Farsalinos, G. Lagoumintzis, K. Poulas, Tobacco-specific nitrosamines: A literature review, *Food and Chemical Toxicology* 118 (2018) 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.008>.
- [13] S.W. Krasner, W.A. Mitch, D.L. McCurry, D. Hanigan, P. Westerhoff, Formation, precursors, control, and occurrence of nitrosamines in drinking water: A review, *Water Res* 47 (2013) 4433–4450. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.04.050>.

- [14] T. Maqbool, J. Zhang, Q. Li, Y. Qin, L. Chen, Z. Zhang, Occurrence and fate of N-nitrosamines in three full-scale drinking water treatment systems with different treatment trains, *Science of The Total Environment* 783 (2021) 146982. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146982>.
- [15] L. Schettino, J.L. Benedé, A. Chisvert, Determination of nine prohibited N-nitrosamines in cosmetic products by vortex-assisted dispersive liquid–liquid microextraction prior to gas chromatography-mass spectrometry, *RSC Adv* 13 (2023) 2963–2971. <https://doi.org/10.1039/D2RA06553C>.
- [16] C. Sun, R. Wang, T. Wang, Q. Li, Primary evaluation of nine volatile N-nitrosamines in raw red meat from Tianjin, China, by HS-SPME-GC–MS, *Food Chem* 310 (2020) 125945. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125945>.
- [17] S. Sallan, G. Kaban, Ş. Şişik Oğraş, M. Çelik, M. Kaya, Nitrosamine formation in a semi-dry fermented sausage: Effects of nitrite, ascorbate and starter culture and role of cooking, *Meat Sci* 159 (2020) 107917. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107917>.
- [18] G.E. Johnson, K. Dobo, B. Gollapudi, J. Harvey, J. Kenny, M. Kenyon, A. Lynch, S. Minocherhomji, J. Nicolette, V. Thybaud, R. Wheeldon, A. Zeller, Permitted daily exposure limits for noteworthy N-nitrosamines, *Environ Mol Mutagen* 62 (2021) 293–305. <https://doi.org/10.1002/em.22446>.
- [19] J. Hu, T. Christison, J. Rohrer, Determination of dimethylamine and nitrite in pharmaceuticals by ion chromatography to assess the likelihood of nitrosamine formation, *Heliyon* 7 (2021) e06179. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06179>.
- [20] N. Golob, R. Grahek, M. Ross, R. Roškar, Nitrocellulose blister material as a source of N-nitrosamine contamination of pharmaceutical drug products, *Int J Pharm* 618 (2022) 121687. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121687>.
- [21] H. Akkaraju, R. Tatia, S.S. Mane, A.B. Khade, S.J. Dengale, A comprehensive review of sources of nitrosamine contamination of pharmaceutical substances and products, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 139 (2023) 105355. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2023.105355>.
- [22] European Medicines Agency - EMA, angiotensin-II-receptor antagonists (sartans) containing a tetrazole group, 2019.
- [23] Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017 - Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências., 2017.
- [24] S.A. Gold, V. Margulis, Carcinogenic Effects of Nitrosodimethylamine (NDMA) Contamination in Ranitidine: Defining the Relationship With Renal Malignancies, *JU Open Plus* 1 (2023). <https://doi.org/10.1097/JU9.0000000000000058>.
- [25] F.J. King, A.D. Searle, M.W. Urquhart, Ranitidine—Investigations into the Root Cause for the Presence of N-Nitroso- N , N -dimethylamine in Ranitidine Hydrochloride Drug Substances and Associated Drug Products, *Org Process Res Dev* 24 (2020) 2915–2926. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.0c00462>.
- [26] H.-H. Lim, Y.-S. Oh, H.-S. Shin, Determination of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosomethylethylamine in drug substances and products of sartans, metformin and ranitidine by precipitation and solid phase extraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry, *J Pharm Biomed Anal* 189 (2020) 113460. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113460>.
- [27] J. Zheng, A. Brookes, J. Moser, H. Pfeffer, A. Smith, On the Risk of Nitrosamine Contamination During Drug Product Blister Packaging, *J Pharm Sci* 112 (2023)

- 2321–2325. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2023.07.014>.
- [28] D. Boczar, E. Wyszomirska, B. Zabrzewska, A. Chyła, K. Michalska, Development and Validation of a Method for the Semi-Quantitative Determination of N-Nitrosamines in Active Pharmaceutical Ingredient Enalapril Maleate by Means of Derivatisation and Detection by HPLC with Fluorimetric Detector, *Applied Sciences* 11 (2021) 7590. <https://doi.org/10.3390/app11167590>.
- [29] J. Wohlfart, O. Scherf-Clavel, M. Kinzig, F. Sörgel, U. Holzgrabe, The nitrosamine contamination of drugs, part 3: Quantification of 4-Methyl-1-nitrosopiperazine in rifampicin capsules by LC-MS/HRMS, *J Pharm Biomed Anal* 203 (2021) 114205. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114205>.
- [30] European Medicines Agency (EMA), Lessons learnt from presence of N-nitrosamine impurities in sartan medicines, (2020).
- [31] INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH, ASSESSMENT AND CONTROL OF DNA REACTIVE (MUTAGENIC) IMPURITIES IN PHARMACEUTICALS TO LIMIT POTENTIAL CARCINOGENIC RISK, 2023.
- [32] Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 677, DE 28 DE ABRIL DE 2022 - Dispõe sobre avaliação de risco e controle de nitrosaminas potencialmente carcinogênicas em Insumos Farmacêuticos Ativos (IFA) e medicamentos de uso humano. , 2022.
- [33] U.S. Food and Drug Administration - FDA, Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS) Method for the Determination of Six Nitrosamine Impurities in ARB Drugs, 2019.
- [34] F. Malihi, T. Wang, An improved analytical method for quantitation of nitrosamine impurities in ophthalmic solutions using liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography Open* 2 (2022) 100037. <https://doi.org/10.1016/j.jcoa.2022.100037>.
- [35] S.-H. Chang, C.-C. Chang, L.-J. Wang, W.-C. Chen, S.-Y. Fan, C.-Z. Zang, Y.-H. Hsu, M.-C. Lin, S.-H. Tseng, D.-Y. Wang, A multi-analyte LC-MS/MS method for screening and quantification of nitrosamines in sartans, *J Food Drug Anal* 28 (2020) 292–301. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.1063>.
- [36] U.S. Food and Drug Administration - FDA, Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-High Resolution Mass Spectrometry (LC-ESI-HRMS) Method for the Determination of Nitrosamine Impurities in Metformin Drug Substance and Drug Product, 2020.
- [37] K.S.J. Tay, M.C. Breadmore, E.S. Soh, H.H. See, Development of dispersive inclusion complex microextraction for the analysis of nitrosamines in medicinal products, *J Chromatogr A* 1685 (2022) 463605. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463605>.
- [38] F. Luo, Y. Liu, Y. Xie, W. Hou, L. Zhang, Z. Zhang, Simultaneous determination of 13 nitrosamine impurities in biological medicines using salting-out liquid-liquid extraction coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J Pharm Biomed Anal* 218 (2022) 114867. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114867>.
- [39] N.K. Nagendla, H. Shaik, S. Bala Subrahanyam, D. Godugu, M.K. Reddy Mudiam, Development, validation, and estimation of measurement uncertainty for the quantitative determination of nitrosamines in Sartan drugs using liquid

- chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography Open* 2 (2022) 100053. <https://doi.org/10.1016/j.jcoa.2022.100053>.
- [40] S.-H. Chang, C.-C. Chang, L.-J. Wang, W.-C. Chen, S.-Y. Fan, C.-Z. Zang, Y.-H. Hsu, M.-C. Lin, S.-H. Tseng, D.-Y. Wang, A multi-analyte LC-MS/MS method for screening and quantification of nitrosamines in sartans, *J Food Drug Anal* 28 (2020) 292–301. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.1063>.
- [41] Y. Bian, Y. Zhang, Y. Zhou, G. Li, X. Feng, Progress in the pretreatment and analysis of N-nitrosamines: an update since 2010, *Crit Rev Food Sci Nutr* 61 (2021) 3626–3660. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1803790>.
- [42] D.M. Pavlović, S. Babić, A.J.M. Horvat, M. Kaštelan-Macan, Sample preparation in analysis of pharmaceuticals, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 26 (2007) 1062–1075. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.09.010>.
- [43] R.O. Martins, G.L. de Araújo, C.S. de Freitas, A.R. Silva, R.C. Simas, B.G. Vaz, A.R. Chaves, Miniaturized sample preparation techniques and ambient mass spectrometry as approaches for food residue analysis, *J Chromatogr A* 1640 (2021) 461949. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.461949>.
- [44] J. Soares da Silva Burato, D.A. Vargas Medina, A.L. de Toffoli, E. Vasconcelos Soares Maciel, F. Mauro Lanças, Recent advances and trends in miniaturized sample preparation techniques, *J Sep Sci* 43 (2020) 202–225. <https://doi.org/10.1002/jssc.201900776>.
- [45] M.J.M. Wells, Principles of Extraction and the Extraction of Semivolatile Organics from Liquids, in: *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*, Wiley, 2003: pp. 37–138. <https://doi.org/10.1002/0471457817.ch2>.
- [46] W. Jin, T. Zhou, G. Li, Recent advances of modern sample preparation techniques for traditional Chinese medicines, *J Chromatogr A* 1606 (2019) 460377. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460377>.
- [47] A. Chisvert, S. Cárdenas, R. Lucena, Dispersive micro-solid phase extraction, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 112 (2019) 226–233. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.12.005>.
- [48] E. Carasek, L. Morés, R.D. Huelsmann, Disposable pipette extraction: A critical review of concepts, applications, and directions, *Anal Chim Acta* 1192 (2022) 339383. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339383>.
- [49] G. Jiménez-Skrzypek, C. Ortega-Zamora, J. González-Sálamo, J. Hernández-Borges, Miniaturized green sample preparation approaches for pharmaceutical analysis, *J Pharm Biomed Anal* 207 (2022) 114405. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114405>.
- [50] F. Chemat, M. Abert-Vian, A.S. Fabiano-Tixier, J. Strube, L. Uhlenbrock, V. Gunjevic, G. Cravotto, Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 118 (2019) 248–263. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.037>.
- [51] D. Wianowska, M. Gil, M. Olszowy, Miniaturized methods of sample preparation, in: *Handbook on Miniaturization in Analytical Chemistry*, Elsevier, 2020: pp. 99–125. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819763-9.00005-2>.
- [52] A. Agrawal, R. Keçili, F. Ghorbani-Bidkorbeh, C.M. Hussain, Green miniaturized technologies in analytical and bioanalytical chemistry, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 143 (2021) 116383. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116383>.
- [53] F.C. Pinheiro, J.A. Nóbrega, An overview of sample preparation procedures for determination of elemental impurities in medicines, *Microchemical Journal* 175

- (2022) 107189. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107189>.
- [54] M.K. Parr, J.F. Joseph, NDMA impurity in valsartan and other pharmaceutical products: Analytical methods for the determination of N-nitrosamines, *J Pharm Biomed Anal* 164 (2019) 536–549. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.11.010>.
- [55] N.G. Pereira dos Santos, D.A.V. Medina, F.M. Lanças, Microextraction by packed sorbent of *N*- nitrosamines from Losartan tablets using a high-throughput robot platform followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J Sep Sci* 46 (2023). <https://doi.org/10.1002/jssc.202300214>.
- [56] T. Tome, N. Žigart, Z. Časar, A. Obreza, Development and Optimization of Liquid Chromatography Analytical Methods by Using AQbD Principles: Overview and Recent Advances, *Org Process Res Dev* 23 (2019) 1784–1802. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.9b00238>.
- [57] Ya.I. Yashin, A.Ya. Yashin, Liquid Chromatography, in: *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications*, Elsevier, 2012: pp. 285–310. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384862-8.00010-8>.
- [58] Types of Chromatography, in: *Selected Readings in Chromatography*, Elsevier, 1970: pp. 1–38a. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-015851-8.50004-6>.
- [59] S. Fekete, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, New trends in reversed-phase liquid chromatographic separations of therapeutic peptides and proteins: Theory and applications, *J Pharm Biomed Anal* 69 (2012) 9–27. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.03.024>.
- [60] J.L. Rafferty, L. Zhang, J.I. Siepmann, M.R. Schure, Retention Mechanism in Reversed-Phase Liquid Chromatography: A Molecular Perspective, *Anal Chem* 79 (2007) 6551–6558. <https://doi.org/10.1021/ac0705115>.
- [61] I. François, K. Sandra, P. Sandra, Comprehensive liquid chromatography: Fundamental aspects and practical considerations—A review, *Anal Chim Acta* 641 (2009) 14–31. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.03.041>.
- [62] N. Memon, T. Qureshi, M.I. Bhangar, M.I. Malik, Recent Trends in Fast Liquid Chromatography for Pharmaceutical Analysis, *Curr Anal Chem* 15 (2019) 349–372. <https://doi.org/10.2174/1573411014666180912125155>.
- [63] S. Fekete, I. Kohler, S. Rudaz, D. Guillarme, Importance of instrumentation for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis, *J Pharm Biomed Anal* 87 (2014) 105–119. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.03.012>.
- [64] C.G. de Koster, P.J. Schoenmakers, History of liquid chromatography—mass spectrometry couplings, in: *Hyphenations of Capillary Chromatography with Mass Spectrometry*, Elsevier, 2020: pp. 279–295. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809638-3.00007-7>.
- [65] V. D’Atri, S. Fekete, A. Clarke, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, Recent Advances in Chromatography for Pharmaceutical Analysis, *Anal Chem* 91 (2019) 210–239. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05026>.
- [66] A. El-Aneed, A. Cohen, J. Banoub, Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers, *Appl Spectrosc Rev* 44 (2009) 210–230. <https://doi.org/10.1080/05704920902717872>.
- [67] H. Awad, M.M. Khamis, A. El-Aneed, Mass Spectrometry, Review of the Basics: Ionization, *Appl Spectrosc Rev* 50 (2015) 158–175. <https://doi.org/10.1080/05704928.2014.954046>.
- [68] G.L. Glish, R.W. Vachet, The basics of mass spectrometry in the twenty-first century, *Nat Rev Drug Discov* 2 (2003) 140–150. <https://doi.org/10.1038/nrd1011>.
- [69] L. Lin, H. Lin, M. Zhang, X. Dong, X. Yin, C. Qu, J. Ni, Types, principle, and

- characteristics of tandem high-resolution mass spectrometry and its applications, *RSC Adv* 5 (2015) 107623–107636. <https://doi.org/10.1039/C5RA22856E>.
- [70] R. Javanshad, A.R. Venter, Ambient ionization mass spectrometry: real-time, proximal sample processing and ionization, *Analytical Methods* 9 (2017) 4896–4907. <https://doi.org/10.1039/C7AY00948H>.
- [71] C.L. Feider, A. Krieger, R.J. DeHoog, L.S. Eberlin, Ambient Ionization Mass Spectrometry: Recent Developments and Applications, *Anal Chem* 91 (2019) 4266–4290. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00807>.
- [72] A. Chaves, R. Martins, L. Maciel, A. Silva, D. Gondim, J. Fortalo, S. Santos, J. Roque, B. Vaz, Ambient Ionization Mass Spectrometry: Applications and New Trends for Environmental Matrices Analysis, *Brazilian Journal of Analytical Chemistry* (2022). <https://doi.org/10.30744/brjac.2179-3425.RV-123-2021>.
- [73] M. Khalikova, J. Jireš, O. Horáček, M. Douša, R. Kučera, L. Nováková, What is the role of current mass spectrometry in pharmaceutical analysis?, *Mass Spectrom Rev* (2023). <https://doi.org/10.1002/mas.21858>.
- [74] T.J. McDaniel, J.M. Holtz, E.H. Bondzie, M. Overfelt, P.W. Fedick, C.C. Mulligan, Rapid screening of high-priority *N*-nitrosamines in pharmaceutical, forensic, and environmental samples with paper spray ionization and filter cone spray ionization-mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 37 (2023). <https://doi.org/10.1002/rcm.9493>.
- [75] J.A. Linthorst, An overview: origins and development of green chemistry, *Found Chem* 12 (2010) 55–68. <https://doi.org/10.1007/s10698-009-9079-4>.
- [76] P. Anastas, N. Eghbali, Green Chemistry: Principles and Practice, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 301–312. <https://doi.org/10.1039/B918763B>.
- [77] S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia, Green Analytical Chemistry, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 27 (2008) 497–511. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.05.003>.
- [78] A. Gałuszka, Z. Migaszewski, J. Namieśnik, The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 50 (2013) 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.04.010>.
- [79] P.M. Nowak, R. Wietecha-Posłuszny, J. Pawliszyn, White Analytical Chemistry: An approach to reconcile the principles of Green Analytical Chemistry and functionality, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 138 (2021) 116223. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116223>.
- [80] M. Tobiszewski, Metrics for green analytical chemistry, *Analytical Methods* 8 (2016) 2993–2999. <https://doi.org/10.1039/C6AY00478D>.
- [81] A. Gałuszka, Z.M. Migaszewski, P. Konieczka, J. Namieśnik, Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 37 (2012) 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.03.013>.
- [82] Y. Pang, X. Chen, X. Li, H. Zhang, X. Jiang, F. Zhu, Y. Luo, Magnetic solid-phase extraction of tobacco-specific *N*-nitrosamines using magnetic graphene composite as sorbent, *J Sep Sci* 42 (2019) 3119–3125. <https://doi.org/10.1002/jssc.201900438>.
- [83] L.S. Machado, F.Q. Soares, R.O. Martins, R.A. Bernardo, A.T. Cardoso, M.A. Ruggiero, D. Rabelo, P.S. Souza, A.R. Chaves, Polypyrrole monolithic extraction phase: From conventional to miniaturized sample preparation techniques, *J Chromatogr A* 1651 (2021) 462260. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462260>.

- [84] A. Fernandes, P. de Souza, A. de Oliveira, A. Chaves, A New Method for the Determination of Creatinine in Urine Samples Based on Disposable Pipette Extraction, *J Braz Chem Soc* (2017). <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20170187>.
- [85] Benício Barros Neto, Ieda Spacino Scarminio, Roy Edward Bruns, *Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria*, 4th ed., Bookman, Porto Alegre, 2010.
- [86] Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, RESOLUÇÃO - RDC N° 27, DE 17 DE MAIO DE 2012 - Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos., 2012.
- [87] E. Yamamoto, H. Kan-no, N. Tomita, D. Ando, T. Miyazaki, K. Izutsu, Isolation of N-nitrosodimethylamine from drug substances using solid-phase extraction-liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J Pharm Biomed Anal* 210 (2022) 114561. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114561>.
- [88] Z. Li, J. Wang, X. Chen, S. Hu, T. Gong, Q. Xian, A novel molecularly imprinted polymer-solid phase extraction method coupled with high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of nitrosamines in water and beverage samples, *Food Chem* 292 (2019) 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.036>.
- [89] L. Padhye, P. Wang, T. Karanfil, C.-H. Huang, Unexpected Role of Activated Carbon in Promoting Transformation of Secondary Amines to *N*-Nitrosamines, *Environ Sci Technol* 44 (2010) 4161–4168. <https://doi.org/10.1021/es903916t>.
- [90] I.C. Gomes, R.O. Martins, L.S. Machado, A.T. Cardoso, P.S. de Souza, W.K.T. Coltro, P. de Tarso Garcia, A.R. Chaves, Molecularly imprinted polymer as sorbent phase for disposable pipette extraction: A potential approach for creatinine analysis in human urine samples, *J Pharm Biomed Anal* 211 (2022) 114625. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114625>.
- [91] N.C. Dias, C.F. Poole, Mechanistic study of the sorption properties of OASIS® HLB and its use in solid-phase extraction, *Chromatographia* 56 (2002) 269–275. <https://doi.org/10.1007/BF02491931>.
- [92] J.W. Munch, M.V. Bassett, METHOD 521: DETERMINATION OF NITROSAMINES IN DRINKING WATER BY SOLID PHASE EXTRACTION AND CAPILLARY COLUMN GAS CHROMATOGRAPHY WITH LARGE VOLUME INJECTION AND CHEMICAL IONIZATION TANDEM MASS SPECTROMETRY (MS/MS), U.S. Environmental Protection Agency (2005).
- [93] Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RESOLUÇÃO-RE N° 899, DE 29 DE MAIO DE 2003, 2003.
- [94] R. Costa, Newly Introduced Sample Preparation Techniques: Towards Miniaturization, *Crit Rev Anal Chem* 44 (2014) 299–310. <https://doi.org/10.1080/10408347.2013.860874>.
- [95] F. Raposo, D. Barceló, Challenges and strategies of matrix effects using chromatography-mass spectrometry: An overview from research versus regulatory viewpoints, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 134 (2021) 116068. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116068>.
- [96] A. Ishizaki, K. Ozawa, H. Kataoka, Simultaneous analysis of carcinogenic N-nitrosamine impurities in metformin tablets using on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J Chromatogr A* 1710 (2023) 464416. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464416>.

- [97] A.I. Olives, V. González-Ruiz, M.A. Martín, Sustainable and Eco-Friendly Alternatives for Liquid Chromatographic Analysis, *ACS Sustain Chem Eng* 5 (2017) 5618–5634. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b01012>.
- [98] Robert B. Cody, James A. Larameé, J. Michael Nilles, H. Dupont Durst, Direct Analysis in Real Time (DART) Mass Spectrometry, *Joel News* 40 (2005) 8–12.
- [99] E. Sisco, M.E. Staymates, T.P. Forbes, Optimization of confined direct analysis in real time mass spectrometry (DART-MS), *Analyst* 145 (2020) 2743–2750. <https://doi.org/10.1039/D0AN00031K>.
- [100] X. Wang, Q. Jiang, H. Li, D.D.Y. Chen, Rapid determination of chemical composition in the particulate matter of cigarette mainstream smoke, *Talanta* 217 (2020) 121060. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121060>.
- [101] Q. Jiang, D. Dai, H. Li, D.D.Y. Chen, Simultaneous determination of multiple components in cigarettes by mechanochemical extraction and direct analysis in real time mass spectrometry in minutes, *Anal Chim Acta* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.01.024>.
- [102] R.B. Cody, J.A. Laramée, H.D. Durst, Versatile New Ion Source for the Analysis of Materials in Open Air under Ambient Conditions, *Anal Chem* 77 (2005) 2297–2302. <https://doi.org/10.1021/ac050162j>.
- [103] E. Sisco, J. Dake, C. Bridge, Screening for trace explosives by AccuTOF™-DART®: An in-depth validation study, *Forensic Sci Int* 232 (2013) 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.07.006>.
- [104] M.J. Pavlovich, B. Musselman, A.B. Hall, Direct analysis in real time—Mass spectrometry (DART-MS) in forensic and security applications, *Mass Spectrom Rev* 37 (2018) 171–187. <https://doi.org/10.1002/mas.21509>.
- [105] J.H. Gross, Direct analysis in real time—a critical review on DART-MS, *Anal Bioanal Chem* 406 (2014) 63–80. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7316-0>.
- [106] J. Osorio, M. Aznar, C. Nerín, C. Elliott, O. Chevallier, Comparison of LC-ESI, DART, and ASAP for the analysis of oligomers migration from biopolymer food packaging materials in food (simulants), *Anal Bioanal Chem* 414 (2022) 1335–1345. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03755-0>.
- [107] X. Wang, Q. Jiang, H. Li, D.D.Y. Chen, Rapid determination of chemical composition in the particulate matter of cigarette mainstream smoke, *Talanta* 217 (2020) 121060. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121060>.
- [108] S. An, S. Liu, J. Cao, S. Lu, Nitrogen-Activated Oxidation in Nitrogen Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry (DART-MS) and Rapid Detection of Explosives Using Thermal Desorption DART-MS, *J Am Soc Mass Spectrom* 30 (2019) 2092–2100. <https://doi.org/10.1007/s13361-019-02279-3>.
- [109] E. Sisco, M.E. Staymates, T.P. Forbes, Optimization of confined direct analysis in real time mass spectrometry (DART-MS), *Analyst* 145 (2020) 2743–2750. <https://doi.org/10.1039/D0AN00031K>.
- [110] J. Hajslova, T. Cajka, L. Vaclavik, Challenging applications offered by direct analysis in real time (DART) in food-quality and safety analysis, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 30 (2011) 204–218. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.11.001>.
- [111] S. An, S. Liu, J. Cao, S. Lu, Nitrogen-Activated Oxidation in Nitrogen Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry (DART-MS) and Rapid Detection of Explosives Using Thermal Desorption DART-MS, *J Am Soc Mass Spectrom* 30 (2019) 2092–2100. <https://doi.org/10.1007/s13361-019-02279-3>.
- [112] S. Mathias, P. Sears, Direct analysis in real-time mass spectrometry: Observations of helium, nitrogen and argon as ionisation gas for the detection of

- small molecules using a single quadrupole instrument, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 37 (2023). <https://doi.org/10.1002/rcm.9521>.
- [113] L. Watt, E. Sisco, Detection of trace drugs of abuse in baby formula using solid-phase microextraction direct analysis in real-time mass spectrometry (SPME-DART-MS), *J Forensic Sci* 66 (2021) 172–178. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.14568>.
- [114] S.S. Bharate, Critical Analysis of Drug Product Recalls due to Nitrosamine Impurities, *J Med Chem* 64 (2021) 2923–2936. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c02120>.
- [115] J. Moser, I.W. Ashworth, L. Harris, M.C. Hillier, K.K. Nanda, G. Scrivens, N-Nitrosamine Formation in Pharmaceutical Solid Drug Products: Experimental Observations, *J Pharm Sci* 112 (2023) 1255–1267. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2023.01.027>.
- [116] J.A. Teixeira, A.B. Siqueira, Thermal and spectroscopic characterization, antioxidant evaluation and pyrolysis of losartan with some bivalent metals, *J Anal Appl Pyrolysis* 117 (2016) 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2015.12.023>.
- [117] A.P.C. Siqueira, E.Y. Ionashiro, G. Bannach, A.R. De Souza, N.H. Morgon, M.A. Soares, A.B. Siqueira, M.I.G. Leles, Spectroscopy and thermal studies of valsartan compounds with metals Mn(II), Fe(II), Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) in the solid state, *Thermochim Acta* 698 (2021) 178892. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2021.178892>.
- [118] A.A. M. Ahmed, A.M. Asran, M.A. Mohamed, Thermoanalytical and Kinetic Studies for the Thermal Stability of Nimesulide Under Different Heating Rates, *Oriental Journal Of Chemistry* 38 (2022) 343–347. <https://doi.org/10.13005/ojc/380215>.
- [119] F. Luo, Y. Liu, Y. Xie, W. Hou, L. Zhang, Z. Zhang, Simultaneous determination of 13 nitrosamine impurities in biological medicines using salting-out liquid-liquid extraction coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J Pharm Biomed Anal* 218 (2022) 114867. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114867>.
- [120] M. Catarro, J.L. Serrano, S.S. Ramos, S. Silvestre, P. Almeida, Nimesulide analogues: From anti-inflammatory to antitumor agents, *Bioorg Chem* 88 (2019) 102966. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.102966>.
- [121] H. Evard, A. Krueve, I. Leito, Tutorial on estimating the limit of detection using LC-MS analysis, part I: Theoretical review, *Anal Chim Acta* 942 (2016) 23–39. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.08.043>.
- [122] A.S. Tsagkaris, V. Hrbek, Z. Dzuman, J. Hajslova, Critical comparison of direct analysis in real time orbitrap mass spectrometry (DART-Orbitrap MS) towards liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) for mycotoxin detection in cereal matrices, *Food Control* 132 (2022) 108548. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108548>.
- [123] Elisângela de Andrade Aoyama, Fabricio Mendes Delmão, BEST SELLING NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS (NSAIDS) IN COMMUNITY PHARMACIES: LITERATURE REVIEW, *Revista Brasileira Interdisciplinar de Saúde* 3 (2021) 29–35.