



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Amanda Tavares Germano

**MÉTODO VERDE ISENTO DE SOLVENTES PARA TRIAGEM E QUANTIFICAÇÃO
DE *N*-NITROSAMINAS EM AMOSTRAS SÓLIDAS POR HS/SPME-GC/NPD:
APLICAÇÃO EM COMPRIMIDOS DE LOSARTANA**

Florianópolis

2026

Amanda Tavares Germano

**MÉTODO VERDE ISENTO DE SOLVENTES PARA TRIAGEM E QUANTIFICAÇÃO
DE *N*-NITROSAMINAS EM AMOSTRAS SÓLIDAS POR HS/SPME-GC/NPD:
APLICAÇÃO EM COMPRIMIDOS DE LOSARTANA**

Tese submetida ao Programa de Pós- graduação
em Química da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do título de doutora
em Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Vitali.

Florianópolis
2026

Ficha catalográfica gerada por meio de sistema automatizado gerenciado pela BU/UFSC.
Dados inseridos pelo próprio autor.

Germano, Amanda Tavares

Método verde isento de solventes para triagem e
quantificação de N-nitrosaminas em amostras sólidas por
HS/SPME-GC/NPD: Aplicação em comprimidos de losartana /
Amanda Tavares Germano ; orientador, Luciano Vitali, 2026.
122 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2026.

Inclui referências.

1. Química. 2. Cromatografia Gasosa. 3. Nitrosaminas. 4.
Microextração em fase sólida. 5. Fármacos. I. Vitali,
Luciano. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Amanda Tavares Germano

**MÉTODO VERDE ISENTO DE SOLVENTES PARA TRIAGEM E QUANTIFICAÇÃO
DE N-NITROSAMINAS EM AMOSTRAS SÓLIDAS POR HS/SPME-GC/NPD:
APLICAÇÃO EM COMPRIMIDOS DE LOSARTANA**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Edmar Martendal Dias de Souza
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

Prof. Dr. Giustino Tribuzi
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Dr. Daniel Lázaro Gallindo Borges
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora em Química com especialização em Química Analítica.



Documento assinado digitalmente

Adriana Passarella Gerola

Data: 26/01/2026 11:50:31-0300

CPF: ***.536.269-**

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química



Documento assinado digitalmente

LUCIANO VITALI

Data: 26/01/2026 09:25:57-0300

CPF: ***.529.060-**

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Orientador: Prof. Dr. Luciano Vitali

Florianópolis
2026

Dedico este trabalho ao meu querido sogro, Henrique Germano (*in memorian*), que seu sobrenome e sua fé em Deus transmitidas a mim pelo meu marido permaneçam sempre em mim até que eu o encontre nos céus com Jesus.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me deu a vida e tem me acompanhado nesse processo, me dando orientações no silêncio. Obrigada por me ensinar a te ouvir, seu direcionamento é perfeito como Você é, Pai.

Ao meu amado marido Carlos, que foi instrumento de Deus na minha vida, a cada exortação e consolo nessa etapa tão enriquecedora e também difícil. Por me incentivar a entrar na pesquisa, por me orientar emocionalmente frente a cada desafio, e por se casar comigo no primeiro ano do doutorado e se manter firme durante, e em nome de Jesus depois, até que a morte nos separe. Muito obrigada por ter passado por esta fase comigo!

À minha mãe Josanne, ao meu pai Tito, aos meus irmãos Henrique e Diogo, a minha sogra Marilene e a todos os demais membros da família e amigos por me apoiarem em todas as decisões, por me ensinarem muito, me ajudarem nos meus momentos difíceis, parabenizarem as conquistas advindas da tese e por trazerem leveza a vida.

Ao meu orientador e amigo Dr. Luciano Vitali, por me manter no rumo, não me deixando desviar nas distrações que apareciam e me dando oportunidades de crescimento fundamentais para meu aprimoramento profissional, o meu mais sincero obrigado. A confiança estabelecida neste momento com você, Professor, é muito valiosa para mim.

Ao Professor Dr. Gustavo Micke, com seu temperamento calmo me transmitia tranquilidade só ao estar presente num momento de dúvida. Seu conhecimento foi fundamental para que eu pudesse me desenvolver integralmente. Agradeço também a colaboração do professor através do suporte prestado pela parceria com a Farma Service Bioextract, a qual viabilizou várias análises.

À equipe do LABECC e amigos: Kheyti, Camila, Alysson, Samantha, Victor, Alan, André, Mayara, Carol, Felipe, Vinícius, Lizandra, Maira, Vitória, Fernanda, Riani, Ibraima, João, Maria, Maressa, Francisco. A todos os convites para comer um bolo, ou suporte nas demandas do laboratório, muito obrigada pelo carinho. Em especial ao Wilson, meu sobrinho científico, que me ensinou a ensinar.

À equipe da Central de Análises: Jucélia, Lais, Maurício, Nico, Eliane, Glauber, Paulo, Natália, Prof. Adailton, Prof. Valdir, Prof. Louis, Mariane. Obrigada a todos pelo convívio, e pelas trocas enriquecedoras.

Agradeço a todos os professores, servidores técnico administrativos e alunos que contribuíram de diversas formas para a minha formação e crescimento, em especial aos professores Eduardo Carasek da Rocha, Tatiane A. Maranhão, Hellen K. Stulzer, que foram membros da banca de qualificação e também ministrantes de disciplinas fundamentais para o tema de estudo. Sempre estiveram dispostos a colaborar com o trabalho. Muito obrigada!

Ao professor Edmar Martendal Dias de Souza, por ter aceitado ser relator e membro da banca, trazendo vários apontamentos enriquecedores ao trabalho, e aos professores Giustino Tribuzi e Daniel Lázaro Gallindo Borges, por aceitarem o convite para serem membros da banca na avaliação deste trabalho de tese final, agradeço muito as suas colaborações.

Agradeço à UFSC, ao Departamento de Química e ao Programa de Pós-graduação em Química, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao INCT-Catálise/FAPESC/CNPq/CAPES (FAPESC-2019TR0847, CNPq-444061/2018) pelo apoio financeiro e infraestrutura necessária para a execução de todo o trabalho.

“Esforça-te, e tem bom ânimo; não temas, nem te espantes; porque o Senhor teu Deus é contigo, por onde quer que andares.”

(Josué 1:9)

RESUMO

As *N*-nitrosaminas (NAs) são compostos carcinogênicos que podem estar presentes em produtos farmacêuticos, como a losartana potássica, a qual é consumida diariamente por pacientes para o controle da hipertensão. Este estudo propõe a análise direta de amostras sólidas de losartana potássica para a determinação de seis NAs, utilizando a microextração em fase sólida com *headspace* (HS/SPME) acoplada à cromatografia gasosa com detecção por nitrogênio-fósforo (GC/NPD), como método de triagem de baixo custo, aplicável a laboratórios de controle de qualidade. Considerando a análise direta de sólido, foi desenvolvido um material de referência da losartana potássica contendo as seis NAs (RM-LP-NA), e este material foi avaliado em termos de homogeneidade, estabilidade e teor para garantir a adequada presença dos analitos no sólido para os ensaios de otimização e validação do método analítico. A fibra de DVB/Car/PDMS foi selecionada para a extração dos analitos. Os parâmetros da HS/SPME foram otimizados para alcançar condições ideais de extração, incluindo a análise de 0,8 g de amostra com granulometria menor que 45 mesh, agitação da amostra sólida à 250 rpm, tempo de extração de 85 min e temperatura de extração de 45 °C. O método HS/SPME-GC/NPD foi validado, apresentando coeficientes de determinação superiores a 0,99 por meio de calibração por semelhança de matriz com diluição sólido-sólido do RM-LP-NA, limites de detecção variando de 0,0001 a 0,0157 mg kg⁻¹, recuperações entre 79,7 % e 122,0 %, e valores de precisão intra e inter-dia inferiores a 18,7 %. Os parâmetros de validação, como a boa seletividade e quantificação na faixa de µg kg⁻¹, demonstram a eficiência do método na identificação e quantificação desses compostos mutagênicos, em conformidade com as preocupações atuais das autoridades reguladoras farmacêuticas. A NDEA foi detectada em duas das treze amostras analisadas, sendo identificada e quantificada pelo método HS/SPME-GC/NPD, com confirmação pelo método HS/SPME-GC/MS. O caráter verde do método foi avaliado por meio do Analytical GREEnness calculator (AGREE), que confirmou sua conformidade com os princípios da Química Verde apresentando score de 0,64. Além disso, essa abordagem é aplicável a outras amostras sólidas, incluindo insumos farmacêuticos ativos puros e produtos farmacêuticos acabados.

Palavras-chave: *N*-nitrosaminas; Losartana; Química verde; Isento de solventes; Amostras farmacêuticas; Contaminantes; Cromatografia gasosa; Microextração em fase sólida; Detecção por nitrogênio-fósforo.

ABSTRACT

N-nitrosamines (NAs) are carcinogenic compounds that may be present in pharmaceutical products such as losartan potassium, which is consumed daily by patients for hypertension control. This study proposes the direct analysis of solid losartan potassium samples for the determination of six NAs, using headspace solid-phase microextraction (HS/SPME) coupled to gas chromatography with nitrogen–phosphorus detection (GC/NPD), as a low-cost screening method applicable to quality control laboratories. For the direct solid analysis, a reference material of losartan potassium containing the six NAs (RM-LP-NA) was developed and evaluated in terms of homogeneity, stability and content to ensure the appropriate presence of analytes in the solid matrix for method optimization and validation assays. The DVB/Car/PDMS fiber was selected for analyte extraction. HS/SPME parameters were optimized to achieve ideal extraction conditions, including the analysis of 0.8 g of sample with a particle size smaller than 45 mesh, agitation of the solid sample at 250 rpm, an extraction time of 85 min, and an extraction temperature of 45 °C. The HS/SPME-GC/NPD method was validated, yielding determination coefficients above 0.99 through matrix-matched calibration with solid–solid dilution of RM- LP-NA, limits of detection ranging from 0.0001 to 0.0157 mg kg⁻¹, recoveries between 79.7% and 122.0 %, and intra- and inter-day precision values below 18.7 %. Validation parameters, such as high selectivity and quantification within the µg kg⁻¹ range, demonstrate the efficiency of the method for the reliable identification and quantification of these mutagenic compounds, in line with current concerns of pharmaceutical regulatory authorities. NDEA was detected in two of the thirteen samples analyzed, being identified and quantified by the HS/SPME-GC/NPD method and confirmed by HS/SPME-GC/MS. The greenness of the method was assessed using the Analytical GREEnness calculator (AGREE), which confirmed its compliance with the principles of Green Chemistry, presenting a score of 0.64. Moreover, this approach is applicable to other solid samples, including pure active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products.

Keywords: *N*-nitrosamines; Losartan; Green chemistry; Solvent-free; Pharmaceutical samples; Contaminants; Gas chromatography; Solid-phase microextraction; Nitrogen- phosphorus detection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura básica das NAs	22
Figura 2: Via de biotransformação metabólica das NAs e a subsequente formação de adutos de DNA que levam a carcinogênese	23
Figura 3: Formação de NAs por nitrosação com ácido nitroso obtido a partir do nitrito de sódio em meio ácido. (A) Ativação do nitrito para formação do íon nitrosônio	26
Figura 4. Exemplos de combinações críticas que podem levar a formação de NAs	27
Figura 5: Estrutura da losartana. Anel tetrazólico circulado em vermelho.....	29
Figura 6: Cromatograma da solução padrão de seis NAs pela injeção direta de 1 µL (1 mg L ⁻¹ em metanol) no GC/NPD. Os analitos e os seus respectivos tempos de retenção são: 1 - NDMA (3,0 min), 2 - NMEA (3,6 min), 3 - NDEA (4,4 min), 4 - NDPA (6,6 min), 5 – NPIP (7,3 min) e 6 - NDBA (9,0 min). Os dados foram adquiridos com o software <i>ChemStation</i> [®]	66
Figura 7: Cromatograma (SIM) do padrão das seis NAs pela injeção direta de 1 µL (10 mg L ⁻¹ em metanol) no GC/MS. Os analitos, os seus respectivos canais de monitoramento (m/z) para quantificação e os tempos de retenção são: 1 - NDMA (m/z 74, 2,8 min), 2 - NMEA (m/z 88, 3,5 min), 3 - NDEA (m/z 102, 4,2 min), 4 - NDPA (m/z 130, 6,6 min), 5 - NPIP (m/z 114, 7,2 min) e 6 - NDBA (m/z 158, 9,0 min). Os dados foram adquiridos com o software <i>MSD ChemStation</i> [®]	68
Figura 8: Respostas obtidas das seis NAs em triplicata de três amostragens aleatórias do material RM-LP-NA para avaliação da homogeneidade dos analitos dispersos no sólido. Condições da análise: 0,8g do RM-LP-NA sem diluição, 250 rpm, 35 °C, extração com fibra de DVB/Car/PDMS por 30 min e análise no GC/NPD. A barra de erros está expressa como desvio padrão relativo das medidas (RSD, %, n = 9)	70
Figura 9. Gráfico de estabilidade das seis NAs presentes no RM-LP-NA, incluindo 4 dias investigados e análise em quadruplicata do material. Condições da análise: 0,8 g do RM-LP-NA sem diluição, 250 rpm, 35 °C, extração com fibra de DVB/Car/PDMS por 30 min e análise pelo método HS/SPME-GC/NPD. A barra de erros expressa o desvio padrão relativo das medidas (RSD, %, n = 4).....	72

Figura 10: Cromatograma das NAs presentes no RM-LP-NA pelo método USP adaptado empregando LC-ESI-MS/MS. Os analitos, o tempo de eluição e as m/z das transições de íons precursor-para-produto (Q1 → Q3) investigados são: (a) NDMA (2,18 min, m/z 75,0/43,0), b) NMEA (8,67 min, m/z 89,0/43,1), c) NDEA (9,95 min, m/z 103,0/57,1), d) NDPA (8,68 min, m/z 131,0/43,1), e) NPIP (7,50 min, m/z 115,0/69,1), f) NDBA (9,95 min, m/z 158,8/40,7).....74

Figura 11: Curvas de calibração por adição padrão (n = 3) em diferentes concentrações, variando de 13,34 a 131,13 mg NA kg⁻¹ IFA⁻¹, foram preparadas para as seis NAs presentes no RM-LP-NA por LC-ESI-MS/MS. Para NDMA, NMEA, NDEA e NDBA os valores de resposta foram multiplicados por 10 para melhorar a visualização dos dados.....75

Figura 12: Áreas normalizadas das seis NAs (NDMA, NMEA, NDEA, NDPA, NPIP e NDBA) para cada fibra de extração (DVB/Car/PDMS, PDMS/DVB, PA, PDMS). As condições de extração por HS/SPME foram 0,80 g do RM-LP-NA, agitação de 250 rpm por 30 min à 35 °C.....79

Figura 13: Correlação média geométrica das áreas normalizadas das seis NAs (NDMA, NMEA, NDEA, NDPA, NPIP e NDBA) para cada quantidade diferente de comprimidos (2, 4, 6, 8, 10, equivalente a 0,40, 0,80, 1,20, 1,60 e 2,00 g do RM-LP-NA) durante a extração por HS/SPME, à 35 °C, com a agitação de 250 rpm por 30 min, empregando a fibra DVB/Car/PDMS.....81

Figura 14. Superfícies de resposta obtidas a partir do planejamento composto central para o método de HS/SPME-GC/NPD. Foi adicionado 0,8g RM-LP-NA para avaliar as variáveis agitação (167 a 333 rpm), temperatura (20 a 60 °C) e tempo de extração (30 a 120 min) com a fibra DVB/Car/PDMS. Legenda: a) Tempo de extração (min) e temperatura de extração (°C), b) Tempo de extração (min) e agitação (rpm), e c) Temperatura de extração (°C) e agitação (rpm).....83

Figura 15: Comparação entre cromatogramas do RM-LP-NA na concentração das NAs de 0,056 mg kg⁻¹ e amostra isenta de NAs (branco). As extrações foram realizadas utilizando o método otimizado HS/SPME-GC/NPD. Os analitos e seus respectivos tempos de retenção são: 1 - NDMA (3,0 min), 2 - NMEA (3,66 min), 3 - NDEA (4,4 min), 4 - NDPA (6,7 min), 5 - NPIP (7,7 min) e 6 - NDBA (9,0 min). Os dados foram adquiridos utilizando o software *ChemStation*[®] 86

Figura 16: Comparação entre cromatogramas (SIM) do RM-LP-NA com a concentração das NAs de 0,078 mg kg⁻¹ e amostra isenta de NAs (branco). As extrações foram realizadas empregando o método otimizado HS/SPME-GC/MS. Os analitos, canais de massa (m/z) para quantificação e tempos de retenção são: a) NDMA (m/z 74, 2,8 min); b) NMEA (m/z 88, 3,5 min); c) NDEA (m/z 102, 4,2 min); d) NDPA (m/z 130, 6,6 min); e) NPIP (m/z 114, 7,2 min) e f) NDBA (m/z 158, 9,0 min). Os dados foram adquiridos utilizando o software *MSD ChemStation*[®] 87

Figura 17. Cromatograma das amostras positivas para NDEA empregando o método HS/SPME-GC/NPD. a) NDEA (4,4 min) na amostra F8, b) NDEA (4,4 min) na amostra F12. A amostra fortificada está representada pelo RM-LP-NA diluído para a concentração de 0,056 mg kg⁻¹ de NDEA, e a amostra em branco é a amostra sólida de comprimido de losartana sem NAs. Os dados foram adquiridos pelo software *ChemStation*[®] 93

Figura 18: Cromatograma GC/MS (SIM) das amostras positivas com NDEA confirmadas utilizando o método otimizado e validado HS/SPME-GC/MS. a) NDEA (m/z 102, 4,2 min) na amostra F8, b) NDEA (m/z 102, 4,2 min) na amostra F12. A amostra RM-LP-NA é a amostra diluída para 0,078 mg kg⁻¹ de NDEA, e a amostra em branco é a amostra sólida de comprimido de losartana sem adição de NAs. Os dados foram adquiridos utilizando o software MSD *ChemStation*[®] 94

Figura 19: Resultado da avaliação do caráter verde do método HS/SPME-GC/NPD empregando a calculadora AGREE para a determinação de seis NAs em comprimidos de losartana. As variáveis de 1 a 12 representam os princípios GAC. A escala de cores vermelho–amarelo–verde indica o grau de sustentabilidade do método, onde o valor 1, representado pelo verde escuro, corresponde a um procedimento mais sustentável, e o valor 0, representado pelo vermelho, indica um procedimento menos sustentável.....96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela com a estrutura de seis NAs potencialmente cancerígenas e suas propriedades físico-químicas.....	24
Tabela 2: Limites de aceitação para NAs em medicamentos de losartana potássica	33
Tabela 3: Metodologias analíticas empregadas pelas agências reguladoras internacionais para extração e determinação de NAs em diferentes fármacos.....	35
Tabela 4: Metodologias analíticas para determinação de NAs em medicamentos encontradas na literatura	38
Tabela 5: Metodologias de determinação de NAs em diferentes matrizes empregando HS/SPME	46
Tabela 6: Parâmetros do espectrômetro de massas para a determinação de seis NAs na amostra sólida RM-LP-NA, sendo a m/z da transição de íons precursor-para-produto (Q1→Q3) para o Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM), tempo de retenção (min), Potencial de Desagregação (DP), Potencial de Entrada (EP), Potencial de Energia de Colisão (CEP), Energia de Colisão (CE) e Potencial de Saída da Célula de Colisão (CXP).....	55
Tabela 7: Canais de massa selecionados (m/z) para íons qualificadores e quantificadores, e tempos de retenção para as seis NAs analisadas no sistema GC/MS.....	56
Tabela 8: Variáveis e seus níveis para investigação para o Planejamento composto central na extração das NAs via método HS/SPME-GC/NPD.....	62
Tabela 9: Planejamento composto central codificado para a extração das NAs via método HS/SPME-GC/NPD.	63
Tabela 10: Resultados da determinação de seis NAs no RM-LP-NA utilizando o método adaptado do Capítulo Geral 1469 da USP (n=3).	76
Tabela 11: Figuras de mérito para o método adaptado do Procedimento 3 do Capítulo Geral <1469> da USP para a determinação de seis NAs no RM-LP-NA por LC-ESI-MS/MS.....	77
Tabela 12: Figuras de mérito para o método HS/SPME-GC/NPD para a determinação de seis NAs em amostras de comprimidos de losartana.....	88
Tabela 13: Figuras de mérito para o método HS/SPME-GC/MS para a determinação de seis NAs em amostras de comprimidos de losartana	89
Tabela 14: Dados experimentais das NAs em comprimidos de losartana analisados utilizando o método HS/SPME-GC/NPD para triagem e quantificação	92
Tabela 15: Comparação do método proposto com outros métodos reportados para determinação de NAs em produtos farmacêuticos.	99

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

AGREE	do inglês <i>Analytical GREEnness Metric Approach</i>
ANOVA	Análise de variância, do inglês <i>Analysis of variance</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Associação Internacional Oficial dos Químicos Analíticos, do inglês <i>Association of Official Analytical Chemists International</i>
ARBs	Bloqueadores do receptor de angiotensina II, do inglês <i>Angiotensin II receptor blockers</i>
DB5-MS	Coluna cromatográfica composta por 5%-fenil- metilpolissiloxano
DVB	Divinilbenzeno
DVB/Car/PDMS	Divinilbenzeno/Carboxen/Polidimetilsiloxano
EMA	Agência Europeia de Medicamentos, do inglês <i>European Medicines Agency</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Administração Federal de Alimentos e Medicamentos, do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
FE-SHS	Análise pelo <i>headspace</i> estático com evaporação total, do inglês <i>Full Evaporation Static Headspace</i>
GAC	Química analítica verde, do inglês <i>Green Analytical Chemistry</i>
GC	Cromatografia Gasosa, do inglês <i>Gas Chromatography</i>
GC/MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, do inglês <i>Gas Chromatography Mass Spectrometry</i>
GC/MS/MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em tandem, do inglês <i>Gas Chromatography Mass Spectrometry/Mass Spectrometry</i>
GC/NPD	Cromatografia gasosa acoplada ao detector de nitrogênio-fósforo, do inglês <i>Gas Chromatography coupled to Nitrogen-Phosphorus Detector</i>
HS	do inglês <i>headspace</i>
HS/SPME-GC/MS	Método de análise hifenado com o preparo de amostra HS/SPME e instrumentação GC/MS
HS/SPME-GC/NPD	Método de análise hifenado com o preparo de amostra HS/SPME e instrumentação GC/NPD
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, do inglês <i>International Agency for Research on Cancer</i>
IAD	Ingestão Aceitável Diária
ICH	Conselho Internacional para a Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos de Uso Humano, do inglês <i>The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human use</i>

ICH Q2 (R2)	Guia de validação de procedimentos analíticos desenvolvido pelo ICH.
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
ISO	Organização Internacional de Padronização, do inglês <i>International Organization for Standardization</i>
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem, do inglês <i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry/Mass Spectrometry</i>
LC-ESI-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem com ionização por electrospray, do inglês <i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry/Mass Spectrometry with Electrospray Ionization</i>
LD	Limite de detecção
LLE	Extração líquido-líquido, do inglês <i>Liquid-Liquid Extraction</i>
LQ	Limite de quantificação
MS	Espectrômetro de massas, do inglês <i>Mass Spectrometer</i>
MS/MS	Espectrômetro de massas em tandem, do inglês <i>Mass Spectrometry/Mass Spectrometry</i>
NA	N-nitrosamina
NDBA	N-nitrosodibutilamina
NDCHA	N-nitrosodiciclohexilamina
NDEA	N-nitrosodietilamina
NDIBA	N-nitrosodiisobutilamina
NDINA	N-nitrosodiisononilamina
NDIPA	N-nitrosodiisopropilamina
NDMA	N-nitrosodimetilamina
NDPA	N-nitrosodipropilamina
NDPhA	N-nitrosodifenilamina
NEIPA	N-nitrosoetilisopropilamina
NIST	Biblioteca com dados de espectros de massas, do inglês <i>National Institute of Standards and Technology</i>
NMBA	Ácido N-Nitroso-N-metil-4-amino-butírico
NMEA	N-nitrosometiletilamina
NMOR	N-nitrosomorfolina
NPD	Detector de nitrogênio-fósforo, do inglês <i>Nitrogen-Phosphorus Detector</i>
PA	Poliacrilato
PDMS	Polidimetilsiloxano
PDMS/Car	Polidimetilsiloxano/Carboxen
PDMS/DVB	Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA
RM-LP-NA	Material de Referência do comprimido de losartana potássica

	contendo seis <i>N</i> -nitrosaminas (NDMA, NDBA, NDPA, NMEA, NDEA, NPIP), do inglês <i>Reference Material of losartan potassium with six N-Nitrosamines</i>
RR	Recuperação relativa (%)
RSD	Desvio padrão relativo (%), do inglês <i>Relative Standard Deviation</i>
SAR	Refere-se à relação entre a (sub)estrutura molecular de um composto e sua atividade mutagênica usando Relações Estrutura-Atividade (Quantitativas) derivadas de dados experimentais.
SF-HS	Análise do <i>headspace</i> livre de solvente, do inglês <i>Solvent Free Headspace</i>
SF/HS-GC/MS	Método de análise hifenado com o preparo de amostra por injeção direta do <i>headspace</i> (HS) livre de solvente em Cromatógrafo gasoso acoplado à espectrometria de massas em tandem.
SLE	Extração sólido-líquido, do inglês <i>Solid-Liquid Extraction</i>
SPE	Extração em fase sólida, do inglês <i>Solid Phase Extraction</i>
SPME	Microextração em fase sólida, do inglês <i>Solid Phase Microextraction</i>
TD50	Taxa de dose crônica em mg/kg de peso corporal/dia, que causaria tumores em metade dos animais no final de uma vida útil padrão para a espécie, levando em consideração a frequência desse tipo de tumor nos animais de controle.
U.S. FDA	Administração Federal de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos da América, do inglês <i>United States Food and Drug Administration</i>
USP	Farmacopeia dos Estados Unidos da América, do inglês <i>United States Pharmacopeia</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 N-nitrosaminas	22
2.2 Formação de N-nitrosaminas em medicamentos.....	25
2.2.1 Losartana potássica.....	28
2.3 Ações regulatórias frente às N-nitrosaminas em medicamentos.....	30
2.4 Metodologias de análise de N-nitrosaminas em medicamentos.....	34
2.4.1 Preparo de amostra.....	42
2.4.1.1 Microextração em fase sólida aplicada a análise direta de sólidos.....	43
3 OBJETIVOS	52
3.1 Objetivos Gerais.....	52
3.2 Objetivos Específicos.....	52
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
4.1 Padrões e Materiais	53
4.2 Instrumentação e condições cromatográficas	53
4.2.1 LC-ESI-MS/MS	53
4.2.2 GC/NPD	55
4.2.3 GC/MS	56
4.3 Material de referência de losartana potássica contendo seis NAs (RM-LP-NA).....	57
4.3.1 Obtenção do material de referência (RM-LP-NA).....	57
4.3.2 Caracterização do material.....	58
4.3.2.1 Homogeneidade.....	58
4.3.2.2 Estabilidade.....	59
4.3.2.3 Identificação e determinação do teor das seis NAs	59
4.4 Otimização do preparo de amostra HS/SPME	60
4.4.1 Seleção da fibra.....	61
4.4.2 Quantidade de amostra.....	61
4.4.3 Seleção da agitação, temperatura e tempo de extração	62
4.4.4 Preparo de amostra HS/SPME otimizado	63
4.5 Validação dos métodos HS/SPME-GC/NPD e HS/SPME-GC/MS.....	64
4.6 Amostras comerciais para análise	65
4.7 Caráter verde do método HS/SPME-GC/NPD.....	65

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
5.1 Separação cromatográfica das seis <i>N</i>-nitrosaminas no GC/NPD e GC/MS	66
5.2 Caracterização do material de referencia (RM-LP-NA)	69
5.2.1 Homogeneidade do RM-LP-NA.....	69
5.2.2 Estabilidade do RM-LP-NA	71
5.2.3 Identificação e determinação do teor de NAs no RM-LP-NA por LC/MS/MS.....	73
5.3 Otimização dos parâmetros do preparo de amostra HS/SPME	78
5.3.1 Seleção da fibra de extração	78
5.3.2 Seleção da quantidade de amostra	80
5.3.3 Seleção da agitação, temperatura e tempo de extração	82
5.4 Validação dos métodos HS/SPME-GC/NPD e HS/SPME-GC/MS	85
5.5 Análise de amostras comerciais de losartana.....	91
5.6 Avaliação do caráter verde do método HS/SPME-GC/NPD	96
5.7 Comparação dos métodos com trabalhos da literatura.....	98
 6. CONCLUSÃO	102
7. PERSPECTIVAS	103
8. REFERÊNCIAS	104
ANEXO A.....	114
ANEXO B.....	116
APÊNDICE.....	118

1. INTRODUÇÃO

As *N*-nitrosaminas (NAs) têm sido amplamente investigadas em fármacos de uso contínuo, como as sartanas, empregadas para o tratamento de pressão alta (EMA, 2018a; EMA, 2019a; Manchuri *et al.*, 2024). Estas NAs são compostos potencialmente cancerígenos encontrados como contaminantes em processos de fabricação, e isso gera preocupações significativas entre as agências reguladoras mundiais (Wichitnithad *et al.*, 2023).

A losartana potássica, da classe das sartanas, primeiro grupo de medicamentos a sinalizar a presença deste contaminante, é comumente prescrita para o tratamento da hipertensão e está entre os medicamentos anti-hipertensivos mais usados para o manejo de condições prevalentes, como hipertensão e insuficiência cardíaca congestiva. O fato desse medicamento ser normalmente administrado em uso contínuo, muitas vezes durante toda a vida do paciente, implica na preocupação em se consumir um contaminante carcinogênico diariamente (Byrd *et al.*, 2019; Lemke *et al.*, 2013).

Cerca de 1,28 bilhão de pessoas sofrem de hipertensão no mundo segundo a Organização Mundial da saúde (WHO, 2025). Devido a isso, as agências reguladoras emitiram alertas para o monitoramento de compostos carcinogênicos como as NAs nos medicamentos das empresas farmacêuticas, e com isso estas devem realizar testes confirmatórios em múltiplos lotes se houver suspeita de presença de NAs; Locke *et al.*, 1997; Manchuri *et al.*, 2024). Isso pode ser observado em um evento ocorrido em 2022, quando houve o recolhimento do medicamento losartana potássica em março e junho nas farmácias do Brasil, devido à possível presença deste contaminante nos lotes distribuídos pelas empresas farmacêuticas (R7, 2022; O Globo; 2022).

Como as NAs apresentam potencial carcinogênico e podem estar presentes nos Insumos Farmacêuticos Ativos (IFA) utilizados na fabricação dos medicamentos, bem como nos produtos acabados, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) vigorou a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 677/2022, que impõe a necessidade de investigação destes contaminantes em todo o portfólio de produtos das empresas fabricantes, distribuidoras e fracionadoras de insumos farmacêuticos e empresas fabricantes e importadoras de medicamentos. Para isso, as empresas precisarão realizar a avaliação de risco de todos os produtos do portfólio da empresa, seguido da realização dos testes confirmatórios para refutar ou não a presença das NAs empregando métodos analíticos validados (ANVISA, 2024).

Dados os limites baixos aceitáveis para NAs nos medicamentos, os métodos analíticos que

investigam estas NAs precisam ser altamente sensíveis, seletivos e precisos (Manchuri *et al.*, 2024). As metodologias analíticas internacionais, disponibilizadas pelas Agência Europeia de Medicamentos (EMA, do inglês *European Medicines Agency*), Administração Federal de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos da América (U.S FDA, do inglês *United States Food and Drug Administration*) e Agência Canadense de Saúde (*Health Canada*), além das farmacopeias estrangeiras, são focadas no uso de equipamentos robustos, porém com preparos de amostra clássicos como extração líquido-líquido e extração sólido-líquido (EDQM, 2021). Em geral, essas técnicas empregam solventes orgânicos tóxicos, dificultando o tratamento de resíduos estando em desacordo com os preceitos da Química Verde. Além disso, técnicas baseadas em cromatografia acoplada à espectrometria de massas (MS) são amplamente utilizadas, embora seu alto custo possa ser restritivo para análise rotineira em laboratórios de menor porte (Manchuri *et al.*, 2024; Golob *et al.*, 2022; Grebel *et al.*, 2007).

Abordagens recentes têm sido exploradas para enfrentar os desafios na análise de NAs (Zheng *et al.*, 2022; Giménez-Campillo *et al.*, 2021, Novotny *et al.*, 2023, Lee *et al.*, 2021, Alshehri *et al.*, 2020, Chang *et al.*, 2022) como a melhoria da análise por *headspace* (HS) reduzindo o consumo de solventes (Lee *et al.*, 2021; Zheng *et al.*, 2022) e técnicas baseadas em microextração, incluindo a Microextração em Fase Sólida pelo modo *Headspace* (HS/SPME, do inglês *Headspace Solid-Phase Microextraction*) (Alshehri *et al.*, 2020; Chang *et al.*, 2022).

Neste sentido, se vê a possibilidade de explorar novas alternativas de preparo de amostras, que possuam características mais verdes, incluindo solventes menos tóxicos ou a ausência desses, para haver um alinhamento com os princípios da química verde, dentre os quais as técnicas sem solvente têm ganhado atenção (Anastas e Eghbali, 2010). Com isso, há um potencial para explorar novas alternativas mais ecológicas de preparo de amostras, como remoção de solventes e análise direta de sólidos, bem como uma extração mais eficiente de NAs por meio das características de pré-concentração da técnica SPME.

A técnica SPME integra a extração, isolamento e enriquecimento dos analitos em uma única etapa (Pawliszyn, 1990) e pode melhorar o enriquecimento de NAs na análise, minimizando a injeção de interferentes da amostra no equipamento, prevenindo assim o desgaste do sistema cromatográfico durante a análise (Wichitnithad *et al.*, 2021; Yamamoto *et al.*, 2022; Chang *et al.*, 2022).

Somado a um preparo de amostra eficiente, a Cromatografia Gasosa com Detector de Fósforo-Nitrogênio (GC/NPD, do inglês *Gas Chromatography coupled to Nitrogen-Phosphorus Detector*) pode oferecer uma alternativa mais acessível e econômica, com estudos anteriores demonstrando sua eficácia na detecção de NAs em baixas concentrações, e com isso atender os baixos limites definidos pelas agências reguladoras (Grebel *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2022).

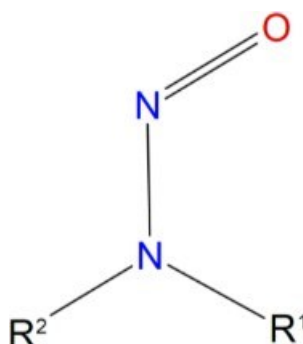
Neste estudo, foi desenvolvida uma nova metodologia denominada HS/SPME- GC/NPD, na qual combina-se a alta capacidade de extração da técnica de preparação de amostras HS/SPME com a sensibilidade instrumental e o baixo custo da GC/NPD para a análise de seis NAs em treze amostras de comprimidos de losartana potássica produzidas e comercializadas no Brasil. A metodologia analítica envolve a análise direta de uma amostra sólida sem o emprego de solventes, analisada diretamente utilizando HS/SPME. A metodologia proposta foi otimizada e validada, e o caráter verde foi avaliado de acordo com o calculadora AGREE (do inglês *Analytical GREENness Metric Approach*). O mesmo preparo de amostra otimizado foi acoplado a um sistema de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC/MS, do inglês *Gas Chromatography Mass Spectrometry*), sendo validado e empregado como método complementar para confirmar a identidade das NAs presentes em amostras comerciais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *N*-nitrosaminas

As *N*-nitrosaminas (NAs) são compostos orgânicos *N*-nitrosos alifáticos ou aromáticos que contêm R_2N-NO como estrutura básica (Figura 1), contendo um grupo funcional nitroso ligado a um átomo de nitrogênio. As propriedades físico-químicas dependem dos grupos funcionais ligados ao átomo de nitrogênio, sendo que as NAs podem se encontrar nas formas sólida, líquida ou gasosa. (Thresher *et al.*, 2020, Wichitnithad *et al.*, 2023; Parr *et al.*, 2019)

Figura 1. Estrutura básica das NAs.



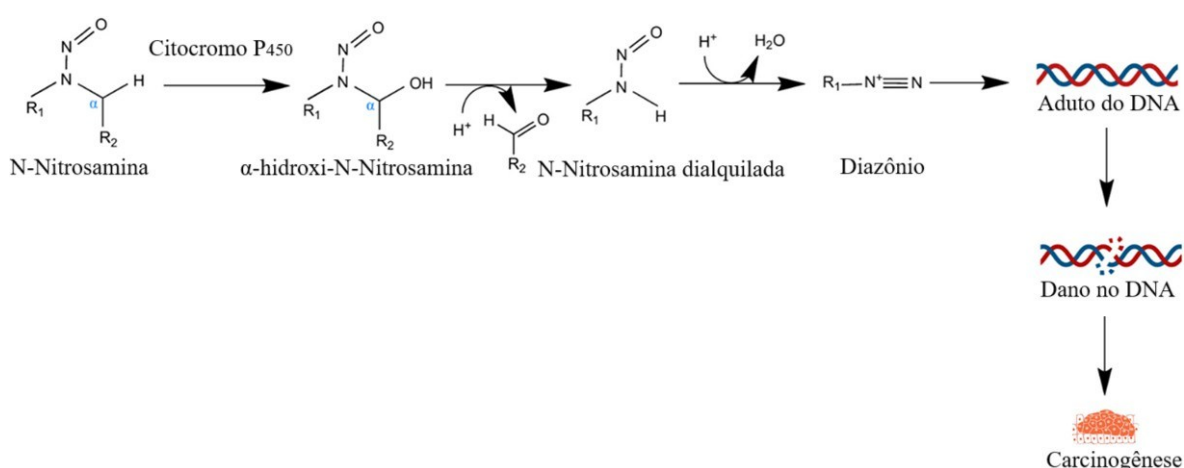
Fonte: ANVISA (2024).

As NAs são uma classe de compostos aos quais os seres humanos são comumente expostos em pequenas doses através do tabaco e produtos alimentícios, como os embutidos (Thresher *et al.*, 2020). Porém, as NAs são substâncias altamente tóxicas, e que mesmo em níveis residuais, já provaram causar carcinogênese e mutagênese em humanos, levando assim a uma série de doenças, como cânceres de esôfago, colorretal e gástrico (Lu *et al.*, 2017). Por causa disso, a exposição acima de níveis aceitáveis e por longo período pode aumentar o risco de câncer (Horne *et al.*, 2023). Tendo em vista o risco associado à ingestão de compostos com tais propriedades, o setor farmacêutico sinalizou a necessidade de investigações destes compostos como contaminantes em medicamentos, e uma série de ações regulatórias tem sido tomadas no Brasil e no mundo para controlar e mitigar a formação destes compostos, buscando preservar a saúde do consumidor. (ANVISA, 2024).

As NAs foram classificadas em quatro grupos com base em seu potencial carcinogênico pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, do inglês *International Agency for Research on Cancer*) da Organização Mundial da Saúde. Os compostos do Grupo 2A, por exemplo, *N*-nitrosodimetilamina (NDMA) e a *N*-nitrosodietilamina (NDEA), são provavelmente carcinogênicos para humanos, com evidências limitadas em humanos, mas suficientes em animais (Wichitnithad *et al.*, 2023).

Do ponto de vista toxicológico (Figura 2), as NAs são reconhecidamente carcinogênicas em diversas espécies animais, apresentando também mutagenicidade e genotoxicidade significativas (Wichitnithad *et al.*, 2023). Esses efeitos estão intrinsecamente associados ao seu mecanismo de bioativação, predominantemente mediado por enzimas microsossomais do citocromo P450 (Parr *et al.*, 2019). O processo mais frequente é a α -hidroxilação no carbono adjacente ao nitrogênio, que leva à formação de intermediários instáveis capazes de se decompor em espécies altamente reativas, como íons alquildiazônio. Esses, por sua vez, atuam como agentes alquilantes potentes, reagindo com nucleófilos celulares, em especial o DNA (Ácido Desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic Acid*), resultando na formação de adutos como O⁶-metilguanina e O⁶-etilguanina, que comprometem a fidelidade da replicação e desencadeiam mutações pontuais e instabilidade genômica (Zhang *et al.*, 2025).

Figura 2. Via de biotransformação metabólica das NAs e a subsequente formação de adutos de DNA que levam a carcinogênese.

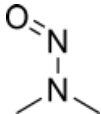
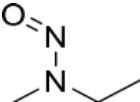
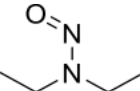
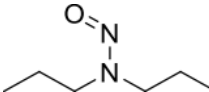
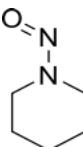
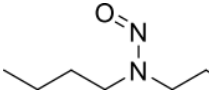


Fonte: Adaptado de Zhang *et al.* (2025).

Embora o fígado seja o principal órgão-alvo devido à elevada atividade metabólica e ao efeito de primeira passagem, diferentes NAs apresentam perfis de distribuição e

carcinogenicidade distintos (Li *et al.*, 2021; Wichitnithad *et al.*, 2023; Parr *et al.*, 2019). A NDMA é uma das mais estudadas e encontra-se consistentemente associada ao desenvolvimento de câncer de fígado em modelos experimentais e em avaliações de risco regulatórias (Li *et al.*, 2021). De forma semelhante, a NDEA também apresenta relação clara com carcinogenicidade hepática, sendo reportada em estudos de risco comparativos (Li *et al.*, 2021; Wichitnithad *et al.*, 2023). A *N*-nitrosodibutilamina (NDBA), avaliada por Parr *et al.*, (2019), mostrou-se associada a tumores de fígado, pulmão e estômago em estudos animais. Já entre as NAs heterocíclicas, a *N*-nitrosopiperidina (NPIP) é destacada por Li *et al.*, (2021) e Wichitnithad *et al.*, (2023) como agente capaz de induzir tumores no fígado, pulmão e bexiga. Assim, ainda que o fígado seja o alvo predominante, observa-se que a carcinogenicidade pode se estender a outros órgãos, variando conforme a estrutura da nitrosamina (Tabela 1) e o seu metabolismo no organismo.

Tabela 1. Tabela com a estrutura de seis NAs potencialmente cancerígenas e suas propriedades físico-químicas.

Nitrosamina	Estrutura	Massa molar (g mol ⁻¹)	Log P (o/w) à 25°C ^a	Ponto de Ebulição (°C)	Pressão de vapor à 25 °C (Torr)
NDMA		74,08	-0,496	151	4,56
NMEA		88,11	0,014	163	4,10
NDEA		102,14	0,523	177	1,66
NDPA		130,19	1,542	206	0,348
NPIP		114,15	0,438	219	0,103
NDBA		158,24	2,561	237	0,0341

NDMA - *N*-nitrosodimetilamina

NMEA - *N*-nitrosometiletilamina

NDEA - *N*-nitrosodietilamina

NDPA - *N*-nitrosodipropilamina

NPIP - *N*-nitrosopiperidina

NDBA - *N*-nitrosodibutilamina

Fonte: Adaptado de Kruhlak *et al.* (2024) e CAS (2025).

Mesmo em concentrações muito baixas, na faixa de microgramas por quilograma de peso corporal, as NAs podem resultar na formação de adutos de DNA detectáveis, evidenciando o alto potencial de risco. Além da carcinogênese, as NAs podem provocar efeitos tóxicos agudos, como necrose centrolobular hepática. (Wichitnithad *et al.*, 2023; ANVISA, 2024).

As NAs integram um grupo de compostos considerados altamente preocupantes do ponto de vista toxicológico, classificados como pertencentes ao "*Cohort of Concern*", um grupo de espécies com grande potencial carcinogênico. Isso significa que mesmo em níveis muito baixos sua presença já representa risco inaceitável à saúde, principalmente devido ao reconhecido potencial carcinogênico e mutagênico. Diversos estudos demonstraram que compostos como NDMA e NDEA são potentes indutores de tumores em diferentes espécies animais, com boa correlação entre a mutagenicidade *in vitro* e a carcinogenicidade observada *in vivo* (López-Rodríguez *et al.*, 2020).

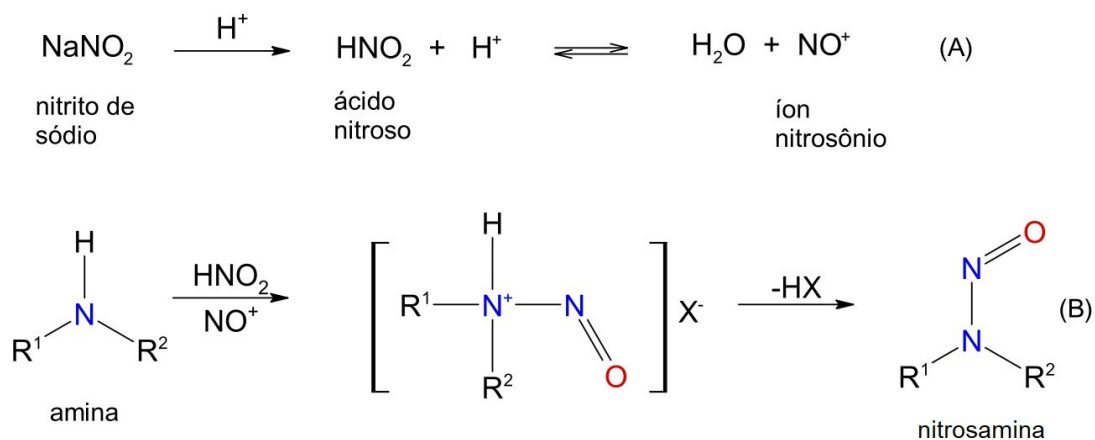
2.2 Formação de *N*-nitrosaminas em medicamentos

A detecção de NAs em medicamentos desencadeou uma das maiores crises regulatórias recentes na indústria farmacêutica. Esses compostos, reconhecidos por seu potencial carcinogênico e mutagênico, passaram a ser identificados em diferentes classes terapêuticas a partir de 2018, quando lotes de sartanas foram recolhidos globalmente (Zhang *et al.*, 2025).

A formação de NAs nos medicamentos está diretamente associada à reação entre aminas, especialmente secundárias, e agentes nitrosantes derivados de nitrito (López-Rodríguez *et al.*, 2020). A problemática pode ocorrer do próprio processo de fabricação, já que a síntese de IFAs e a formulação de medicamentos envolvem etapas suscetíveis à formação de NAs. Reagentes contendo nitrito de sódio (NaNO_2), solventes e catalisadores amínicos, podem gerar aminas secundárias ou terciárias que, em condições favoráveis, sofrem reações de nitrosação (Batista Junior *et al.*, 2025; Ashworth *et al.*, 2020). Também se reconhece a água de processo como fonte crítica de nitrito, ainda que em níveis traço, capaz de contribuir para a formação de NAs em meio ácido (Suresh-Kumar *et al.*, 2024). Além da síntese, etapas posteriores como armazenamento e interação com materiais de embalagem podem favorecer a degradação e a formação dessas impurezas (Gan *et al.*, 2026). Essa multiplicidade de pontos críticos evidencia que a presença de NAs em medicamentos não é um evento isolado, mas um risco sistêmico, exigindo avaliação prospectiva de risco e monitoramento contínuo em toda a cadeia produtiva.

A presença de nitrito nos processos farmacêuticos é considerada a principal causa da formação de NAs. Esse ânion, quando em meio ácido, gera o ácido nitroso, que se decompõe originando o íon nitrosônio (NO^+), um potente agente eletrofílico capaz de reagir com aminas secundárias e terciárias para formar NAs (Batista Junior *et al.*, 2025). A reação de nitrosação é favorecida em condições de baixa alcalinidade, na presença de aminas residuais oriundas de reagentes, solventes ou catalisadores utilizados na síntese dos IFAs. Em relação a essas possíveis ocorrências no processo produtivo dos IFA, dos produtos acabados e de sua armazenagem, um exemplo geral de formação de NAs pode ser a partir de aminas e agentes nitrosantes (NO_x) sob certas condições de reação. Na Figura 3 (A) demonstra-se a geração do íon nitrosônio, através da formação do ácido nitroso, obtido através do nitrito de sódio em meio ácido. Estas espécies causam a nitrosação de aminas secundárias, podendo assim formar as NAs, como visto na Figura 3 (B) (ANVISA, 2024).

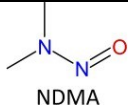
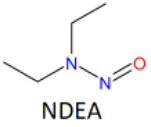
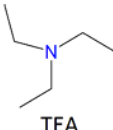
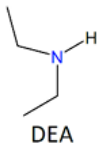
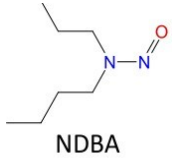
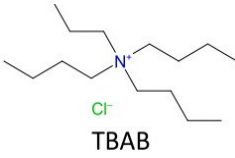
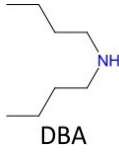
Figura 3. Formação de NAs por nitrosação com ácido nitroso obtido a partir do nitrito de sódio em meio ácido. (A) Ativação do nitrito para formação do íon nitrosônio.



Fonte: ANVISA (2024).

Considerando-se a formação geral das NAs, na Figura 4 estão dispostas algumas condições que favorecem a formação de NAs encontradas nos fármacos.

Figura 4. Exemplos de combinações críticas que podem levar a formação de NAs.

<i>N</i> -nitrosamina formada	Fonte de NO _x	Fonte da amina	Amina Nitrosada
 NDMA	NaNO ₂	 DMF	 DMA
 NDEA	NaNO ₂	 TEA	 DEA
 NDBA	NaNO ₂	 TBAB	 DBA

Fonte: Adaptado de ANVISA (2024).

Considerando-se o nitrito de sódio como agente nitrosante, as fontes de aminas são variáveis, incluindo solventes como dimetilformamida (DMF) que, ocorrendo sua hidrólise ácida ou básica, pode gerar também a dimetilamina (DMA). Esses componentes presentes na síntese dos fármacos podem levar à formação da NDMA, a principal NA encontrada nos fármacos. Catalisadores como brometo de tetrabutilamônio (TBAB) ou trietilamina (TEA) podem sofrer desalquilação nitrosativa com nitrito de sódio em meio ácido formando NAs, como a NDBA e a NDEA, respectivamente (ANVISA, 2024).

Embora inicialmente a contaminação por NAs tenha sido atribuída apenas à etapa de síntese dos IFAs, estudos recentes apontam que a formação dessas impurezas também pode ocorrer diretamente em formas farmacêuticas sólidas durante o armazenamento. Moser *et al.* (2023) demonstraram que, mesmo na ausência de etapas reacionais clássicas, a presença simultânea de traços de nitrito e aminas residuais ou provenientes de excipientes pode desencadear a reação de nitrosação em comprimidos e pós. Esse fenômeno é potencializado por fatores ambientais, como umidade relativa, temperatura e exposição a materiais de embalagem, que podem liberar precursores amínicos. Assim, a geração de NAs em sólidos não decorre apenas do processo de fabricação, mas também de mecanismos de degradação *in situ*, ampliando significativamente os pontos críticos de controle na cadeia produtiva. A identificação desse risco evidencia a necessidade de estratégias de mitigação que considerem não apenas a síntese, mas

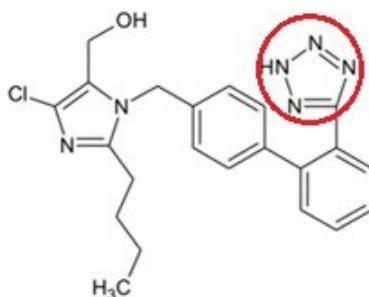
também as condições de formulação, armazenamento e embalagem dos medicamentos (Gan *et al.*, 2026; Zhang *et al.*, 2025). Portanto, a determinação direta das NAs no medicamento final representa uma abordagem relevante para assegurar a qualidade e a segurança do paciente.

2.2.1 Losartana potássica

Cerca de 1,28 bilhão de pessoas sofrem de hipertensão no mundo, segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2025). As sartanas estão entre os agentes anti- hipertensivos mais prescritos para o tratamento de doenças de alta prevalência, como a hipertensão arterial e a insuficiência cardíaca congestiva, sendo geralmente administradas diariamente e por toda a vida do paciente (Lemke *et al.*, 2013). Esses fármacos, comercializados para uso oral, atuam bloqueando os receptores de angiotensina II, promovendo vasodilatação e consequente redução da pressão arterial, além de prevenir complicações cardiovasculares associadas (Roche *et al.*, 2019).

A losartana potássica (Figura 5), pertencente à classe das sartanas, foi um dos primeiros medicamentos a sinalizar a preocupação com a presença de NAs e permanece entre os anti- hipertensivos mais utilizados mundialmente (Byrd *et al.*, 2019). Administrada normalmente em doses de 50 a 100 mg/dia, seu uso contínuo implica em exposição prolongada a possíveis impurezas carcinogênicas, motivo pelo qual a segurança desse fármaco tem sido objeto de crescente atenção regulatória.

Figura 5. Estrutura da losartana, com o anel tetrazólico circulado em vermelho.



Fonte: Adaptado de Wichitnithad *et al.* (2023).

Um aspecto central da farmacologia das sartanas é a presença do anel tetrazólico, que funciona como bioisóstero do grupo carboxílico, conferindo maior estabilidade metabólica, lipofilicidade e biodisponibilidade oral. Além disso, o anel tetrazol favorece interações não covalentes com o receptor AT1 da angiotensina II, aumentando a eficácia do bloqueio (Myznikov *et al.*, 2007; Zou *et al.*, 2020). Embora seja determinante para a atividade terapêutica do fármaco, sua síntese está diretamente associada ao risco de formação de impurezas indesejadas. O tetrazol é geralmente obtido por meio da reação de nitrilas com azidas, sendo a azida de sódio (NaN_3) o reagente mais empregado. O excesso de azida não reagida é tradicionalmente eliminado por nitrito de sódio em meio ácido, o que gera ácido nitroso como subproduto. Nessa etapa crítica, a presença de aminas secundárias ou terciárias residuais pode levar à formação de NAs, impurezas classificadas pela IARC como carcinogênicas ou provavelmente carcinogênicas para humanos (Wichitnithad *et al.*, 2023; EMA, 2019b).

De fato, desde 2018 foram relatados diversos casos de contaminação por NAs em sartanas tetrazólicas, incluindo NDMA, NDEA, Ácido *N*-nitroso-*N*-metil-4-amino-butírico (NMBA), *N*-nitrosodiisopropilamina (NDIPA) e *N*-nitrosoetilisopropilamina (NEIPA), que motivaram alertas globais e recolhimentos em diferentes países (Byrd *et al.*, 2019; Wichitnithad *et al.*, 2023). Enquanto sartanas não tetrazólicas, como telmisartana e eprosartana, apresentaram menor risco, os derivados com o heteroanel, como losartana, valsartana e irbesartana, mostraram-se particularmente vulneráveis devido à etapa sintética de formação do tetrazol. (Wichitnithad *et al.*, 2023).

Além do risco associado ao processo de síntese, condições de formulação, armazenamento e embalagem dos medicamentos também são etapas críticas para a possível formação de NAs (Gan *et al.*, 2026; Zhang *et al.*, 2025). Com isso, evidencia-se a necessidade de estratégias

investigativas de mitigação que considerem não apenas a síntese, mas também inclusive a possível formação de NAs no produto acabado (Moser *et al.*, 2023).

Diante desse cenário, as agências reguladoras (EMA, FDA, ANVISA, entre outras) exigem das indústrias farmacêuticas a implementação de testes confirmatórios em múltiplos lotes e a revisão de rotas sintéticas. Esse contexto reforça a relevância da investigação e monitoramento das NAs na losartana, visto que o próprio grupo funcional responsável pela eficácia terapêutica, o anel tetrazólico, é também a principal origem do risco de contaminação durante a síntese industrial, além de outras possíveis causas de formação de NAs paralelas durante todo o processo produtivo do medicamento losartana potássica (EMA, 2019b; Wichitnithad *et al.*, 2023).

2.3 Ações regulatórias frente às *N*-nitrosaminas em medicamentos

Desde 2018, ocorreram sucessivos eventos no setor farmacêutico mundial envolvendo a presença de NAs como impurezas em determinados medicamentos. Várias autoridades regulatórias, como a U.S. FDA, nos Estados Unidos da América (EUA), a EMA, na Europa, e a ANVISA, no Brasil, vêm monitorando essas impurezas e estabelecendo limites máximos permitidos com base no nível de toxicidade desses compostos.

As NAs foram inicialmente observadas em medicamentos bloqueadores do receptor de angiotensina II (ARBs, do inglês *Angiotensin II receptor blockers*), conhecidos como sartanas, amplamente utilizados no tratamento da hipertensão arterial e da insuficiência cardíaca (EMA, 2018a). Em julho de 2018, a U.S. FDA e a EMA anunciaram o recolhimento de comprimidos de valsartana devido à contaminação por NDMA (EMA, 2018b; U.S. FDA, 2018a). Em outubro do mesmo ano, o recolhimento foi expandido para outros medicamentos do grupo das sartanas, como irbesartana e losartana, conforme informado pela U.S. FDA (U.S. FDA, 2018b).

Posteriormente, impurezas de NAs foram detectadas em outros medicamentos, levando a um grande esforço conjunto entre reguladores e a indústria para reduzir ou eliminar sua presença no fornecimento farmacêutico. Órgãos reguladores de diversos países confirmaram a presença de NAs em medicamentos como ranitidina, nizatidina e metformina, principalmente na forma de NDMA (U.S. FDA, 2018b; EMA, 2018a, 2019a, 2019b).

No Brasil, a repercussão relativa às NAs resultou não apenas em recolhimentos e medidas preventivas, mas também na publicação da RDC nº 283, em maio de 2019. Esse regulamento tratou da investigação, controle e eliminação de NAs potencialmente carcinogênicas em ARBs,

por terem sido os primeiros medicamentos a apresentar tais impurezas (ANVISA, 2019).

Inicialmente, a RDC nº 283/2019 determinava a fiscalização obrigatória em sartanas, incluindo a investigação da presença das impurezas NDEA, NDMA, NDIPA, NMBA e NEIPA, as quais já haviam sido relatadas em medicamentos dessa classe pelas agências internacionais. Contudo, três dessas NAs (NDMA, NDEA e NMBA) foram responsáveis pela maior parte dos casos de recolhimento em losartana, enquanto NDIPA e NEIPA apresentaram evidências insuficientes (WICHITNITHAD *et al.*, 2021).

Em setembro de 2020, a ANVISA lançou o programa de monitoramento de NAs, com o objetivo de aprofundar as investigações sobre a presença dessas impurezas em IFAs e medicamentos (ANVISA, 2020a). Nesse mesmo período, após a detecção da NDMA, a Agência suspendeu a importação, o uso e a comercialização da ranitidina fabricada por uma indústria localizada na Índia (ANVISA, 2020b).

Em outubro de 2020, a ANVISA publicou em seu site oficial uma nota sobre o recolhimento de lotes específicos de medicamentos à base de sartanas. Além do recolhimento, as ações incluíram a suspensão da fabricação, importação, distribuição, comercialização e uso de IFAs com suspeita de contaminação. No total, foram efetuadas 14 suspensões envolvendo três insumos (losartana, valsartana e irbesartana) de dez fabricantes internacionais (ANVISA, 2020c). Esses eventos reforçam a importância de se monitorar tais impurezas e compreender as consequências de sua presença em determinados fármacos.

Em 2021, a U.S. FDA publicou o guia “*Control of N-nitrosamine Impurities in Human Drugs*” (U.S. FDA, 2021). Paralelamente, e considerando os acontecimentos internacionais, a ANVISA lançou em junho de 2021 a primeira versão do Guia sobre o Controle de NAs em IFAs e medicamentos, que esteve aberto a contribuições da comunidade farmacêutica até setembro do mesmo ano (ANVISA, 2021b).

Diante da evolução dos acontecimentos, novas atualizações regulatórias foram implementadas, como a publicação da RDC nº 494, em abril de 2021, que alterou a RDC nº 283/2019 e estabeleceu a data limite de 31 de dezembro de 2021 para a eliminação de determinadas NAs em IFAs da classe das sartanas. Esse cenário evidencia a urgência das análises e a importância de se desenvolver metodologias cada vez mais eficientes (ANVISA, 2019; 2021a). De acordo com a Seção II da RDC nº 283/2019, sempre que houver possibilidade de contaminação por NAs específicas, as empresas farmacêuticas ficam obrigadas a adotar metodologias validadas e incluir ensaios de quantificação dessas impurezas no controle de qualidade do IFA das sartanas (ANVISA, 2019).

Entretanto, a RDC nº 283/2019 foi revogada com a entrada, e em vigor atualmente, em 1º de junho de 2022, da nova resolução, a RDC nº 677, publicada em abril de 2022, que ampliou a investigação para todos os produtos dos portfólios das empresas quanto à presença de NAs (ANVISA, 2022). Essa alteração ocorreu após novas descobertas indicarem a formação de NAs não apenas em decorrência do processo produtivo das sartanas, mas também em outros medicamentos passíveis de degradação, bem como em reações promovidas por excipientes e embalagens (Horne *et al.*, 2023).

Posteriormente, considerando as contribuições da comunidade farmacêutica, em 3 de maio de 2022 entrou em vigor a segunda versão do Guia sobre o Controle de *N*-nitrosaminas em Insumos Farmacêuticos Ativos e Medicamentos. Mais tarde, em junho de 2023, foi publicada a terceira versão, e, em 31 de julho de 2024, a ANVISA divulgou a 4ª versão do documento, vigente até o momento. Esse Guia expressa o entendimento da Agência acerca das melhores práticas relacionadas a procedimentos, rotinas e métodos considerados adequados para o cumprimento dos requisitos técnicos e administrativos estabelecidos pelo marco legislativo e regulatório (ANVISA, 2023; ANVISA, 2024).

Em consonância com a RDC nº 677/2022, o Guia orienta as empresas no gerenciamento dos riscos associados às NAs presentes nos medicamentos. Ele estabelece três etapas principais de abordagem: (I) a avaliação de risco, que considera a rota de síntese do IFA, o processo produtivo do produto acabado e a possível formação de NAs durante todo o prazo de validade; (II) a aplicação de métodos analíticos sensíveis, quando identificada a presença dessas impurezas, para quantificação em níveis adequados. Nessa etapa, considera-se a ausência de risco quando as concentrações estiverem abaixo de 10% do limite de ingestão aceitável. (III) Caso os níveis ultrapassem o limite estabelecido, a empresa deve adotar ações de mitigação de risco e comunicar a ANVISA, caracterizando a terceira etapa do processo (ANVISA, 2024).

Conforme preconizado pela ANVISA, as características dos IFAs são inicialmente avaliadas na Etapa 1, por meio da análise de risco conduzida pelas empresas, que deve identificar a formação e a presença potencial de NAs a partir da rota de síntese do IFA e do processo produtivo do produto acabado. Uma vez definido o risco, categorizado como “muito alto”, “alto”, “médio”, “baixo” ou “muito baixo”, a empresa deve prosseguir para a Etapa 2, realizando testes confirmatórios, a fim de validar ou refutar a presença de NAs no IFA ou no produto acabado, conforme a origem do risco. Considera-se ausência de NAs quando estas estiverem abaixo de 10% do limite de Ingestão Aceitável Diária (IAD). Esse limite é determinado para cada produto específico, calculado pela razão entre a IAD (em ng), e a dose máxima diária do produto

farmacêutico (em mg), com o objetivo de minimizar o risco ao paciente (ANVISA, 2022; ANVISA, 2024; López-Rodríguez *et al.*, 2020). Como exemplo para a NDEA, a ingestão aceitável da NDEA de 26,5 ng dia⁻¹ dividida pela dose máxima diária de 100 mg de losartana potássica obtem-se o valor da IAD corresponde a 0,265 mg kg⁻¹. Considera-se a ausência de nitrosaminas quando suas concentrações se encontram abaixo de 10% do limite de IAD, assim, a concentração de 0,026 mg kg⁻¹ de NDEA constitui o limite abaixo do qual é possível inferir sua ausência no medicamento quando avaliado por meio de teste confirmatório. Por outro lado, concentrações superiores a esse valor requerem a adoção de ações de mitigação por parte da empresa fabricante do medicamento. Na Tabela 2 estão apresentados os valores de ingestão aceitável, IAD e de 10% da IAD para algumas NAs com potencial presença em medicamentos, sendo este último o que representa o valor a ser observado nas determinações feitas por métodos analíticos na Etapa 2 de avaliação de NAs em medicamentos.

Tabela 2. Limites de aceitação para NAs em medicamentos de losartana potássica.

<i>N</i> -nitrosamina	Ingestão aceitável (ng/dia)	Ingestão aceitável diária (IAD) (ng/mg) ^c	10% da IAD (ng/mg) ^d
NDMA	96,0 ^a	0,96	0,096
NMEA	50,3 ^a	0,50	0,050
NDEA	26,5 ^a	0,26	0,026
NDPA	26,5 ^b	0,26	0,026
NPIP	1300 ^a	13,0	1,300
NDBA	26,5 ^b	0,26	0,026

^a As ingestões aceitáveis calculadas a partir do TD50 obtido a partir de média harmônica dos estudos de carcinogenicidade listado na base de dados Carcinogenicity Potency Database (CPDB).
^b Limite estabelecido com base em estratégia de relação estrutura-atividade SAR com NDEA.
^c IAD considerando a dose máxima diária de 100mg de losartana potássica (IFA).
^d Concentração pela qual, abaixo dela, define-se ausência de NAs pelo método analítico.

Fonte: Adaptado de Kruhlak *et al.* (2024), ANVISA (2024).

Ao realizar a etapa 2 dos testes confirmatórios, se a presença de NAs for refutada, a empresa deve documentar em seu dossiê interno, porém, se a presença das NAs for confirmada, a empresa deve avaliar se o teor está acima dos limites de ingestão aceitável, os quais são específicos para cada nitrosamina em termos de toxicidade e quantidade ingerida diariamente pelo medicamento, e neste caso, deve seguir para a Etapa 3, onde a empresa deve notificar a ANVISA e avaliar a

possibilidade de adequação do produto (ANVISA, 2024).

De forma geral, considerando esta problemática no setor farmacêutico no âmbito nacional e internacional e a obrigatoriedade da análise de NAs em diferentes produtos farmacêuticos, e os limites de detecção e quantificação da técnica como ponto chave no destino de um determinado produto da empresa, várias metodologias de análise vem sendo empregadas para a determinação da presença destas impurezas nos medicamentos buscando alcançar os níveis necessários de investigação. Observa-se a grande importância e necessidade de metodologias analíticas mais eficientes e validadas para a investigação e quantificação destes contaminantes em medicamentos nos laboratórios de controle de qualidade da indústria farmacêutica.

2.4 Metodologias de análise de *N*-nitrosaminas em medicamentos

A ANVISA aponta para o uso de metodologias analíticas disponibilizadas pelas agências reguladoras americana (U.S. FDA) e europeia (EMA), bem como algumas farmacopeias estrangeiras, para que as empresas analisem seus insumos a fim de avaliar a qualidade dos mesmos frente as NAs (ANVISA, 2024).

Considerando a necessidade de fiscalização de diversas NAs em diferentes medicamentos, muitos métodos de análise têm sido disponibilizados pelas agências reguladoras para uso nos laboratórios de controle de qualidade. Na Tabela 3 há um levantamento de alguns parâmetros de análise empregados nas metodologias disponibilizadas pelas agências reguladoras internacionais, entre eles vários estão compilados no *site* da Direção Europeia para a Qualidade dos Medicamentos (EDQM, 2025).

Tabela 3. Metodologias analíticas empregadas pelas agências reguladoras internacionais para extração e determinação de NAs em diferentes fármacos.

Produto Farmacêutico	Preparo de amostra	Instrumentação	Analito (LQ, ng mg ⁻¹)	Referência
Valsartana	- Extração com dimetilsulfóxido	GC/MS/MS	NDMA (0,05)	U.S. FDA, 2019a
	- Injeção do HS (120 °C, 15 min)		NDEA (0,05) NEIPA (0,05) NEIPA (0,05)	
	- Extração com dimetilsulfóxido	GC/MS	NDMA	OMCI, 2018a
	- Injeção do HS (120 °C, 15 min)			
	- Extração com diclorometano, vórtex (1 min)	GC/MS	NDMA (0,08)	U.S. FDA, 2018c
	- Injeção do extrato		NDEA (0,04)	
Valsartana, losartana, irbesartana, candesartana, olmesartana	- Extração com metanol, agitação (40 min)	LC-HRMS	NDMA	U.S. FDA, 2019b
	- Injeção do extrato		NDEA NEIPA NDIPA NDBA NMBA	
	- Extração com metanol, vórtex (5 min), ultrassom (5 min)	HPLC-UV	NDMA (0,04 a 0,25) NDEA (0,08 a 0,5)	OMCI, 2020a
	- Adição de água e agitação (5 min)			
	- Injeção do extrato			
	- Extração com solvente, agitação em vórtex, centrifugação e filtração.	HPLC-HRMS	NDMA	USP, 2024
Valsartana, losartana, irbesartana, candesartana, olmesartana, telmisartan	- Injeção do extrato	GC/MS	NDEA	
		LC-MS/MS	NEIPA	
		GC/MS/MS	NDIPA	
			NDBA	
			NMPA NMBA	

(Continua)

Tabela 3. Metodologias analíticas empregadas pelas agências reguladoras internacionais para extração e determinação de NAs em diferentes fármacos. (Continuação)

Produto Farmacêutico	Preparo de amostra	Instrumentação	Analito (LQ, ng mg ⁻¹)	Referência
Metformina	- Extração com metanol, agitação (40 min) - Injeção do extrato	LC-HRMS	NDMA (0,03)	U.S. FDA, 2020a
	- Extração com metanol, agitação (40 min) - Injeção do extrato	LC-HRMS	NDMA (0,01) NDEA (0,02) NEIPA (0,02) NDIPA (0,02) NDPA (0,005) NMPA (0,005) NDBA (0,005) NMBA (0,005)	U.S. FDA, 2020b
	- Solubilização em água, vórtex (2 min), extração com diclorometano, vórtex (4 min) - Injeção do extrato orgânico	GC/MS	NDMA	OMCI, 2020b
	- Solubilização em água, vórtex (2 min), extração com diclorometano, vórtex (4 min) - Injeção do extrato orgânico	GC/MS	NDMA (0,0198)	OMCI, 2020c
	- Extração com metanol, agitação (40 min) - Injeção do extrato	LC-HRMS	NDMA (0,033)	U.S. FDA, 2019c
Ranitidina	- Extração com água, agitação (40 min) - Injeção do extrato	LC-MS/MS	NDMA (0,033)	U.S. FDA, 2019d

GC/MS/MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em tandem, do inglês *Gas Chromatography Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*.

HPLC-UV – HPLC-UV – Cromatógrafo líquido equipado com detector UV-VIS, do inglês *High-Performance Liquid Chromatography with UV-VIS Detection*.

GC/MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, do inglês *Gas Chromatography Mass Spectrometry*.

LC-MS/MS – Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem, do inglês *Liquid Chromatography Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*.

LC-HRMS – Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução, do inglês *Liquid Chromatography – High Resolution Mass Spectrometry*.

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Observa-se que o preparo de amostra empregado para a extração das NAs de modo geral inclui a extração direta das NAs presentes nos fármacos com diferentes solventes, sendo estes métodos clássicos de extração sólido-líquido (SLE) e líquido-líquido (LLE), não explorando técnicas de pré-concentração. Além disso, os altos tempos de agitação, em vários deles 40 min de agitação com *shaker* para promover a extração dos analitos para o solvente, corrobora com a baixa frequência analítica dos métodos.

A instrumentação analítica utilizada para separação e detecção dos compostos é basicamente a cromatografia líquida ou gasosa, em sua maioria empregando detectores de espectrometria de massas, considerando-se a sensibilidade na detecção necessária para investigar contaminantes em níveis de concentração baixos, como 0,026 mg kg⁻¹ para a NDEA em losartana conforme a legislação (vide Tabela 2).

Na literatura, há outras metodologias estudadas frente a estes medicamentos (Tabela 3). Observa-se que os estudos empregam métodos de preparo de amostras semelhantes aos das agências reguladoras (Tabela 4), como a extração com metanol (Liu *et al.* (2021); Chang *et al.* (2021); Carlos *et al.* (2025); Witkowska *et al.* (2022); Fritzsche *et al.*, 2022); Zmyslowski *et al.*, 2020) e injeção do HS empregando solubilização do fármaco em DMSO (Dimetilsulfóxido) (Wichitnithad *et al.*, 2021). Porém há outros autores que exploraram maiores inovações frente ao preparo de amostra e estes serão discutidos a seguir.

Tabela 4. Metodologias analíticas para determinação de NAs em medicamentos encontradas na literatura.

Instrumentação	Preparo de amostra	Matriz da amostra	País	N-nitrosamina	Referência
GC/MS/MS	SLE (Metanol)	Vizazilsartana, candesartana, irbesartana, losartana, olmesartana, telmisartana e valsartana	Taiwan	NDBA, NDEA, NDMA, NDPA, NEIPA, NDIPA, NMOR, NDPhA, NPIP, NDIBA, NDCHA, NDINA, NMEA	Chang <i>et al.</i> , 2021
GC/MS	DLLME	Ranitidina	Espanha	NDMA, NMEA, NDEA, NPYR, NMOR, NDPA, NPIP, NDBA, NDPhA	Giménez-Campillo <i>et al.</i> , 2021
GC/MS/MS	Cartucho SPE	Valsartana, irbesartana, fimasartana, rosartana potássica, olmesartana, candesartana, metformina e ranitidina	Korea	NDMA, NDEA	Lim; Oh; Shin, 2020
GC/MS/MS	SLE (Metanol)	Candesartana, olmesartana, irbesartana e valsartana	China	NDMA, NDEA, NDBA, NDIPA	Liu <i>et al.</i> , 2021
GC-MS	HS	Losartana potássica	Tailândia e Índia	NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA	Wichitnithad <i>et al.</i> , 2021
GC-MS/MS	LLE (DCM)	Metformina	Polônia	NDMA, NMEA, NDEA, NDPA, NDBA, NPIP, NPYR, NMOR	Zmyslowski; Ksiazek; Szterk, 2020
GC/MS	SF-HS	Ranitidina, nizatidina, metformina, acetaminofeno, clorfeniramina, difenidramina e clonixina	Korea	NDMA	Lee <i>et al.</i> , 2021
GC-MS	HS/SPME	Ranitidina	Arábia Saudita	NDMA	Alshehri <i>et al.</i> , 2020
GC/MS/MS	- LLE (água/DCM) e SLE (DCM) - Injeção do extrato	Metformina	Alemanha	NDMA	Fritzsche <i>et al.</i> , 2022
LC-MS/MS	Cartucho SPE	Ranitidina, metformina, nizatidina, valsartana e telmisartana	Japão	NDMA	Yamamoto <i>et al.</i> , 2022

(Continua)

Tabela 4. Metodologias analíticas para determinação de NAs em medicamentos encontradas na literatura. (Continuação)

Instrumentação	Preparo de amostra	Matriz da amostra	País	N-nitrosamina	Referência
GC/MS/MS	HS/SPME	Ranitidina, metformina e sartanas	Taiwan	NDBA, NDEA, NDMA, NDPA, NEIPA, NDiPA, NDPhA, NMOR, NPYR, NPIP, NDiBA, NDINA, NDCHA, NMEA	Chang <i>et al.</i> , 2022
HPLC-DAD	UA-DLLME com HDES	Candesartana, irbesartana, losartana, olmesartana, telmisartana e valsartana	Brasil	NDMA, NMBA	Novotny <i>et al.</i> , 2023
GC/MS	SLE (Metanol)	Sunitinib, cilostazol e olmesartana medoxomil	Polônia	NDMA, NMEA, NDEA, NDBA, NMOR, NPYR, NPIP, NDPA	Witkowska <i>et al.</i> , 2022
GC/NPD	FE-SHS	Metformina	EUA	NDMA	Zheng <i>et al.</i> , 2022
HPLC-UV	HS-SDME	Losartana	Brasil	NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA	Pereira dos Santos <i>et al.</i> , 2025
LC-MS/MS	SLE (Metanol)	Losartana	Brasil	NDEA, NDIPA, NDBA	Carlos <i>et al.</i> , 2025
GC/MS	SFE-MSPE	Losartana e valsartana	Irã	NDMA, NDEA	Bahrani e Raofie, 2025

UA-DLLME – Microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ultrassom, do inglês *Ultrasound-Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*

DLLME – Microextração líquido-líquido dispersiva, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*.

HPLC-DAD – Cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado ao detector de arranjo de diodos, do inglês *High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection*

GC/NPD - Cromatografia gasosa acoplada ao detector de nitrogênio-fósforo, do inglês *Gas Chromatography coupled to Nitrogen-Phosphorus Detector*

HDES – Solvente eutético profundo hidrofóbico, do inglês *Hydrophobic Deep Eutectic Solvent*

FE-SHS – Análise pelo *headspace* estático com evaporação total, do inglês *Full Evaporation Static Headspace*

SF-HS – Análise do *headspace* livre de solvente, do inglês *Solvent Free Headspace*

SPE – Extração em fase sólida, do inglês *Solid-Phase Extraction*

HS-SDME – Microextração em gota única pelo *headspace*, do inglês *headspace single-drop microextraction*

SFE-MSPE – Extração por fluido supercrítico assistida por extração em fase sólida magnética, do inglês *Supercritical fluid extraction assisted by magnetic solid-phase extraction*.

HPLC-UV – Cromatógrafo líquido equipado com detector UV-VIS, do inglês *High-Performance Liquid Chromatography with UV-VIS Detection*.

DCM - Diclorometano

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Diante da ampla possibilidade de contaminação de NAs, diferentes classes de medicamentos têm sido investigadas, sendo mais evidentes as investigações em medicamentos sartanas, incluindo a losartana. As NAs investigadas nos estudos são variadas, sendo priorizada a NDMA, devido a sua maior toxicidade e risco de ocorrência, porém, outros estudos exploraram um maior número de NAs, para uma investigação mais abrangente.

Assim como os métodos disponibilizados pelas agências reguladoras, os métodos mais recentes desenvolvidos empregam, em sua maioria, cromatografia gasosa como instrumentação analítica, variando-se os detectores acoplados, dos quais o espectrômetro de massas é o mais visado considerando sua detecção seletiva aos íons específicos dos analitos alvo.

O preparo da amostra se enquadra como maior fonte de inovação dos métodos analíticos desenvolvidos recentemente para a determinação de NAs em medicamentos. Esta etapa do método analítico representa a etapa mais crítica, pois é nesse momento que se garante a adequada extração, concentração e limpeza dos analitos de interesse frente à complexidade da matriz. A qualidade dos resultados analíticos está diretamente relacionada à eficiência da etapa do preparo de amostra, já que falhas no preparo podem comprometer tanto a sensibilidade quanto a seletividade das análises. O preparo de amostra é, em geral, a fase mais trabalhosa e geradora de resíduos, o que reforça a necessidade de inovação em técnicas miniaturizadas e sustentáveis. Assim, estratégias como microextrações, automação e o uso de solventes alternativos se mostram fundamentais para alinhar desempenho analítico e princípios de Química Verde, consolidando o preparo de amostra como peça central para a confiabilidade e sustentabilidade dos métodos analíticos modernos (Batista Junior *et al.*, 2025; Anastas e Eghbali, 2010; Carasek *et al.*, 2025).

No intuito de aprimorar as extrações líquido-líquido já exploradas pelas agências reguladoras, alguns pesquisadores exploraram técnicas de microextração no preparo de amostras, como Giménez-Campillo *et al.* (2021) e Novotny *et al.* (2022), que empregaram a Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*) combinada com GC/MS e HPLC-DAD, respectivamente, reduzindo o consumo de solventes orgânicos e oferecendo uma alternativa ambientalmente mais amigável. No estudo de Pereira dos Santos *et al.* (2025) houve a inovação no emprego de água como solvente na técnica de microextração em gota única pelo *headspace* (HS-SDME, do inglês *headspace single-drop microextraction*) aplicada na análise de comprimidos de losartana, trazendo simplicidade, automação e um solvente universal e seguro ao processo analítico.

Observa-se o emprego de algumas análises utilizadas pelas agências reguladoras (Tabela 3), em que as NAs foram analisadas pelo HS. Wichitnithad *et al.* (2021) desenvolveram um método por injeção do HS em GC/MS, semelhante ao método disposto pelos Laboratórios Oficiais de Controle de Medicamentos (OMCI, do inglês *Official Medicines Control Laboratories*)(OMCI, 2018a) para a determinação de NDMA, NDEA, NDIPA e NEIPA em amostras de IFA de losartana potássica. Eles atribuíram à técnica pelo HS um método mais limpo do que extração em fase líquida, pois este último permite solubilizar parcialmente os fármacos no solvente utilizado na extração tornando a injeção direta da matriz extraída um fator negativo para a análise rotineira, tendo em vista a possível deterioração do sistema cromatográfico, pela contaminação do espectrômetro de massa, diminuindo assim a vida útil da coluna (Wichitnithad *et al.*, 2021; Yamamoto *et al.*, 2022). Yamamoto *et al.* (2022) também reiteram que a grande quantidade de IFAs nas análises podem alterar o comportamento de retenção da NDMA e com isso causar diminuição da separação em LC, levando a um efeito de matriz para o analito alvo na detecção por Espectrômetro de Massas (MS, do inglês *Mass Spectrometer*), além do fato de ocorrer a contaminação dos instrumentos resultando na deterioração do sistema cromatográfico e geração de dados não confiáveis.

Visando outra forma de melhorar as técnicas convencionais que empregam a injeção do HS na análise, Lee *et al.* (2021) buscaram um método isento de solvente, considerando a extração ineficiente de NDMA pela técnica de HS devido à sua alta solubilidade em solventes orgânicos e formação de gel do medicamento durante a incubação em alta temperatura. Porém, considerando a formação de NDMA artificial em ranitidina, nizatidina e metformina devido a alta temperatura empregada nas extrações, Lee *et al.* (2021) investigaram as condições de HS, e foi necessário condições mais suaves para quantificação precisa de NDMA em medicamentos por GC/MS.

Neste mesmo viés, Alshehri *et al.* (2020), aplicou a técnica miniaturizada de HS/SPME-GC/MS para contornar os problemas associados aos modos headspace (HS) e injeção de líquido em GC para análise de NDMA em ranitidina, pois nestes casos níveis mais altos de NDMA foram detectados devido a formação *in situ*. Nesta técnica eles puderam evitar a alta temperatura utilizada nos modos de injeção de líquido e HS, e obtiveram resultados com boa correspondência aos obtidos usando LC-MS/MS. A viabilidade de usar HS/SPME-GC/MS para analisar com sucesso NDMA em ranitidina abre novas oportunidades para a análise desse contaminante em produtos farmacêuticos, especificamente aqueles que são termolábeis, como ranitidina e

metformina, uma vez que as altas temperaturas podem promover a conversão desses fármacos em NDMA. (Wichitnithad *et al.*, 2021; Lee *et al.*, 2021; Giménez-Campillo *et al.*, 2021).

Com uma abordagem mais abrangente, e similar a técnica SF-HS livre de solventes de Lee *et al.* (2021), Zheng *et al.* (2022) propuseram a alternativa de um método universal que permite determinar a NDMA em diferentes matrizes com o preparo de amostra descrito como FE-SHS, referente ao HS estático com evaporação total, devido ao não uso de solventes para solubilizar a amostra. Em seu estudo a análise ocorre em GC acoplado com detector de nitrogênio-fósforo (NPD), o qual não apresenta a necessidade do emprego de padrão interno para corrigir algumas flutuações oriundas comumente do MS.

Neste sentido, se vê a possibilidade de explorar melhor novas alternativas de preparo de amostras, que possuam características mais verdes, como a isenção dos solventes como Lee *et al.* (2021) e Zheng *et al.* (2022), bem como mais eficientes na extração das NAs aplicando detectores mais acessíveis aos laboratórios de controle de qualidade, que é o caso do NPD. Além disso, ao invés de empregar HS direto como em seus métodos, em que é necessário aquecer a amostra a quase 115 °C, o que aumenta o risco de formação de NAs durante o preparo de amostras, empregar a técnica de microextração em fase sólida (SPME), abordada por Chang *et al.* (2022) e Alshehri *et al.* (2020) na análise de medicamentos. Essa técnica permite atribuir o fator de pré concentração às determinações de NAs em baixos níveis de concentração, bem como empregar o detector NPD que é mais acessível do que o espectrômetro de massas em tandem (MS/MS, do inglês *Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*) amplamente utilizado por estes autores citados (Charoo *et al.*, 2023).

Estratégias miniaturizadas de preparo de amostra, como SPME, destacam-se por sua capacidade de reduzir consumo de solventes, tempo de análise e geração de resíduos, em total sintonia com os princípios da Química Verde (Batista Junior *et al.*, 2025).

2.4.1 Preparo de amostra

A etapa de preparação de amostras é fundamental para a determinação confiável de NAs, sobretudo porque esses compostos, se encontrados, estarão em níveis baixos de concentração nas formulações farmacêuticas. Tradicionalmente, as metodologias adotadas por agências reguladoras têm se baseado em extrações líquido-líquido (LLE) ou sólido-líquido (SLE). Embora robustas por serem acopladas a sistemas sensíveis, como espectrômetros de massas em

tandem (MS/MS), essas abordagens apresentam limitações, pois não oferecem elevado fator de pré-concentração e estão sujeitas a problemas como efeitos de matriz, carryover, entupimento de linhas e degradação do sistema cromatográfico (Batista Junior *et al.*, 2025).

A LLE, em particular, permanece como um método clássico, mas apresenta desvantagens significativas: uso intensivo de solventes orgânicos tóxicos, necessidade de grandes volumes, múltiplas etapas suscetíveis a perdas de analito e risco de contaminação. Esses fatores têm impulsionado a busca por estratégias mais rápidas, eficientes e ambientalmente sustentáveis. Nesse contexto, as técnicas de microextração em fase sólida surgem como alternativas promissoras, por aliarem simplicidade operacional, maior automação, menor consumo de reagentes e elevado fator de enriquecimento, o que permite alcançar baixos limites de quantificação quando associadas a instrumentos de alta sensibilidade, como a cromatografia gasosa (Carasek *et al.*, 2025).

Entre as metodologias miniaturizadas, a microextração em fase sólida (SPME) destaca-se por incorporar de forma intrínseca os princípios da Química Verde. A técnica dispensa o uso de solventes orgânicos, reduz drasticamente a geração de resíduos e combina, em uma única etapa, extração, pré-concentração e introdução direta do analito no sistema cromatográfico. Além disso, a possibilidade de reutilização das fibras extratoras e a simplicidade do processo reforçam seu alinhamento aos objetivos da Química Analítica Verde (GAC, do inglês *Green Analytical Chemistry*), que busca o desenvolvimento de práticas laboratoriais sustentáveis em diferentes áreas, como meio ambiente e saúde, tendo como fundamentos a minimização do consumo de reagentes e energia, a redução da toxicidade e periculosidade dos insumos empregados, a diminuição da geração de resíduos e a simplificação das etapas analíticas, sem comprometimento da qualidade metrológica dos resultados (Armenta *et al.*, 2008; Gałuszka *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2019; Nowak *et al.*, 2021; Peris-Pastor *et al.*, 2024; Carasek *et al.*, 2025). A avaliação quantitativa do desempenho de um método analítico em termos de seu caráter verde, pode ser realizada por meio de ferramentas métricas integrativas, como a calculadora AGREE, proposta por Pena-Pereira *et al.* (2020). Esta ferramenta considera simultaneamente os doze princípios da Química Analítica Verde e fornece um índice numérico que permite estimar, de forma objetiva e comparável, o grau de verde do método analítico desenvolvido.

2.4.1.1 Microextração em fase sólida aplicada a análise direta de sólidos

A técnica de Microextração em Fase Sólida (SPME) foi desenvolvida por Pawliszyn no

início da década de 1990 e consiste em um método não exaustivo baseado no equilíbrio de partição dos analitos entre a matriz da amostra e a fase extratora (Arthur e Pawliszyn, 1990).

Na SPME, a fase extratora pode ser exposta diretamente por imersão na amostra (DI/SPME) ou em seu *headspace* (HS/SPME). Em ambos os casos, ocorre a partição dos analitos entre a matriz e a fase extratora da fibra por um período de tempo controlado, até que se atinja o equilíbrio. Em seguida, a fibra é recolhida e introduzida no injetor de um cromatógrafo para promover a dessorção dos analitos, por via térmica no caso da GC, possibilitando a determinação desses em níveis de concentração baixos com elevada sensibilidade (Arthur e Pawliszyn, 1990).

O princípio fundamental do processo está na transferência dos analitos da matriz para a fibra recoberta com uma fase extratora polimérica. Essa fase atua como um meio de absorção ou adsorção seletiva, dependendo da sua natureza. Nos recobrimentos líquidos poliméricos, como polidimetilsiloxano (PDMS), ocorre predominantemente absorção, em que os analitos difundem-se para o interior da fase extratora. Já em recobrimentos sólidos, como poliacrilato (PA) ou divinilbenzeno (DVB), prevalece a adsorção, em que os analitos interagem com os sítios ativos da superfície. Em muitos casos, fibras híbridas, as quais combinam fases líquidas e sólidas, são empregadas para ampliar o espectro de compostos extraídos (Pawliszyn, 2009).

Durante a extração, os analitos migram da matriz (líquida, sólida ou gasosa) em direção à fibra. Essa transferência ocorre até que se estabeleça um equilíbrio de partição entre a concentração do analito na matriz e na fase extratora. A eficiência da extração depende diretamente das propriedades físico-químicas dos analitos (polaridade, volatilidade), do tipo de recobrimento da fibra e das condições experimentais (tempo, temperatura, agitação) (Pawliszyn, 2009).

As fibras de SPME são compostas por um núcleo de sílica fundida ou suporte de nitinol, recoberto com uma fase extratora. Entre os recobrimentos mais comuns estão: PDMS (não polar, adequado para compostos apolares e voláteis), PA (polar, indicado para analitos mais hidrofílicos), DVB (adsorvente para compostos de média polaridade) e combinações como PDMS/DVB ou PDMS/Car, que aumentam a seletividade e a faixa de compostos extraídos. Essa diversidade de recobrimentos torna a técnica extremamente versátil, permitindo adaptar o processo de extração ao perfil químico da matriz e dos analitos-alvo (Pawliszyn, 2009).

Após o período de exposição, a fibra é recolhida e introduzida no injetor de um cromatógrafo. No caso da cromatografia gasosa (GC), realiza-se a dessorção térmica, em que

o calor libera os compostos retidos. Essa integração de extração, pré-concentração e introdução direta da amostra no sistema analítico explica a ampla adoção da SPME como uma das mais representativas técnicas miniaturizadas de preparo de amostra (Arthur e Pawliszyn, 1990; Pawliszyn, 2009).

Esta técnica já tem sido explorada pelos autores Alsheri *et al.* (2020) e Chang *et al.* (2022) na análise de diferentes medicamentos, bem como é amplamente empregada para diferentes matrizes frente as NAs (Tabela 5). Diferentes parâmetros de análise foram verificados a fim de estimar possíveis fatores que podem ser otimizados para promover a extração das NAs com a maior eficiência possível.

Tabela 5. Metodologias de determinação de NAs em diferentes matrizes empregando HS/SPME.

Amostra	Instrumento	Parâmetros HS/SPME			Analito	Referência
		Fibra	Temperatura de extração (°C)	Tempo de extração (min)		
Cerveja	GC–MS	PDMS /DVB	42	40	NDMA	Pérez <i>et al.</i> , 2008
Água	GC–MS automatizado	PA	65	20	NDEA, NDPA, NPIP, NDBA	Amayreh, 2019
Vinho branco	GC–MS	PDMS /DVB	40	20	NDMA, NDBA, NDEA, NPIP	Gonzalez-Alatorre <i>et al.</i> , 2020
Vinho tinto	GC–MS	PDMS /DVB	40	20	NDMA, NDBA, NDEA, NPIP	Lona-Ramirez <i>et al.</i> , 2016
Luvas e balões de látex	GC–MS	PDMS /Car	40	60	NDMA, NDEA, NDIPA, NDPA, NMOR, NPYR, NPIP, NDBA,	Feng <i>et al.</i> , 2012

^a Suor artificial

GC/MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

PA – Poliacrilato

PDMS/Car – Polidimetilsiloxano/Carboxen

PDMS/DVB – Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno

(Continua)

Tabela 5. Metodologias de determinação de NAs em diferentes matrizes empregando HS/SPME. (Continuação)

Amostra	Instrumento	Parâmetros HS/SPME			Analito	Referência
		Fibra	Temperatura de extração (°C)	Tempo de extração (min)		
Água	GC–MS/MS automatizado	DVB/Car/PDMS	45	60	NDMA, NMEA, NDEA, NDPA, NMOR, NPYR, NPIP, NDBA, NDPhA	Llop; Borrull; Pocurull, 2010
Bacon frito	GC/MS	DVB/Car/PDMS	65	45	NDMA, NMEA, NDEA, NPYR, NMOR, NDPA, NPIP, NDBA, NDPhA	Roasa; Liu; Shao, 2019
Salsicha	GC-TEA	PDMS /DVB	45	25	NDMA, NDEA, NPIP, NPYR	Andrade <i>et al.</i> , 2005
Ranitidina	GC–MS	PA	45	45	NDMA	Alshehri <i>et al</i> , 2020
Ranitidina, Metformina e Sartanas	GC–MS/MS	DVB/Car/PDMS	80	30	NDBA, NDEA, NDMA, NDPA, NEIPA, NDiPA, NDPhA, NMOR, NPYR, NPIP, NDiBA, NDINA, NDCHA, NMEA	Chang <i>et al</i> , 2022

GC–MS/MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em tandem.

GC-TEA – Cromatógrafo Gasoso acoplado com detector por análise de energia térmica, do inglês *Gas chromatography – Thermal Energy Analyzer*.

DVB/Car/PDMS –Divinilbenzeno/Carboxen/Polidimetilsiloxano

PA - Poliacrilato

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Os trabalhos empregam majoritariamente o emprego de fibra PDMS/DVB, pois esta possui uma polaridade intermediária e é sensível à aminas (Andrade *et al.*, 2005). Porém, resultados satisfatórios foram alcançados por Chang *et al.* (2022) na determinação de uma ampla gama de NAs em medicamentos empregando a fibra composta por DVB/Car/PDMS, que possui um amplo espectro de polaridades extraíveis.

A temperatura de extração das NAs nas diferentes metodologias varia em média de 40 a 65 °C, a fim de promover a volatilização dos compostos, limitando-se a 65°C, porque acima de 60°C os valores altos de temperatura podem causar uma redução da massa transferida do HS para a fibra, devido à dessorção térmica (Borges; Figueiredo; Queiroz, 2015). O tempo de extração da fibra no HS do frasco é em média de 20 a 60 min, isto porque a SPME é uma técnica de extração por equilíbrio, e a escolha do tempo de extração é um compromisso entre duração, sensibilidade e repetibilidade do método analítico (Pawliszyn, 2009).

Em geral, nas análises convencionais que empregam a SPME, as matrizes são geralmente misturadas com água e, posteriormente, submetidas à etapa de extração com a fibra. Essa estratégia de preparo garante uma maior homogeneidade da amostra e, conseqüentemente, resultados analíticos mais precisos. A adição de eletrólitos nesses casos, em especial o cloreto de sódio, é frequentemente aplicada com o objetivo de favorecer a migração dos analitos para a fase gasosa por meio do efeito *salting out* (Chang *et al.*, 2022). No entanto, Chang *et al.* (2022) desenvolveram um método HS/SPME-GC/MS/MS que envolveu manipulação extensiva da amostra farmacêuticas antes da análise, incluindo sonicação, centrifugação e filtração. Apesar de eficiente, este procedimento implica etapas adicionais de manipulação, com elevado consumo de tempo a depender da complexidade da amostra, além de apresentar riscos inerentes, como possibilidade de contaminações, aumento da geração de resíduos, perdas por volatilização e conseqüente prejuízo à exatidão e à precisão dos resultados obtidos (Krug, 2008).

Nesse cenário, uma alternativa que tem se destacado, alinhada aos princípios da GAC, é a análise direta de amostras sólidas, sem a necessidade de etapas prévias de solubilização ou de adição de solventes. Essa abordagem inovadora busca reduzir a manipulação das amostras, simplificar o fluxo analítico e minimizar a geração de resíduos, representando, portanto, um avanço em relação aos formatos convencionais de extração. As análises diretas de sólidos oferecem vantagens notáveis, incluindo a redução do tempo de preparo, a minimização dos riscos de contaminação, o menor risco de perda do analito, a diminuição da periculosidade por não requerer reagentes tóxicos, além de possibilitar maior sensibilidade analítica por evitar

processos de diluição e a análise de pequenas quantidades de material (Kurfürst, 1998; Krug, 2008; Anastas e Eghbali, 2010).

Entretanto, essa mesma estratégia apresenta desafios significativos. A ausência de uma etapa de solubilização implica em maior complexidade metrológica, pois, diferentemente das soluções líquidas, nas quais os analitos encontram-se distribuídos de maneira relativamente homogênea, nas matrizes sólidas a heterogeneidade da amostra torna-se um fator crítico. A representatividade da extração passa a depender diretamente do grau de homogeneidade do material, o que faz da preparação física da amostra, por exemplo a moagem para redução do tamanho de partícula, uma etapa de grande relevância. A literatura aponta que a diminuição do tamanho das partículas contribui para a homogeneidade, refletindo em maior precisão entre replicatas e menor variação nos resultados, já que uma distribuição estreita do tamanho de partículas favorece a uniformidade do material analisado (Zeisler, 1998; Krug, 2008).

Outro ponto de atenção refere-se à cinética de extração. Em matrizes sólidas, a difusão dos analitos até a superfície da fibra pode ser descrita como consideravelmente mais lenta do que em sistemas líquidos, o que pode demandar tempos de equilíbrio prolongados e afetar diretamente a reprodutibilidade do método (Arthur e Pawliszyn, 1990; Carasek *et al.*, 2025). Além disso, interações intermoleculares entre os analitos e componentes da matriz, tais como ligações de hidrogênio, fenômenos de complexação ou aprisionamento físico em estruturas cristalinas, podem reduzir a eficiência da partição e limitar os rendimentos de extração (Pawliszyn, 2009). Em casos de compostos de baixa volatilidade ou fortemente adsorvidos ao sólido, a eficiência do HS pode ser comprometida, tornando necessária a adoção de estratégias adicionais, como elevação da temperatura, adição de sais ou emprego de modificadores de matriz. Contudo, essas intervenções podem trazer efeitos indesejados, incluindo a degradação térmica do fármaco ou até a formação artefactual de NAs, já relatada em métodos que envolvem aquecimento excessivo (Lee *et al.*, 2021; Zheng *et al.*, 2022).

A calibração em análise direta de sólidos também constitui um desafio relevante. A ausência de homogeneidade e as interações da matriz com o analito podem dificultar a quantificação precisa e exata, o que torna indispensável o uso de Materiais de Referência (RM, do inglês *reference material*). Esses materiais representam a principal ferramenta para assegurar a rastreabilidade metrológica, validar métodos propostos e avaliar a homogeneidade e a estabilidade da matriz sólida. Eles são ainda mais cruciais em determinações de contaminantes em níveis de concentrações baixas, como as NAs em fármacos, pois permitem verificar a

recuperação quantitativa dos analitos sem introdução de vieses (Zakaria e Rezali, 2014). O emprego inadequado de calibrações pode comprometer a validade dos resultados, como exemplificado no trabalho de Lee *et al.* (2021), no qual propuseram uma metodologia sem solventes (SF/HS-GC/MS) na qual soluções estoque de NAs foram adicionadas diretamente a produtos farmacêuticos sólidos. Embora eficiente para avaliar linearidade, tal abordagem não representa adequadamente as condições reais de dispersão dos analitos na matriz, limitando, assim, a representatividade do método.

Neste trabalho será explorada a análise direta de amostras sólidas de losartana utilizando a técnica de SPME, combinando a proposta livre de solventes de Lee *et al.* (2021), em consonância com os princípios da GAC, o uso do detector NPD, que possibilita alta seletividade para compostos nitrogenados a um custo reduzido (Zheng *et al.*, 2022), e as vantagens de pré-concentração proporcionadas pela SPME já evidenciadas em investigações de NAs em fármacos (Alshehri *et al.*, 2020; Chang *et al.*, 2022).

Embora a SPME seja uma técnica consolidada, versátil e ambientalmente sustentável, sua aplicação em amostras sólidas ainda demanda investigação aprofundada. As limitações impostas pela heterogeneidade da matriz, pela cinética de difusão, pela volatilidade dos analitos e pela necessidade de materiais de referência específicos constituem fatores determinantes para a reprodutibilidade e a exatidão dos resultados.

A disponibilidade comercial de RM com NAs na matriz de medicamentos é inexistente, sendo mais comum a comercialização de materiais de referências em outras matrizes majoritariamente ambientais, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em solo e sedimentos, bem como metais em solos, sedimentos e águas naturais, produzidos por instituições internacionais como o National Institute of Standards and Technology (NIST), NIST, National Research Council of Canada (NRC), JRC, Paragon Scientific (agora LGC) e Whitehouse Scientific e também distribuídos pela Merck/Sigma-Aldrich (Supelco®) (MERCK KGaA, 2026).

Considerando a escassez de medicamentos contendo nitrosaminas na forma de RM, a produção do mesmo é uma alternativa. A produção de um RM deve seguir procedimentos sistemáticos e tecnicamente controlados, a fim de garantir que as propriedades atribuídas sejam confiáveis e rastreáveis. De acordo com as normas ISO 17034:2016 e ISO 33405:2024, estabelecidas pela Organização Internacional de Padronização (ISO, do inglês *International Organization for Standardization*), o processo inicia-se com o planejamento da produção, incluindo a definição do material, da propriedade a ser caracterizada, do uso pretendido e dos requisitos de qualidade. Em seguida, é realizada a preparação do lote, envolvendo etapas como

seleção da matéria-prima, processamento, mistura e envase, conduzidas de forma a assegurar a homogeneidade entre as unidades produzidas. Após a produção, a homogeneidade deve ser avaliada experimentalmente, permitindo verificar se a variabilidade entre unidades de um mesmo lote é aceitável para o uso pretendido empregando teste estatístico apropriado. Paralelamente, estudos de estabilidade dos analitos devem ser conduzidos para avaliar possíveis alterações da propriedade ao longo do tempo e sob condições definidas de armazenamento e transporte. Somente após a confirmação da homogeneidade e da estabilidade o valor da propriedade pode ser atribuído e, quando aplicável, certificado, acompanhado da estimativa de incerteza. (ISO, 2016; ISO, 2024).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Desenvolver um método para identificação e quantificação de NAs em produto acabado de losartana potássica empregando HS/SPME para a pré-concentração das NAs, e técnicas instrumentais cromatográficas em nível de triagem (GC/NPD) e de investigação criteriosa (GC/MS), para determinação das NAs diretamente em amostras de comprimidos de losartana potássica.

3.2 Objetivos Específicos

- Preparar um material de referência de losartana potássica contendo seis NAs (RM-LP-NA) para ser empregado como amostra sólida no desenvolvimento e validação das metodologias analíticas.
- Caracterizar o material RM-LP-NA pela homogeneidade, estabilidade, identificação e quantificação das NAs.
- Desenvolver um método via GC/NPD e GC/MS para determinação de NAs, otimizando-se parâmetros de separação cromatográfica.
- Otimizar parâmetros de preparo de amostra HS/SPME, como o tipo de fibra, quantidade de amostra, agitação, temperatura e tempo de extração, empregando ensaios univariados e multivariados.
- Validar o método HS/SPME-GC/NPD para análise de triagem das NAs e aplicar em amostras comerciais.
- Validar o método HS/SPME-GC/MS para determinação das NAs e empregar na confirmação da identidade da NA detectada nas amostras reais triadas previamente pelo método HS/SPME-GC/NPD.
- Avaliar o caráter verde do método HS/SPME-GC/NPD pela calculadora AGREE.
- Comparar o método proposto com métodos da literatura.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Padrões e Materiais

Uma mistura de seis padrões de NAs em diclorometano (EPA 521 *Nitrosamine Mix*, *certified reference material*) contendo $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada composto (N-nitrosodimetilamina (NDMA), N-nitrosodibutilamina (NDBA), N-nitrosodipropilamina (NDPA), N-nitrosometiletilamina (NMEA), N-nitrosodietilamina (NDEA), N-1-nitrosopiperidina (NPIP)) foi adquirida da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Foi preparada uma solução estoque contendo 400 mg L^{-1} de cada NA em metanol, sendo esta armazenada em frasco de vidro âmbar, protegida da luz direta, e acondicionada a -23°C até o momento da análise. O ácido fórmico e o metanol (MeOH), ambos de grau HPLC, foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A acetona (grau GC) foi obtida da Tedia (Tedia Way, Fairfield, EUA). A água ultrapura foi adquirida de um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA).

Para os ensaios de extração, foram empregadas fibras SPME revestidas com polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB, $65 \mu\text{m}$, 1cm), polidimetilsiloxano (PDMS, $100\text{-}\mu\text{m}$, 1cm), poliacrilato (PA, $85 \mu\text{m}$, 1cm) e polidimetilsiloxano/carboxen/divinilbenzeno (DVB/Car/PDMS, $50/30\mu\text{m}$, 2cm) obtidas da Supelco (EUA). As fibras foram manuseadas através do dispositivo manual de SPME (holder) obtido da Supelco (Sigma Aldrich®) e foram condicionadas antes do uso de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante, inserindo-as no injetor do GC à 250°C com split 1:100 durante 1h antes das análises.

O controle de temperatura no procedimento de extração HS/SPME foi realizado utilizando um banho Sieger, modelo Stern 6, conectado com mangueiras a uma célula de vidro. A agitação das amostras sólidas durante as extrações foi feita empregando uma barra magnética cilíndrica padrão revestida com PTFE (15 mm de comprimento $\times$ 5 mm de diâmetro), obtida da KASVI (Brasil). Esta foi disposta dentro do frasco transparente (20mL) contendo a amostra, sendo movimentada sobre um agitador magnético da Velp Scientifica, modelo Arec.

4.2 Instrumentação e condições cromatográficas

4.2.1 LC-ESI-MS/MS

A identificação e a quantificação das NAs no RM-LP-NA foram realizadas em um sistema

de cromatografia líquida de alta performance (LC) (modelo 1200 Series, Agilent Technologies®, Waldbronn, Alemanha) acoplado a um sistema de espectrometria de massas composto por um espectrômetro de massas híbrido quadrupolo/trap linear Q Trap 3200 (Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, Canadá). A separação foi realizada em uma coluna Ultra AQ C18 (tamanho de partícula de 3,0 µm, 100 mm, 2,1 mm, Restek, EUA). A fase móvel foi composta pela mistura de ácido fórmico 0,1% em água (canal A) e ácido fórmico 0,1% em metanol (canal B). A vazão foi de 350 µL min⁻¹ e o volume de injeção foi de 20 µL do extrato obtido pelo procedimento adaptado do capítulo geral <1469> da Farmacopeia dos Estados Unidos (USP), conforme descrito no tópico 4.3.2.3 posterior. A coluna foi pré-condicionada durante 5 min com 97% A antes de injetar a amostra. A separação foi realizada a 30 °C utilizando eluição por gradiente segmentado: 0–4 min, alteração para 50% A; 4–7 min, alteração para 25% A; 7–8 min, alteração para 15% A; 8–9 min, alteração para 5% A; 9–12 min, mantido 5% A; 12–15 min, alteração para 97% A. O modo de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) foi selecionado para a quantificação dos NAs por meio do monitoramento da transição de íons precursor-para-produto descrita na Tabela 6. O nitrogênio foi utilizado como gás de desolvatação e gás de colisão. Os experimentos foram realizados utilizando a fonte Turbo Ion Spray™ (eletrospray—ESI) em modo de íon positivo. A agulha capilar foi mantida a 5500 V. Os parâmetros do MS/MS foram: gás de cortina, 10 psi; temperatura, 450 °C; gás 1, 45 psi; gás 2, 45 psi; gás CAD, médio. Os parâmetros do MS/MS das NAs foram determinados por infusão de padrão individual (Tabela 6). O software Analyst versão 1.6.3 foi utilizado para o controle do sistema de Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem com ionização por electrospray (LC-ESI–MS/MS, do inglês *Liquid Chromatography Mass Spectrometry/Mass Spectrometry with Electrospray Ionization*) e análise de dados.

Tabela 6. Parâmetros do espectrômetro de massas para a determinação de seis NAs na amostra sólida RM-LP-NA, sendo a m/z da transição de íons precursor-para-produto (Q1→Q3) para o Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM), tempo de retenção (min), Potencial de Desagregação (DP), Potencial de Entrada (EP), Potencial de Energia de Colisão (CEP), Energia de Colisão (CE) e Potencial de Saída da Célula de Colisão (CXP).

<i>N</i> -nitrosamina	m/z Q1 → Q3	Tempo de retenção (min)	DP	EP	CEP	CE	CXP
NDMA	75,0/43,0	2,18	26,00	11,50	8,00	21,00	6,00
NPIP	115,0/69,1	7,50	21,00	8,00	8,00	21,00	4,00
NMEA	89,0/43,1	8,67	21,00	12,00	10,00	15,00	6,00
NDPA	131,0/43,1	8,68	16,00	8,00	10,00	23,00	6,00
NDEA	103,0/57,1	9,95	26,00	11,50	8,00	13,00	6,00
NDBA	158,8/40,7	9,95	16,00	2,50	14,00	33,00	4,00

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

4.2.2 GC/NPD

Foi utilizado um cromatógrafo gasoso modelo 7890A da Agilent (EUA), equipado com detector de nitrogênio-fósforo (GC/NPD). O controle do equipamento e a aquisição de dados foram realizados por meio do software *ChemStation*[®]. A injeção foi realizada no modo *splitless* por 5 min, a 250 °C, utilizando uma entrada com diâmetro interno (I.D) de 0,75 mm obtida pela inserção de *insert* de vidro. Empregou-se uma coluna capilar de sílica fundida DB5-MS, composta por (5%-fenil) metilpolissiloxano (30 m x 0,25 mm I.D. x 0,25 µm), da Agilent J&W, para promover a separação cromatográfica dos analitos. O gás de arraste utilizado foi nitrogênio de alta pureza, com fluxo de 1 ml min⁻¹ (*head pressure* de 11,72 psi e *purge flow* de 15 ml min⁻¹). A separação dos analitos foi conduzida por meio do seguinte programa de temperatura: início a 60 °C, aumento até 130 °C à razão de 10 °C min⁻¹, seguido de aquecimento até 190 °C à razão de 20 °C min⁻¹, mantendo-se esta temperatura por 1 min. Para o desempenho do detector, empregou-se gás auxiliar (*make up*) de nitrogênio a 10 mL min⁻¹, fluxo de hidrogênio de 3 mL min⁻¹ e fluxo de ar 60 mL min⁻¹, com temperatura de operação de 280 °C. Os gases de alta pureza (99,999 %) foram adquiridos da White Martins (Brasil).

4.2.3 GC/MS

Foi utilizado um cromatógrafo gasoso modelo 7820A da Agilent (EUA), equipado com injetor *split/splitless* e acoplado a um espectrômetro de massas quadrupolar, da Agilent 5975 Series MSD (EUA), contendo a biblioteca espectral de massas NIST MS Search 2.0. O controle do equipamento e a aquisição de dados foram realizados por meio do software MSD Chemstation®. A injeção foi feita no modo *splitless* por 5 min, a 250 °C, utilizando uma entrada com diâmetro interno (I.D) de 0,75 mm obtida pela inserção de *insert* de vidro. Empregou-se uma coluna capilar de sílica fundida, DB5-MS, composta por (5%-fenil) metilpolissiloxano (30 m x 0,25 mm I.D. x 0,25 µm), da Agilent J&W, para promover a separação cromatográfica dos analitos. O gás hélio de alta pureza (99,999 %, White Martins, Brasil) foi utilizado como gás de arraste a uma taxa constante de 0,6 mL min⁻¹ (*purge flow* de 15 ml min⁻¹). A separação dos analitos foi conduzida por meio do seguinte programa de temperatura: início a 60 °C, aumento até 130 °C à taxa de 10 °C min⁻¹, seguido de aquecimento até 190 °C à taxa de 20 °C min⁻¹, mantendo-se esta temperatura por 1 min. A interface MSD foi mantida a 280 °C, enquanto a temperatura da fonte de íons foi ajustada para 230 °C. A identificação e quantificação das NAs foram realizadas empregando o monitoramento de íons selecionados (SIM). Os íons de quantificação e qualificação e os tempos de retenção de cada NA estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Canais de massa selecionados (m/z) para íons qualificadores e quantificadores, e tempos de retenção para as seis NAs analisadas no sistema GC/MS.

Analito	Íons de identificação pelo modo SIM (m/z)	Tempo de retenção (min)
NDMA	74, 42	2,8
NMEA	88, 71, 56, 42	3,5
NDEA	102, 56, 42	4,2
NDPA	130, 100, 70, 43	6,6
NPIP	114, 55, 42	7,2
NDBA	158, 116, 84, 57	9,0

Fonte: Adaptado de Germano *et al.* (2026).

4.3 Material de referência de losartana potássica contendo seis NAs (RM-LP-NA)

Para realização dos estudos de análise direta no sólido, um material de referência sólido constituído por comprimidos de losartana potássica contendo seis NAs (NDMA, NMEA, NDEA, NDPA, NPIP, NDBA) denominado Material de Referência do comprimido de losartana potássica contendo seis N-nitrosaminas (NDMA, NDBA, NDPA, NMEA, NDEA, NPIP) (RM-LP-NA, do inglês *Reference Material of losartan potassium with six N-Nitrosamines*) foi preparado e caracterizado para o emprego nas otimizações dos métodos analíticos.

4.3.1 Obtenção do material de referência (RM-LP-NA)

Os comprimidos de losartana potássica, contendo 50 mg de IFA em um produto final de 200 mg, foram adquiridos localmente (Florianópolis, Brasil) de um mesmo lote de um produtor industrial certificado. Esses comprimidos foram utilizados para obter o RM-LP-NA, sendo este empregado no desenvolvimento dos métodos. A composição dos excipientes nos comprimidos de losartana potássica utilizados incluía lactose monoidratada, celulose microcristalina, amido pré-gelatinizado, croscarmellose sódica, dióxido de silício, estearato de magnésio, álcool polivinílico, dióxido de titânio, macrogol e talco. Estes dados foram informados pelo fabricante.

Para obter o RM-LP-NA, 160 comprimidos foram previamente moídos em um almofariz e pistilo e peneirado para obter um tamanho de partícula menor que 45 mesh. O material sólido obtido foi transferido para um béquer de vidro, no qual foi adicionado 40 mL de acetona (grau GC) e fortificado com 0,4 mL de solução estoque (400 mg L^{-1} de cada NA em metanol). A amostra foi agitada por 10 min, adicionando-se uma barra magnética na solução e com agitação de 250 rpm em um agitador magnético. A solução foi mantida em repouso sobre uma bancada em temperatura ambiente por pelo menos 24 h até ser completamente seca. Após este período, o material sólido foi transferido para um frasco âmbar, e a homogeneização do material sólido no frasco fechado foi realizada manualmente por 15 min.. O material sólido foi fracionado em 35 frascos *eppendorf* (rotulados como F1 a F35), pesando-se 0,8g em cada um, para promover o estudo de estabilidade do RM-LP-NA. Os frascos foram armazenados a -23°C até o momento das análises. Este material preparado foi utilizado tanto para os ensaios de caracterização do material, como também para o desenvolvimento e validação dos métodos analíticos.

4.3.2 Caracterização do material

Para a avaliação do material, os parâmetros de homogeneidade, estabilidade, identificação e determinação do teor das NAs no material RM-LP-NA foram avaliados. A homogeneidade investiga se a dispersão dos analitos foi homogênea no material sólido para minimizar os erros associados à heterogeneidade, considerando-se análise direta de amostra sólida. A estabilidade foi avaliada em termos da variabilidade do sinal cromatográfico dos analitos no material ao longo do tempo de armazenamento, e a identificação e determinação da concentração foi necessária para avaliar a presença e a concentração das NAs no material final de forma mais exata, visto as possíveis perdas no processo de obtenção.

4.3.2.1 Homogeneidade

Para avaliar a homogeneidade do material RM-LP-NA preparado, três porções do sólido foram selecionadas aleatoriamente entre as porções fracionadas do sólido armazenado (F1, F15, F35) para a análise. A massa de 0,8g do RM-LP-NA foi transferida para um vial de 20 mL, adicionando-se uma barra de agitação. O frasco foi tampado e disposto em banho termostatizado à 35 °C sob agitação de 250 rpm. A amostra foi mantida por 10 min para alcançar o equilíbrio termodinâmico e em seguida a fibra DVB/Car/PDMS foi exposta no HS do frasco durante 30 min. Após este período de exposição da fibra, esta foi submetida à análise no GC/NPD por dessorção térmica no injetor a 250°C por 5 min. A análise foi realizada em triplicata de cada porção de 0,8g, totalizando 9 análises, para avaliação do Desvio Padrão Relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*, %) e do teste estatístico entre as medidas.

Os dados dos sinais analíticos das áreas dos analitos foram normalizados e o gráfico foi plotado empregando o software Microsoft Excel® 2016. O gráfico final foi gerado correlacionando as áreas normalizadas das seis NAs para avaliação da homogeneidade, incluindo a barra de erros com o RSD das 9 medidas. O mesmo software foi empregado para obter o teste estatístico ANOVA – fator único, com 95% de significância e grau de liberdade igual a 2, selecionando a área de pico cromatográfico de três medidas feitas em três porções do RM-LP-NA do mesmo lote produzido, para avaliar se houve diferença significativa na dispersão das NAs no material sólido preparado, entre as porções, e com isso avaliar sua homogeneidade.

4.3.2.2 Estabilidade

Para avaliar a estabilidade do material RM-LP-NA preparado, duas porções do sólido foram selecionadas entre as porções fracionadas do sólido para a análise. O ensaio foi feito no primeiro dia do preparo do material, dia 1 (frascos F1 e F15), e em mais três dias, sendo o dia 4 (frascos F2 e F34), dia 10 (frascos F3 e F33), e dia 27 (frascos F4 e F32) após o preparo do material. Em cada ensaio, a massa de 0.8g do RM-LP-NA foi adicionada em vial de 20 mL, adicionando-se uma barra de agitação. O frasco foi tampado e disposto em banho termostatizado à 35 °C sob agitação de 250 rpm. A amostra foi mantida por 10 min para alcançar o equilíbrio termodinâmico e em seguida a fibra DVB/Car/PDMS foi exposta no HS do frasco durante 30 min. Após este período de exposição da fibra, esta foi submetida à análise no GC/NPD por dessorção térmica no injetor a 250 °C por 5 min. A análise foi realizada em quadruplicata para cada dia analisado, sendo feito duas análises em cada porção de 0,8g de RM-LP-NA adicionada no vial.

Os dados dos sinais analíticos das áreas dos analitos foram plotados para empregando o software Microsoft Excel® 2016. O mesmo software foi empregado para obter o teste estatístico ANOVA – fator único, com 95% de significância e grau de liberdade igual a 3, selecionando as quatro medidas de área de pico cromatográfico feitas nos quatro dias diferentes, para avaliar se houve diferença significativa entre os ensaios.

4.3.2.3 Identificação e determinação do teor das seis NAs

As NAs presentes no RM-LP-NA foram identificadas e quantificadas utilizando metodologia analítica adaptada do capítulo geral <1469> da Farmacopeia dos Estados Unidos (USP), que trata da determinação de impurezas de NAs em produtos farmacêuticos (USP, 2024). Em razão do caráter confidencial da metodologia original, detalhes específicos não são apresentados. O preparo da amostra seguiu o procedimento descrito no referido capítulo, consistindo na extração dos analitos da amostra sólida com solvente aquoso acidificado sob agitação, com posterior análise da fase líquida por LC-ESI-MS/MS. A identificação dos analitos foi realizada por comparação do tempo de retenção dos padrões analíticos em solução estoque (20 mg L⁻¹, metanol) com os sinais obtidos no extrato da amostra.

A quantificação das NAs foi realizada por meio de curva de calibração por adição de padrão (n = 3). Um conjunto de sete concentrações para cada NA, variando de 13,34 a 131,13 mg kg⁻¹,

foi preparado pela fortificação do RM-LP-NA com volumes variados de uma solução estoque contendo a mistura dos padrões das seis NAs, diluída em água a uma concentração de 20 mg L⁻¹. As áreas dos picos cromatográficos de cada analito foram plotadas em função da concentração correspondente e utilizadas para gerar as regressões lineares, construídas no software Microsoft Excel® 2016. As concentrações das NAs na amostra foram calculadas por extrapolação da curva de calibração por adição de padrão e expressas como mg de NA por kg de IFA.

Outros parâmetros de validação do método também foram avaliados após a quantificação dos analitos, incluindo o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ), os quais foram estimados com base em relações sinal-ruído de 3:1 e 10:1, respectivamente.

Para o estudo de precisão intra-dia, foram selecionados três níveis de concentração (13,3; 54,2 e 131,1 mg kg⁻¹), sendo cada nível analisado em triplicata (n = 3). Já a precisão inter-dia foi avaliada utilizando a concentração de 54,2 mg kg⁻¹, com três replicatas realizadas em três dias distintos (n = 9). Os valores de RSD foram calculados para ambas as avaliações de precisão.

A exatidão do método foi avaliada com as mesmas concentrações utilizadas no estudo de precisão intra-dia, em triplicata, e expressa como recuperação relativa (RR, %) e RSD (%). Tanto a exatidão quanto a precisão foram determinadas utilizando o material de referência RM-LP-NA previamente fortificado com os padrões das seis NAs, com volumes variados de uma solução estoque contendo a mistura dos padrões das seis NAs, diluída em água a uma concentração de 20 mg L⁻¹. Sendo as áreas correspondentes ao teor da amostra não fortificada (RM-LP-NA) subtraídas dos resultados obtidos, e o valor avaliado foi referente à concentração efetivamente fortificada com padrão aquosos das NAs adicionados ao RM-LP-NA na etapa de preparo do método USP, a fim de avaliar se o método de preparo por extração com solvente aquoso acidificado efetivamente recuperava o que fora adicionado, e com isso ter confiabilidade na extração das NAs do RM-LP-NA para quantificação. A análise estatística dos dados gerados nos experimentos de validação foi realizada no Microsoft Excel® 2016.

4.4 Otimização do preparo de amostra HS/SPME

Os parâmetros que são críticos nas análises deste preparo de amostra foram otimizados de forma a se obter as melhores condições de extração. Os seguintes parâmetros foram otimizados: tipo de fibra, quantidade de amostra, agitação, temperatura e tempo de extração.

Durante os ensaios de otimização, os parâmetros de extração foram fixados, onde inicialmente pesou-se 0,80 g (equivalente a quatro comprimidos) de RM-LP-NA em um frasco

de vidro de 20 mL. Uma barra magnética de agitação foi adicionada ao frasco. O frasco foi então fechado e colocado em um banho termostatizado ajustado a 35 °C. A agitação a 250 rpm foi iniciada assim que o frasco foi colocado no banho. A amostra sólida foi mantida nessas condições por 10 min para alcançar o equilíbrio. Em seguida, a fibra foi exposta ao HS do frasco para extração dos analitos por 30 min, sob as mesmas condições. Após isso, a fibra foi transferida manualmente para o injetor do GC para dessorção térmica dos analitos em modo splitless a 250 °C por 5 min. Cada fibra foi condicionada antes do uso, sendo inserida no injetor do GC/NPD a 250 °C com split 1:100 e imediatamente utilizada.

4.4.1 Seleção da fibra

Neste estudo, foram realizadas extrações das NAs presentes no RM-LP-NA empregando-se quatro diferentes fibras comerciais, sendo elas poliacrilato (PA), polidimetilsiloxano (PDMS), polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB) e divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/Car/PDMS). Os ensaios foram realizados nas condições descritas no tópico 4.4, em triplicata.

As respostas da otimização da fibra foram obtidas normalizando os sinais das áreas das seis NAs dos cromatogramas. Foi obtido um gráfico em barras com as respostas obtidas para cada NA em cada fibra estudada.

4.4.2 Quantidade de amostra

Após a seleção da fibra com maior potencial de extração (DVB/Car/PDMS), foi realizado o estudo da influência da quantidade de amostra na extração. Para isso, a massa da amostra foi estudada variando-se a quantidade de comprimidos de losartana (2, 4, 6, 8, 10).

Cada comprimido pesava 0,20 g, correspondendo a 0,40, 0,80, 1,20, 1,60 e 2,00 g de RM-LP-NA utilizados em cada extração. Os ensaios foram realizados nas condições descritas no tópico 4.4, em triplicata.

As respostas de otimização foram obtidas normalizando os sinais analíticos dos cromatogramas. Esses dados foram processados calculando a média geométrica dos seis NAs através do software Microsoft Excel® 2016. O gráfico final foi gerado correlacionando as áreas normalizadas dos seis NAs com as diferentes quantidades de comprimidos de losartana.

4.4.3 Seleção da agitação, temperatura e tempo de extração.

Após a seleção da fibra e a quantidade de amostra que possui maior potencial de extração das NAs, outras variáveis foram também avaliadas incluindo a agitação, temperatura e tempo de extração. Estas variáveis foram investigadas empregando um planejamento composto central, no qual os níveis de investigação estão dispostos na Tabela 8 e a matriz codificada do planejamento está disposta na Tabela 9. Os ensaios foram realizados nas condições descritas no tópico 4.4, realizando os ajustes para as variáveis estudadas.

Nesta etapa, os níveis estudados estão baseados no que foi verificado na literatura (Tabela 5) além de limitar a temperatura a 60 °C, pois valores altos de temperatura favorecem a transferência do analito para o HS, porém simultaneamente reduz a massa transferida do HS para a fibra (Borges; Figueiredo; Queiroz, 2015).

Tabela 8. Variáveis e seus níveis para investigação para o Planejamento composto central na extração das NAs via método HS/SPME-GC/NPD.

Variável	Nível de investigação				
	+ α	1	0	-1	- α
1 – Agitação (rpm)	333	300	250	200	167
2 - Temperatura de extração (°C)	60	52	40	28	20
3 - Tempo de extração (min)	120	102	75	48	30

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Tabela 9. Planejamento composto central codificado para a extração das NAs via método HS/SPME-GC/NPD.

n° Exp.	Agitação (rpm)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1	- 1	- 1	- 1
2	- 1	+ 1	+ 1
3	+ 1	- 1	+ 1
4	+ 1	+ 1	- 1
5 (C)	0	0	0
6	- 1	- 1	+ 1
7	- 1	+ 1	- 1
8	+ 1	- 1	- 1
9	+ 1	+ 1	+ 1
10 (C)	0	0	0
11	- 1,66	0	0
12	+ 1,66	0	0
13	0	- 1,66	0
14	0	+ 1,66	0
15	0	0	- 1,66
16	0	0	+ 1,66
17 (C)	0	0	0

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Para avaliação destas variáveis, foi obtida a superfície de resposta no software Statistica® 13.0, processando os dados tratados considerando a média geométrica das áreas de integração das seis NAs no software Microsoft Excel® 2016.

4.4.4 Preparo de amostra HS/SPME otimizado

O preparo de amostra otimizado por HS/SPME para a determinação de seis NAs na análise direta de comprimidos sólidos de losartana envolve a pesagem de 0,80 g da amostra em um frasco de vidro de 20 mL, com a adição de uma barra magnética de agitação. O frasco é fechado e colocado em um banho termostatzado a 45 °C. A agitação a 250 rpm é iniciada assim que o frasco é colocado no banho. A amostra sólida é mantida nessas condições por 10 min para

alcançar o equilíbrio. Em seguida, a fibra DVB/Car/PDMS é exposta ao HS do frasco para extração dos analitos por 85 min, sob as mesmas condições. Após esse período de exposição, a fibra é transferida manualmente para o GC para a dessorção térmica dos analitos em modo splitless a 250 °C por 5 min. Por fim, a fibra é removida do GC e inserida na próxima amostra.

4.5 Validação dos métodos HS/SPME-GC/NPD e HS/SPME-GC/MS

Os parâmetros de validação foram estabelecidos de acordo com a diretriz ICH Q2 (R2) (ICH, 2023). Um conjunto de nove concentrações, variando de 0,014 a 0,346 mg kg⁻¹, foi analisado para cada NA em triplicata, para ambos os métodos HS/SPME-GC/NPD e HS/SPME-GC/MS. As curvas de calibração por semelhança de matriz (n=3) foram analisadas para cada NA utilizando o RM-LP-NA. Estas curvas foram preparadas por diluição sólido-sólido, realizando a pesagem do material sólido RM-LP-NA em massas crescentes, ou seja, concentrações crescentes das NAs contidas no material, e adicionando uma massa da matriz branca do comprimido de losartana (similar ao RM-LP-NA, sem ter sido fortificado com NAs) em concentrações decrescentes para atingir as concentrações desejadas de NAs final e mesma massa final (0,8g), conforme a massa final do método otimizado. A mistura sólida foi pesada diretamente nos frascos imediatamente antes das análises. A área do pico do analito obtida dos cromatogramas foi plotada em função da concentração do analito e utilizada para gerar as regressões lineares feitas no software Microsoft Excel® 2016. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados utilizando a razão sinal-ruído de 3:1 e 10:1, respectivamente. Para realizar o estudo de precisão intra-dia, três níveis de concentração foram selecionados (0,036 mg kg⁻¹, 0,131 mg kg⁻¹, 0,226 mg kg⁻¹), com cada ponto tendo a extração realizada três vezes (n = 3). Para a precisão inter-dia, a concentração de 0,131 mg kg⁻¹ foi selecionada para realizar três replicatas em três dias diferentes (n = 9). Os valores RSD para os testes de precisão inter-dia e intra-dia foram obtidos. A exatidão foi avaliada com estas mesmas concentrações utilizadas no estudo de precisão intra-dia em triplicata, e foi expressa como Recuperação Relativa (RR) e RSD (%). A exatidão e a precisão da análise foram determinadas utilizando o RM-LP-NA diluído sólido-sólido, da mesma forma executada na curva de calibração, empregando como diluente comprimidos comerciais para alcançar as concentrações estudadas. A análise dos dados gerados nos experimentos de validação de ambos os métodos desenvolvidos neste trabalho foi realizada utilizando o software Microsoft Excel® 2016.

4.6 Amostras comerciais para análise

Treze amostras de comprimidos de losartana potássica (F1 a F13) de diferentes produtores comerciais, contendo 50 mg de IFA em um produto final de 200 mg, foram adquiridas localmente (Florianópolis, Brasil) e investigadas utilizando o método validado HS/SPME-GC/NPD.

Estas amostras foram fabricadas no período de 2020 a 2024, sendo que o lote da amostra F8 foi coletado durante o período de recall em fevereiro de 2022 devido a contaminação por NAs (O Globo, 2022; R7, 2022). Elas foram produzidas em diferentes regiões geográficas do Brasil. As amostras foram devidamente identificadas e armazenadas em local refrigerado a 4 °C até o momento da análise. As amostras foram previamente trituradas utilizando pilão e almofariz para aumentar sua área de superfície, e peneiradas para obtenção de um tamanho de partícula menor que 45 mesh. Os comprimidos em pó foram pesados para a análise por HS/SPME de acordo com o método otimizado.

4.7 Caráter verde do método HS/SPME-GC/NPD

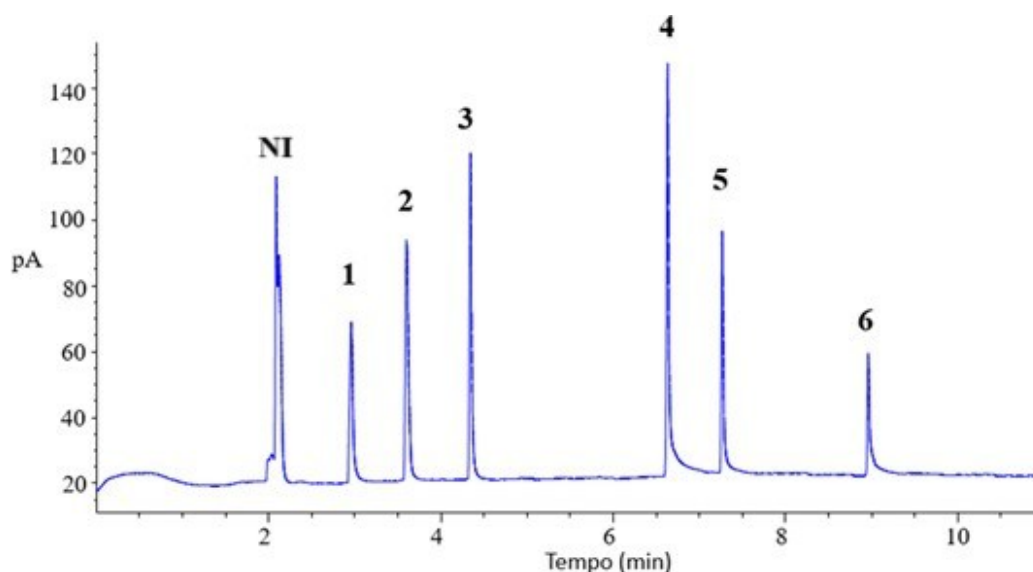
O caráter verde do método analítico foi avaliado utilizando a ferramenta AGREE (Pena-Pereira *et al.*, 2020), baseada nos 12 princípios da GAC. O índice AGREE foi calculado como uma média ponderada da conformidade do método com cada princípio, sendo que as pontuações individuais variam de 0 (não conforme) a 1 (totalmente conforme). A avaliação foi realizada por meio da plataforma online AGREE disponibilizada pelos autores Pena-Pereira *et al.* (2020), na que fornece uma representação visual em um diagrama circular. Nesse diagrama, uma escala de cores vermelho–amarelo–verde indica o nível de conformidade com cada princípio. O índice final de adequação ambiental, que varia de 0 a 1, é exibido no centro do diagrama. Uma pontuação de 1,0 representa a máxima adequação ambiental, sendo que valores mais próximos desse máximo são indicados por tons de verde mais intensos, refletindo maior sustentabilidade ambiental do método analítico.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Separação cromatográfica das seis *N*-nitrosaminas no GC/NPD e GC/MS

Conforme avaliado por Sieira *et al.* (2020), a coluna capilar HP-5MS, composta por 5%-fenil-metilpolissiloxano, gerou a separação entre NDMA, NMEA, NDEA, NDPA, NPIP e NDBA de forma eficiente em 9 min. Jurado-Sánchez *et al.* (2007), obtiveram a separação de sete NAs usando a mesma coluna, mas em seu estudo empregou um programa de temperatura mais longo com uma corrida de 22 min, e sem a inclusão da NDPA. Tendo em vista que estudos anteriores apresentaram separação satisfatória para a separação das seis NAs na coluna capilar composta por 5%-fenil-metilpolissiloxano, no presente estudo foi empregada a coluna capilar DB-5MS, de igual composição da fase estacionária. A separação cromatográfica das seis NAs investigadas apresentou tempos de retenção variando de 2,8 a 9,0 min em ambos os equipamentos GC/NPD e GC/MS (Figura 6 e 7), e estes permitiram separação eficiente dos analitos.

Figura 6. Cromatograma da solução padrão de seis NAs pela injeção direta de 1 μL (1 mg L^{-1} em metanol) no GC/NPD. Os analitos e os seus respectivos tempos de retenção são: NI – não identificado, 1 - NDMA (3,0 min), 2 - NMEA (3,6 min), 3 - NDEA (4,4 min), 4 - NDPA (6,6 min), 5 - NPIP (7,3 min) e 6 - NDBA (9,0 min). Os dados foram adquiridos com o software *ChemStation*[®].



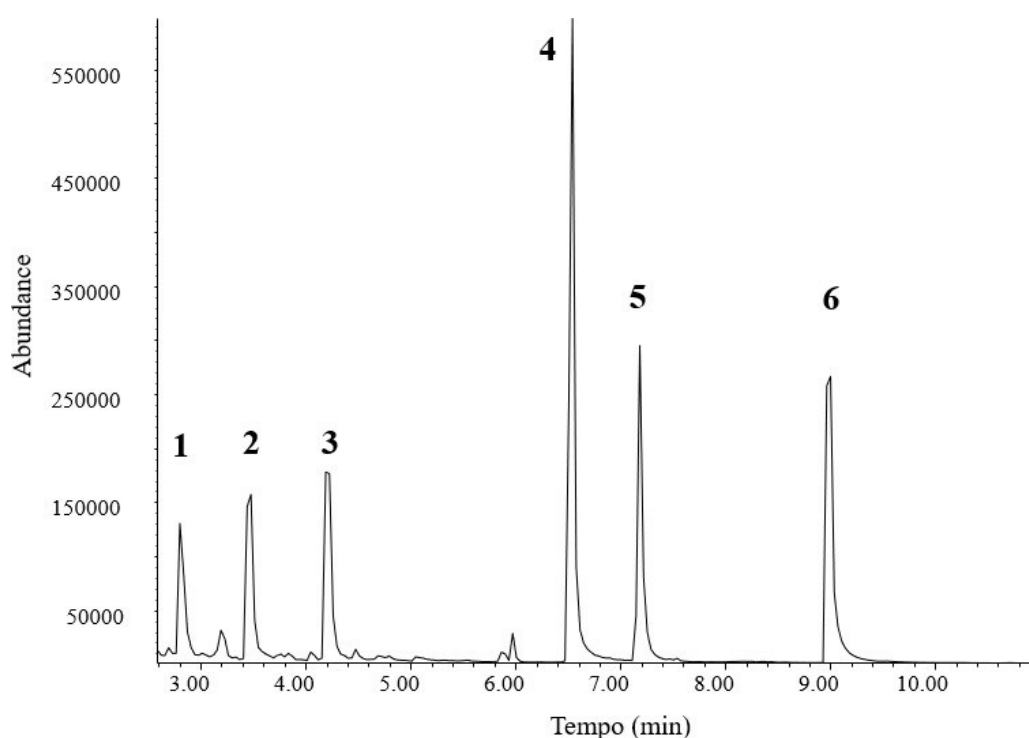
Fonte: Adaptado de Germano *et al.* (2026).

Considerando que todas as NAs foram analisadas na mesma concentração em massa, os sinais cromatográficos foram normalizados para concentração molar por meio da correção pela massa molar de cada analito da Figura 6. Os valores de área/MM indicaram respostas molares semelhantes para NDMA, NMEA e NDEA (1,89; 2,02 e 1,92, respectivamente), enquanto a NDPA apresentou maior resposta (2,30), a NPIP resposta intermediária (1,29) e a NDBA a menor resposta (0,56), evidenciando o caráter não equimolar do detector de nitrogênio-fósforo (NPD). De acordo com o mecanismo de detecção descrito por Collins *et al.* (2006), a resposta do NPD decorre de um processo catalisado pela superfície alcalina da pérola aquecida, no qual a eficiência de formação de espécies nitrogenadas ionizáveis pode ser dependente da estrutura molecular do analito.

Nesse contexto, as respostas semelhantes observadas para NDMA, NMEA e NDEA podem ser atribuídas à elevada similaridade estrutural desses compostos, que diferem apenas pelo aumento progressivo de um grupo metileno, mantendo ambiente químico comparável ao redor do grupo N–NO. Em contraste, a NPIP e a NDBA apresentaram menores intensidades normalizadas, o que pode estar associado ao maior impedimento estérico ao redor do átomo de nitrogênio, decorrente da estrutura cíclica da NPIP e do maior volume dos grupos butila na NDBA. Esse impedimento pode dificultar o acesso do nitrogênio à superfície catalítica do *bead*, reduzindo a eficiência de formação das espécies nitrogenadas detectáveis durante o processo termoiônico e resultando em menor resposta do NPD, independentemente do conteúdo carbônico da molécula.

O mesmo perfil relativo de intensidade foi observado a partir da injeção da mesma solução padrão no GC/MS (Figura 7), indicando que esse comportamento não está associado às etapas de injeção ou separação cromatográfica. No GC/MS, as respostas também não são equimolares, pois a ionização por impacto de elétrons e os padrões de fragmentação dependem da estrutura molecular de cada NA. Assim, apesar dos diferentes princípios de detecção do NPD e do MS, a estrutura química dos analitos exerce influência determinante sobre a resposta, resultando em tendências semelhantes de intensidade relativa.

Figura 7. Cromatograma (MODO MS: SIM) do padrão das seis NAs pela injeção direta de 1 µL (10 mg L⁻¹ em metanol) no GC/MS. Os analitos, os seus respectivos canais de monitoramento (m/z) para quantificação e os tempos de retenção são: 1 - NDMA (m/z 74, 2,8 min), 2 - NMEA (m/z 88, 3,5 min), 3 - NDEA (m/z 102, 4,2 min), 4 - NDPA (m/z 130, 6,6 min), 5 - NPIP (m/z 114, 7,2 min) e 6 - NDBA (m/z 158, 9,0 min). Os dados foram adquiridos com o software MSD ChemStation®.



Fonte: Adaptado de Germano *et al.* (2026).

Considerando-se as mesmas condições cromatográficas de separação em ambos sistemas GC/NPD e GC/MS, a ordem de eluição das seis NAs ocorreu de forma similar em ambos sistemas, da NA de menor polaridade e ponto de ebulição (NDMA, log P -0.496 e 151°C) para a maior polaridade e ponto de ebulição (NDBA, log P 2,561 e 237°C), seguindo a ordem de eluição conforme os crescentes pontos de ebulição:

NDMA (151°C) < NMEA (163) < NDEA (177), < NDPA (206) < NPIP (219) < NDBA (237)

O uso do sistema GC/NPD foi selecionado no presente estudo devido a sua vantagem em ter alta sensibilidade para compostos nitrogenados, como é o caso das NAs, bem como pelo seu

custo de aquisição e manutenção serem mais baixos em comparação com sistemas de espectrometria de massas (MS) (Grebel, 2007). Esse baixo custo torna-se particularmente vantajoso quando um grande número de amostras precisa ser analisado, como é comum no controle de qualidade das indústrias farmacêuticas. Esse fator beneficia as empresas/laboratórios ao proporcionar acesso a métodos mais acessíveis para atender aos requisitos das agências regulatórias, permitindo uma ferramenta de triagem para analisar múltiplos lotes a um custo reduzido.

No entanto, para as amostras em que as NAs são detectadas, o emprego de outra metodologia confirmatória é crucial, especialmente quando limites regulatórios estão envolvidos, pois a presença do composto pode impactar o setor de produção (Grebel, 2007). Para realizar os estudos confirmatórios, o detector MS também foi utilizado, dada a sua confiabilidade em fornecer resultados associados aos íons de identificação, como corroborado pela literatura relevante (Chang *et al.*, 2022; Alshehri *et al.*, 2020; Bahrani e Raofie, 2025).

5.2 Caracterização do material de referencia (RM-LP-NA)

A primeira etapa antes de prosseguir com as otimizações do preparo de amostras HS/SPME e validações dos métodos HS/SPME-GC/NPD e HS/SPME-GC/MS, é obter maior garantia de que o material sólido preparado para os estudos, RM-LP-NA, apresenta características bem definidas de homogeneidade, estabilidade e concentração para que as análises posteriores não sejam comprometidas, ao se tratar de análise direta do sólido e sem uso de solvente.

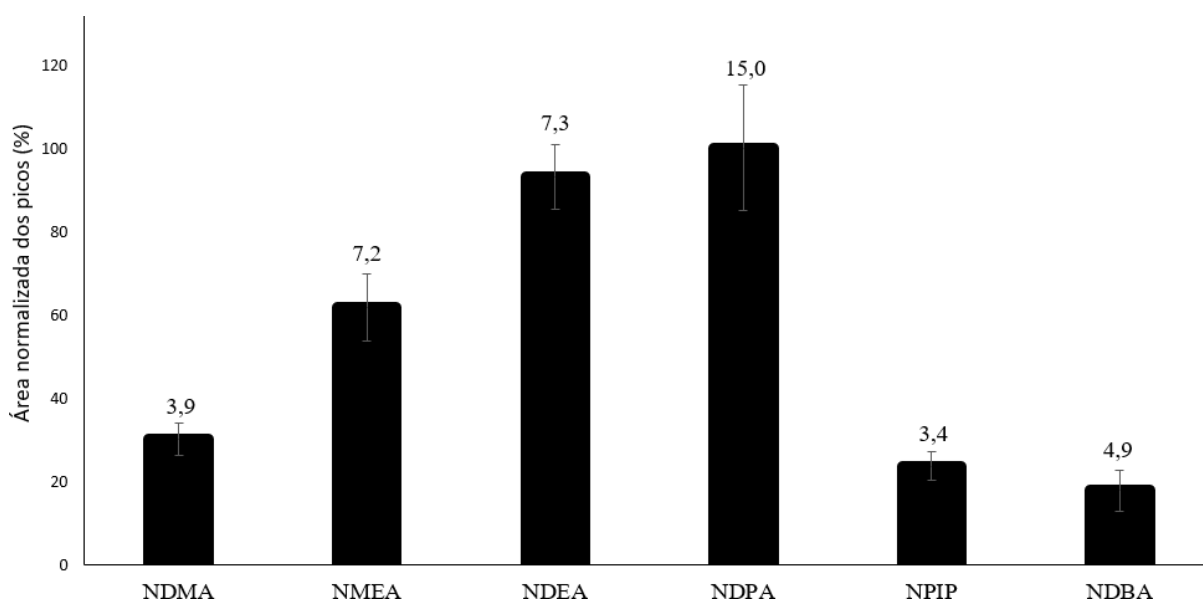
As NAs possuem características de alta volatilidade, com pressão de vapor alta, (Vide Tabela 1) principalmente no caso da NDMA e NDEA. Este fator levantou suspeitas frente à possibilidade de flutuação da concentração adicionada das NAs na fortificação do material, incluindo as etapas de manipulação do material. Devido a isso, ensaios de homogeneidade e teor foram realizados antes das otimizações e validações do método.

5.2.1 Homogeneidade do RM-LP-NA

Para avaliar a homogeneidade da fortificação do material sólido com as NAs com o RM-LP-NA, foi realizada a avaliação do estoque armazenado no freezer no momento em que este foi preparado (Figura 8). Os impactos da homogeneidade do sólido podem afetar a precisão analítica

do método que foi desenvolvido empregando este material, principalmente por se tratar de um método de determinação direta em sólido. A homogeneidade do sólido, por sua vez, garante que a mesma quantidade do analito esteja presente em todas as frações do sólido empregadas na análise, diminuindo assim os desvios nas análises.

Figura 8. Respostas obtidas das seis NAs em triplicata de três amostragens aleatórias do material RM-LP-NA para avaliação da homogeneidade dos analitos dispersos no sólido. Condições da análise: 0,8 g do RM-LP-NA sem diluição, 250 rpm, 35 °C, extração com fibra de DVB/Car/PDMS por 30 min e análise no GC/NPD. A barra de erros está expressa como desvio padrão relativo das medidas (RSD, %, n = 9).



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Observa-se na Figura 8 o perfil referente à homogeneidade das seis NAs presentes no RM-LP-NA. Considera-se homogêneo o material, tendo em vista que há uma concentração para cada analito com RSD entre as medidas menor que 15,0%, sendo para 5 NAs menor que 7,3% de RSD entre as medidas, o que soma-se os desvios intrínsecos a técnica analítica somada à possível variação de homogeneidade. Apenas a NDPA apresentou um desvio maior de 15,0, podendo este valor maior estar correlacionado ao perfil do pico cromatográfico deste analito, que por não possuir simetria adequada e presença de cauda à direita (Figura 6) pode ter afetado a integração dos picos e somado um erro aleatório a mais nas medidas.

Segundo a AOAC (2016), desvios de até 7,3% são aceitáveis em concentrações na faixa de 10 mg kg⁻¹, sendo esta a faixa de concentração das NAs presente no material RM-LP-NA. Com isso, majoritariamente cinco das NAs investigadas estão abaixo ou muito próximos a este valor. Isso implica que todos os ensaios reproduzem uma concentração similar de cada analito nas diferentes amostragens do material sólido, apresentando um RSD aceitável e intrínseco ao método analítico empregado. Com isso, pode-se inferir que as análises posteriores não serão afetadas por uma possível heterogeneidade, e o tempo de agitação do material durante seu preparo foi suficiente para homogeneizar a massa do sólido frente a concentração das NAs, estando estas homogeneamente distribuídas no sólido.

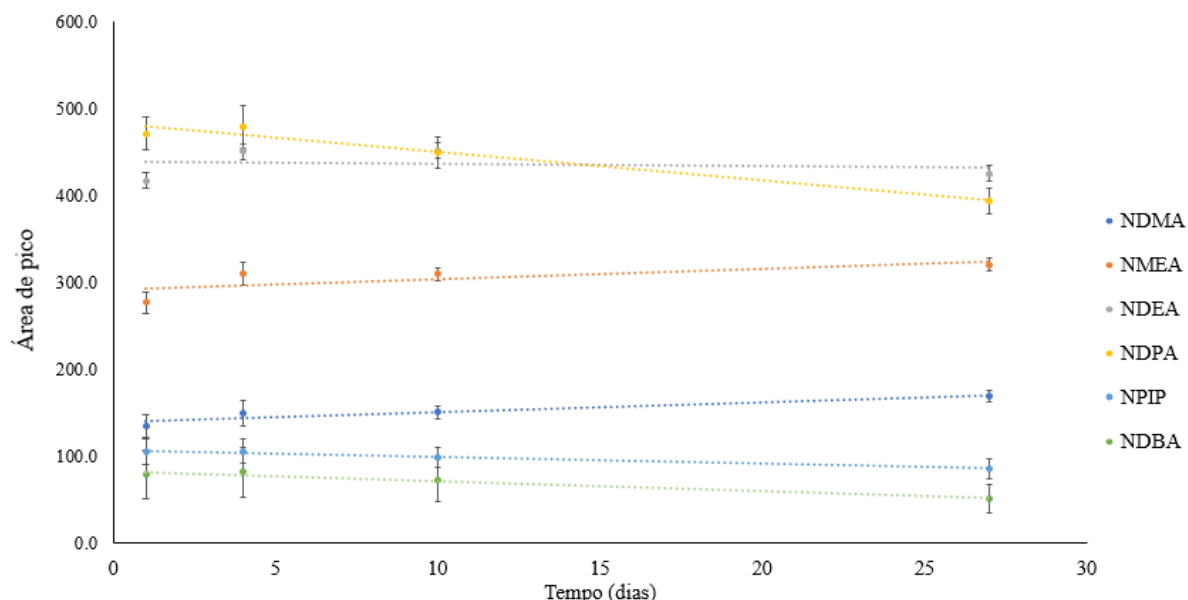
Para melhor interpretação dos resultados, foi aplicado o teste ANOVA Fator único, com 95% de significância e grau de liberdade igual a 2, para atribuir uma avaliação mais criteriosa dos resultados obtidos entre as áreas dos picos cromatográficos das seis NAs entre as frações do lote analisadas. Ao avaliar a diferença entre as frações para as diferentes NAs, observou-se que não há diferença significativa com 95% de confiança entre as 3 porções analisadas do lote, com amostragem aleatória do RM-LP-NA, isto porque o $F_{\text{calculado}}$ foi inferior ao $F_{\text{crítico}}$ (5,1433) para as seis NAs, sendo eles 3,5692 para a NDMA, 3,5215 para a NMEA, 0,5101 para a NDEA, 0,7468 para a NDPA, 1,8934 para a NPIP e 0,1416 para a NDBA. Isso indica que o método de preparo e homogeneização é eficiente para a obtenção do RM-LP-NA, sendo este um material que contém as NAs dispersas homogeneamente sobre o material, minimizando efeitos de heterogeneidade na análise direta do sólido nos ensaios posteriores de desenvolvimento e validação do método analítico. A homogeneidade adequada minimiza a variabilidade entre unidades, sendo essencial para reduzir contribuições à incerteza associada aos resultados analíticos e ao valor atribuído do material (ISO, 2016; ISO, 2024).

5.2.2 Estabilidade do RM-LP-NA

Para avaliar a estabilidade da fortificação do material sólido com as NAs do RM-LP-NA, foi realizada a avaliação do estoque fracionado armazenado em freezer no momento de sua preparação e em três tempos subsequentes, totalizando um período de 27 dias, correspondente ao intervalo em que o material foi utilizado nos ensaios. A falta de estabilidade pode comprometer a precisão e a exatidão analítica dos métodos desenvolvidos com o emprego desse material, especialmente por se tratar de um método de determinação direta em sólido. A avaliação da estabilidade das NAs no material sólido investiga se a mesma quantidade de analito permanece

presente nas diferentes frações do mesmo lote ao longo do tempo, considerando as propriedades voláteis dessas substâncias, como elevadas pressões de vapor, particularmente no caso da NDMA (vide Tabela 1), as quais constituem um fator crítico potencialmente limitante para a estabilidade das NAs no material. Na Figura 9 está apresentado o gráfico com as respostas dos sinais cromatográficos de cada uma das 6 NAs nos 4 dias avaliados.

Figura 9. Gráfico de estabilidade das seis NAs presentes no RM-LP-NA, incluindo 4 dias investigados e análise em quadruplicata do material. Condições da análise: 0,8 g do RM-LP-NA sem diluição, 250 rpm, 35 °C, extração com fibra de DVB/Car/PDMS por 30 min e análise pelo método HS/SPME-GC/NPD. A barra de erros expressa o desvio padrão relativo das medidas (RSD, %, n = 4).



No gráfico da estabilidade (Figura 9) observa-se que a NDPA apresentou uma tendência de diminuição da área do sinal cromatográfico, e isto pode ser associado ao mesmo fator observado para os ensaios de homogeneidade anterior, onde o RSD também apresentava um desvio alto devido à possível dificuldade de integração no software, devido à cauda presente no pico.

Para melhor interpretação dos resultados, foi aplicado o teste ANOVA Fator único, com 95% de significância e grau de liberdade igual a 3, para atribuir uma avaliação mais criteriosa dos resultados obtidos entre as áreas dos picos cromatográficos das seis NAs entre os dias investigados. Ao avaliar a diferença entre os dias para as diferentes NAs, observou-se que não há diferença significativa com 95% de confiança entre as 4 medidas feitas no período de 27 dias de armazenamento iniciais do RM-LP-NA, isto porque o $F_{\text{calculado}}$ foi inferior ao $F_{\text{crítico}}$ (3,49) para

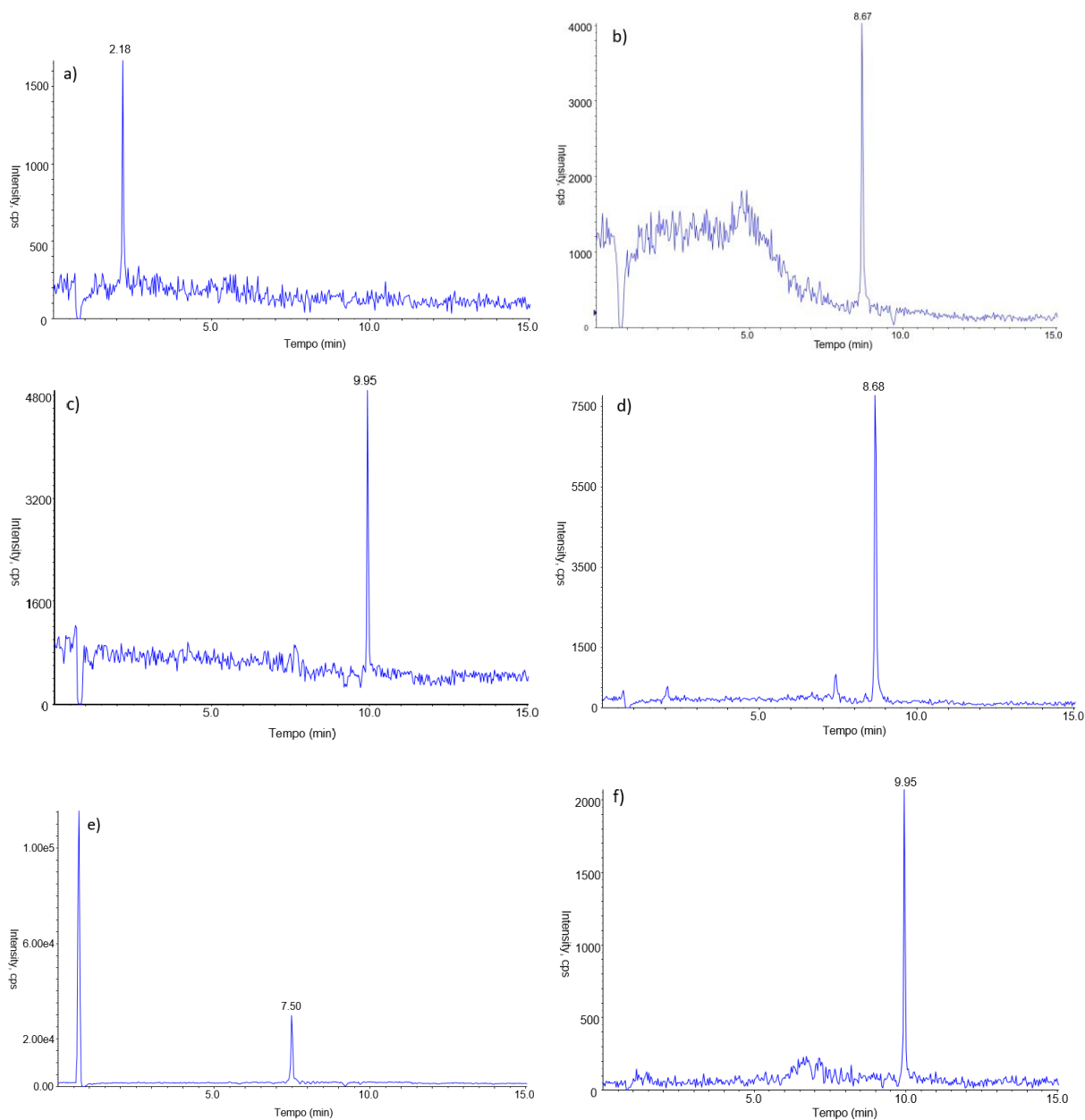
as seis NAs, sendo eles 2,76 para a NDMA, 0,48 para a NMEA, 1,21 para a NDEA, 2,37 para a NDPA, 2,69 para a NPIP e 2,74 para a NDBA. Esses resultados indicam que o método de armazenamento adotado é adequado, uma vez que as NAs permanecem aderidas ao material sob as condições avaliadas, sem perdas significativas dos analitos voláteis. Dessa forma, o material apresenta confiabilidade para uso nos ensaios subsequentes de desenvolvimento e validação do método analítico. Além disso, é possível assegurar que diferentes amostras provenientes de um mesmo lote apresentem valores de propriedade consistentes, os quais se mantêm estáveis ao longo do tempo quando armazenados nas condições especificadas, conforme preconizado pelas normas ISO (2016; 2024).

Neste trabalho foi realizado um ensaio piloto, com a produção de um único lote, no qual foi avaliada a estabilidade de forma parcial, ou seja, por um período de 27 dias. O material produzido, inicialmente destinado a um estudo de estabilidade de um ano, foi empregado em diversas etapas do desenvolvimento do trabalho, o que inviabilizou a disponibilidade de amostra suficiente para a continuidade da avaliação por um período mais prolongado. Em decorrência disso, o presente estudo não atende integralmente a todas as exigências estabelecidas pelas normas ISO 33405:2024 e ISO 17034:2016, sendo necessária a realização de estudos complementares em trabalhos futuros para dar continuidade e aprofundamento à avaliação proposta.

5.2.3 Identificação e determinação do teor de NAs no RM-LP-NA por LC/MS/MS

Após a conclusão da efetiva homogeneidade e estabilidade dos analitos no material de referência, o RM-LP-NA foi analisado a fim de identificar a presença das NAs e suas respectivas concentrações finais. A Figura 10 (a-f) apresenta o cromatograma para cada NA, obtido pelo monitoramento das transições de íons precursor-para-produto pelo método USP adaptado empregando LC-ESI-MS/MS.

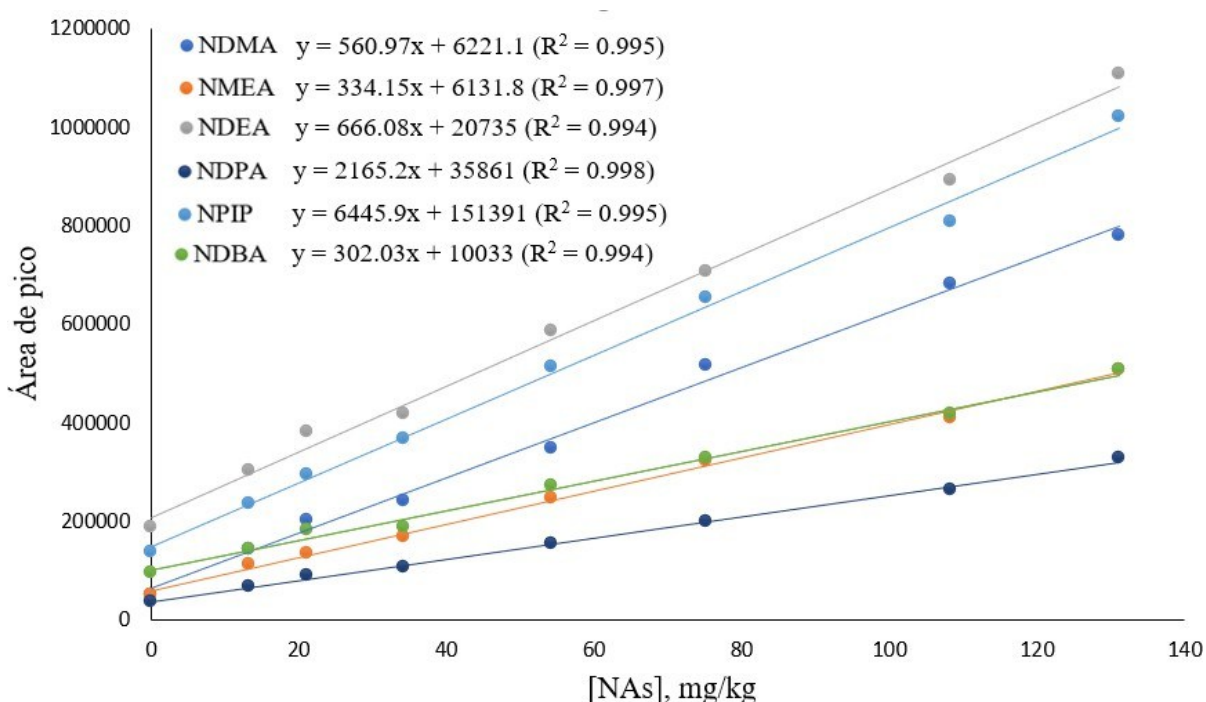
Figura 10. Cromatograma das NAs presentes no RM-LP-NA pelo método USP adaptado empregando LC-ESI-MS/MS. Os analitos, o tempo de eluição e as m/z das transições de íons precursor-para-produto (Q1 → Q3) investigados são: (a) NDMA (2,18 min, m/z 75,0/43,0), b) NMEA (8,67 min, m/z 89,0/43,1), c) NDEA (9,95 min, m/z 103,0/57,1), d) NDPA (8,68 min, m/z 131,0/43,1), e) NPIP (7,50 min, m/z 115,0/69,1), f) NDBA (9,95 min, m/z 158,8/40,7). Dados adquiridos no software Analyst[®].



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

A concentração das NAs presentes no material de referência foi determinada por meio de metodologia analítica adaptada do capítulo geral <1469> da USP. Essa etapa foi conduzida com o objetivo de assegurar a maior exatidão possível na quantificação das NAs no material, considerando suas propriedades físico-químicas, em especial a volatilidade, bem como as múltiplas etapas de manuseio envolvidas na obtenção do material. Para esse fim, foram empregadas curvas de calibração por adição de padrão individuais para cada analito, conforme ilustrado na Figura 11.

Figura 11. Curvas de calibração por adição padrão ($n = 3$) em diferentes concentrações, variando de 13,34 a 131,13 mg NA kg⁻¹ IFA⁻¹, foram preparadas para as seis NAs presentes no RM-LP-NA por LC-ESI-MS/MS. Para NDMA, NMEA, NDEA e NDBA os valores de resposta foram multiplicados por 10 para melhorar a visualização dos dados.



Fonte: Adaptado de Germano *et al.* (2026).

A concentração das seis NAs no RM-LP-NA variou de 11,2 a 32,8 mg kg⁻¹ obtidas por extrapolação das curvas de calibração por adição de padrão (Tabela 10). Esses valores de concentração foram considerados para os ensaios posteriores de otimização do preparo de amostra por HS/SPME e na validação dos métodos.

Tabela 10. Resultados da determinação de seis NAs no RM-LP-NA utilizando o método adaptado do Capítulo Geral 1469 da USP (n=3).

Analito	Concentração (mg NA kg⁻¹ IFA⁻¹)
NDMA	11,2 ± 0,4
NMEA	17,7 ± 0,5
NDEA	30,4 ± 0,7
NDPA	16,7 ± 0,1
NPIP	23,3 ± 0,3
NDBA	32,8 ± 0,6

Fonte: Adaptado de Germano *et al.* (2026).

O método empregado neste estudo foi adaptado a partir de um método oficial da USP, com a aplicação de curva de calibração por adição de padrão em substituição à calibração externa, visando maior confiabilidade dos resultados. Essa adaptação foi necessária em razão da indisponibilidade dos padrões internos originalmente previstos no método oficial, os quais teriam a função de corrigir eventuais flutuações de sinal associadas à calibração externa. Nesse contexto, a calibração por adição de padrão mostra-se mais adequada, pois minimiza efeitos de matriz e variações de resposta instrumental ao ser construída diretamente na própria amostra.

De acordo com a RDC nº 166/2017 da ANVISA, métodos analíticos adaptados ou modificados devem ser devidamente validados para comprovar que atendem aos parâmetros de desempenho requeridos para o propósito pretendido, assegurando a confiabilidade e a qualidade dos resultados obtidos. Assim, a realização da validação torna-se indispensável, uma vez que modificações nas condições experimentais podem impactar o desempenho analítico, especialmente no que se refere à estratégia de calibração adotada no presente trabalho. Consequentemente, o método adaptado foi validado de acordo com a diretriz ICH Q2(R2) (ICH, 2023), conforme indicado pela ANVISA em seu guia específico para NAs (ANVISA, 2024). Os parâmetros de validação estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Figuras de mérito para o método adaptado do Procedimento 3 do Capítulo Geral <1469> da USP para a determinação de seis NAs no RM-LP-NA por LC-ESI-MS/MS.

Figura de mérito	n ^a	Analito					
		NDMA	NMEA	NDEA	NDPA	NPIP	NDBA
Faixa linear de calibração (mg kg ⁻¹)	7	13,34-131,13	13,34-131,13	13,34-131,13	13,34-131,13	13,34-131,13	13,34-131,13
Coeficiente angular	7	560,97	334,15	666,08	2165,2	6445,9	302,03
Coeficiente linear	7	6221,1	6131,8	20735	35861	151391	10033
Coeficiente de determinação (R ²)	7	0,995	0,997	0,994	0,998	0,995	0,994
LD ^b (mg kg ⁻¹)		2,7	4,1	2,1	0,9	0,4	1,0
LQ ^c (mg kg ⁻¹)		8,1	12,6	6,3	2,7	1,4	3,2
RR ^d % (RSD, %) 13,3 mg kg ⁻¹	3	88,9 (9,4)	122,8 (6,5)	106,2 (6,8)	101,0 (7,0)	88,5 (11,9)	104,1 (3,0)
RR ^d % (RSD, %) 54,2 mg kg ⁻¹	3	75,6 (11,7)	87,8 (8,7)	89,3 (7,2)	82,1 (7,8)	108,4 (13,2)	104,8 (6,3)
RR ^d % (RSD, %) 131,1 mg kg ⁻¹	3	92,0 (11,9)	112,2 (2,0)	106,0 (11,8)	100,7 (9,9)	102,2 (1,1)	102,7 (4,7)
Precisão Intraday ^e 13,3 mg kg ⁻¹	3	4,1	3,6	6,1	2,2	1,5	5,6
Precisão Intraday ^e 54,2 mg kg ⁻¹	3	11,3	6,2	10,5	11,1	3,7	9,8
Precisão Intraday ^e 131,1 mg kg ⁻¹	3	7,4	7,8	2,7	2,9	4,5	1,7
Precisão Inter-dia ^e 54,2 mg kg ⁻¹	9	17,0	14,9	15,1	11,4	12,0	10,8

^a Número de réplicas.

^b Limite de detecção calculado pela razão sinal-ruído.

^c Limite de quantificação calculado pela razão sinal-ruído.

^d Precisão obtida pela recuperação relativa (RR, %).

^e Precisão obtida pelo desvio padrão relativo (RSD, %). Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Observa-se que os coeficientes de determinação (R^2) foram superiores a 0,994 para todas as NAs, indicando excelente adequação dos dados com modelo de regressão linear. Além disso, as concentrações observadas nas amostras foram superiores aos respectivos limites de quantificação (LQ) da técnica, demonstrando a adequação do método para quantificação dos analitos na concentração presente no RM-LP-NA. Os dados de precisão indicaram boa repetibilidade entre as replicatas, com valores de RSD e majoritariamente dentro dos padrões aceitáveis estabelecidos pela AOAC (2016). Considerando-se o adequado desempenho do método adaptado do capítulo geral <1469> da USP, este se mostrou confiável para garantir as concentrações das NAs presentes no RM-LP-NA o mais exatas possível em sua aplicação nas etapas posteriores de desenvolvimento e validação dos métodos HS/SPME-GC/NPD e HS/SPME-GC/MS.

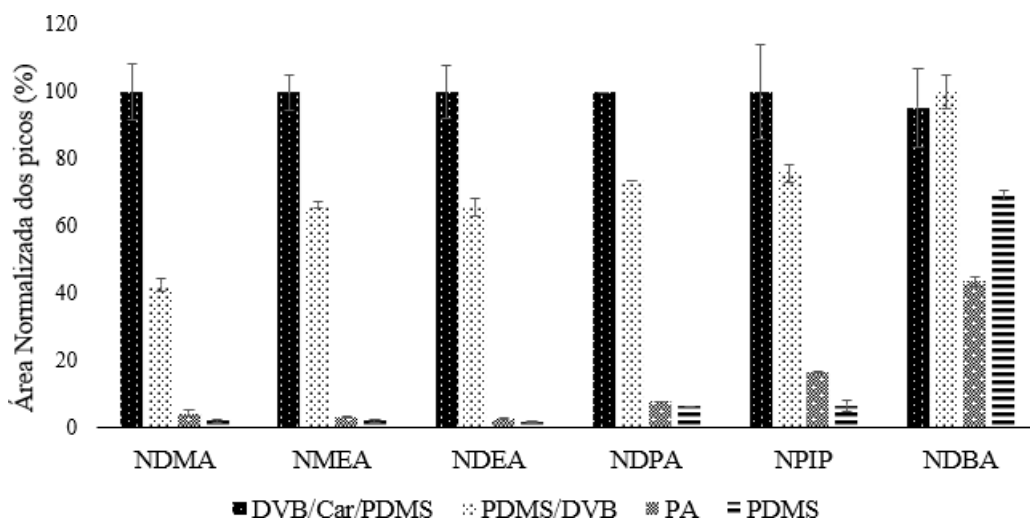
5.3 Otimização dos parâmetros do preparo de amostra HS/SPME

5.3.1 Seleção da fibra de extração

A seleção da fibra é uma etapa crucial, pois determina o material de recobrimento da fibra com maior capacidade de extração das NAs a partir da matriz. Neste estudo, foram realizados testes de extração das NAs presentes no RM-LP-NA por meio da técnica HS/SPME-GC/NPD, empregando-se quatro fibras comerciais diferentes: PA, PDMS, PDMS/DVB e DVB/Car/PDMS.

A Figura 12 apresenta os resultados obtidos nesta etapa, expressos como áreas normalizadas de cada NA em função da fibra utilizada, permitindo avaliar o desempenho de extração de cada recobrimento no procedimento de HS/SPME.

Figura 12. Áreas normalizadas das seis NAs (NDMA, NMEA, NDEA, NDPA, NPIP e NDBA) para cada fibra de extração (DVB/Car/PDMS, PDMS/DVB, PA, PDMS). As condições de extração por HS/SPME foram 0,80 g do RM-LP-NA, agitação de 250 rpm por 30 min à 35 °C.



Fonte: Adaptado de Germano *et al.* (2026).

A afinidade das NAs pelas fibras de SPME está diretamente relacionada às suas propriedades de polaridade e ao mecanismo de extração associado a cada tipo de recobrimento das fibras. Na Figura 12, observa-se que a NDBA apresenta maior resposta na fibra PDMS, o que pode ser atribuído ao seu caráter mais apolar em relação às demais NAs ($\log P = 2,561$). Nesse caso, a extração ocorre predominantemente por partição no recobrimento polimérico, mecanismo característico de fibras de PDMS (Borges, Figueiredo, Queiroz, 2015).

A fibra PDMS/DVB apresentou desempenho intermediário, com aumento progressivo da eficiência de extração para os analitos de menor polaridade, como NDPA, NPIP e NDBA. Esse comportamento decorre da polaridade intermediária do recobrimento, que favorece interações com compostos mais apolares. E considerando que a polaridade é decrescente da NDMA até a NDBA (vide $\log P$ na Tabela 1), a sua taxa de extração é crescente neste mesmo sentido devido a maior afinidade com o caráter apolar da fibra PDMS/DVB.

De modo geral, a fibra DVB/CAR/PDMS apresentou a maior afinidade para todas as seis NAs avaliadas. Esse resultado está associado ao caráter misto do recobrimento, que combina mecanismos de adsorção e partição, permitindo a retenção eficiente dos analitos mais polares (NDMA, NMEA e NDEA) por adsorção no CAR, enquanto os compostos mais apolares (NDPA, NPIP e NDBA) são extraídos predominantemente por partição no PDMS e

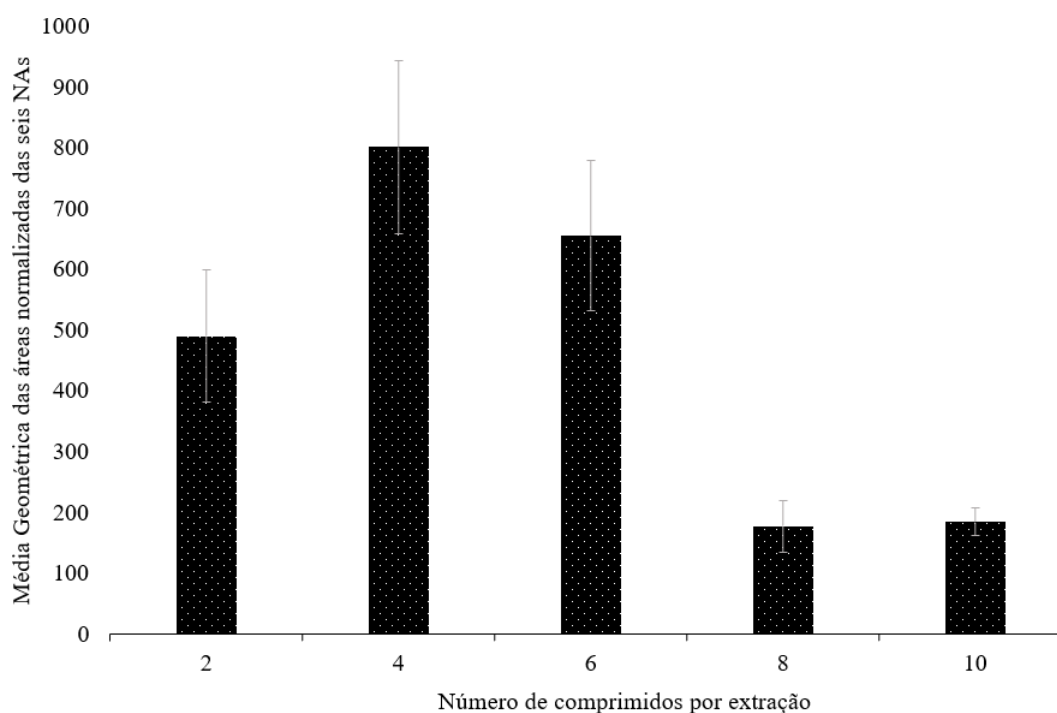
PDMS/DVB da fibra mista. Com isso, a fibra DVB/Car/PDMS apresentou a maior afinidade pelas NAs, gerando sinais mais intensos em comparação com as demais fibras. Consequentemente, essa fibra foi selecionada para os estudos subsequentes de desenvolvimento e validação do método analítico, uma vez que sua eficácia na extração de NAs em matrizes farmacêuticas também foi demonstrada por Chang *et al.* (2022) em estudos similares.

5.3.2 Seleção da quantidade de amostra

A massa da amostra sólida é uma variável crítica, devido ao potencial efeito matriz do produto farmacêutico sobre a extração das NAs. Esse fator é particularmente relevante para garantir uma agitação eficiente e a homogeneização adequada do material dentro do frasco, a fim de obter resultados confiáveis e maior eficiência de extração no preparo HS/SPME.

Nesta etapa, foram investigadas quantidades de comprimidos variando de 2 a 10 unidades, sendo 0,4 a 2,0g do RM-LP-NA. Para a otimização, foi gerado um gráfico correlacionando a média geométrica das áreas normalizadas das seis NAs com a quantidade de comprimidos utilizada na extração por HS/SPME. Os resultados estão apresentados na Figura 13.

Figura 13. Correlação da média geométrica das áreas normalizadas das seis NAs (NDMA, NMEA, NDEA, NDPA, NPIP e NDBA) para cada quantidade diferente de comprimidos (2, 4, 6, 8, 10, equivalente a 0,40, 0,80, 1,20, 1,60 e 2,00 g do RM-LP-NA) durante a extração por HS/SPME, à 35 °C, com a agitação de 250 rpm por 30 min, empregando a fibra DVB/Car/PDMS.



Fonte: Adaptado de Germano *et al.* (2026).

Pode-se observar que, à medida que a massa da amostra aumenta, ocorre uma diminuição na extração das NAs. As amostras com maior massa apresentam maior dificuldade no transporte dos analitos para o HS, o que compromete o estabelecimento do equilíbrio no sistema, e consequentemente gera taxas menores de extração.

Algumas observações experimentais associadas à reologia dos sólidos ajudam a explicar o comportamento observado. No caso, quando a quantidade de sólido é insuficiente, a ausência de material em volume adequado pode prejudicar a dinâmica de movimentação e a fluidez do sólido no interior do frasco. Esse fenômeno está relacionado às propriedades reológicas de materiais granulares, que apresentam dependência entre compactidade, deformação e resistência ao cisalhamento, influenciando a formação de zonas de estagnação ou acúmulos de partículas

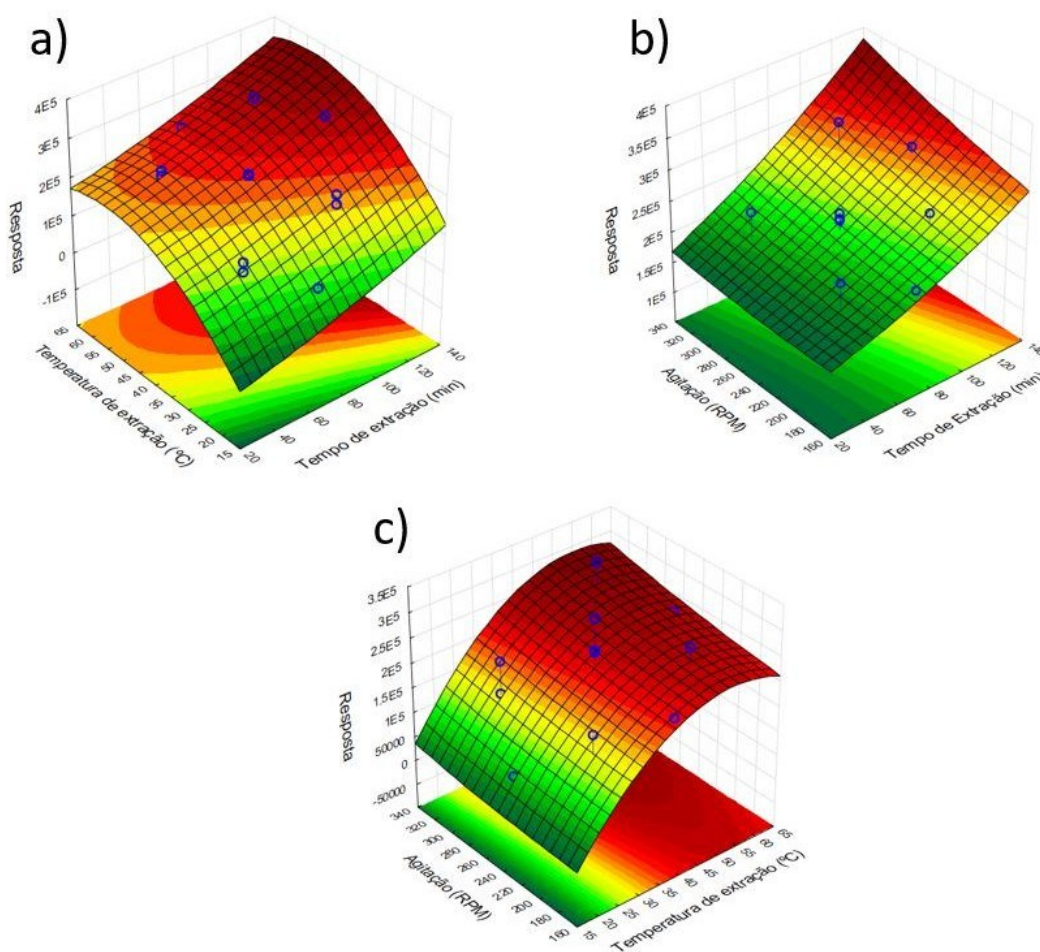
(Clément, 1999). Por outro lado, o uso de quantidades maiores dificulta a agitação eficiente, favorecendo o acúmulo de partículas nas paredes do frasco e comprometendo a homogeneização da amostra. A literatura sobre preparo de amostras sólidas para SPME reforça que a homogeneização adequada é um requisito essencial para garantir a representatividade e a eficiência do processo de extração, visto que a má distribuição do material pode comprometer a liberação dos analitos (Kudlejova; Risticovic; Vuckovic, 2012). Essa limitação pode afetar negativamente o transporte dos analitos para o HS, interferindo no equilíbrio termodinâmico entre as fases sólida (amostra), gasosa (HS) e a fibra de SPME, o que, por sua vez, reduz a eficiência de extração. Segundo a teoria de SPME, a extração é regida pelo estabelecimento de equilíbrios de partição entre matriz, HS e fibra, e sua eficiência depende diretamente da difusão adequada dos analitos até a superfície da fibra, processo que é favorecido pela agitação e pela redução de zonas de acúmulo (Pawliszyn, 2012; Lord; Bojko, 2012).

Dessa forma, considerando que a massa correspondente a quatro comprimidos resultou nas maiores eficiências de extração observadas, essa quantidade foi selecionada para os experimentos subsequentes. Essa quantidade de amostra também permitiu a ocorrência de fluidez adequada do material sólido durante a agitação, evitando acúmulos nas paredes laterais do frasco e favorecendo o transporte eficiente dos analitos para o HS, condição essencial para o alcance do equilíbrio e a maximização da extração.

5.3.3 Seleção da agitação, temperatura e tempo de extração

As variáveis agitação, temperatura e tempo de extração foram avaliadas simultaneamente usando um planejamento composto central para determinar as condições que favorecem a extração das seis NAs a partir de amostras sólidas de comprimidos de losartana durante o preparo de amostra por HS/SPME. As superfícies de resposta resultantes estão dispostas na Figura 14 (a–c).

Figura 14. Superfícies de resposta obtidas a partir do planejamento composto central para o método de HS/SPME-GC/NPD. Foi adicionado 0,8g RM-LP-NA para avaliar as variáveis agitação (167 a 333 rpm), temperatura (20 a 60 °C) e tempo de extração (30 a 120 min) com a fibra DVB/Car/PDMS. Legenda: a) Tempo de extração (min) e temperatura de extração (°C), b) Tempo de extração (min) e agitação (rpm), e c) Temperatura de extração (°C) e agitação (rpm).



Fonte: Adaptado de Germano *et al.* (2026).

O ajuste dos dados experimentais ao modelo matemático linear é indicado por um coeficiente de determinação (R^2) de 0,961, conforme derivado da tabela ANOVA (ANEXO A). Este valor confirma que o modelo linear utilizado é preditivo para este experimento. Entre os parâmetros analisados, a temperatura e o tempo de extração foram encontrados como os mais significativos. Isto corrobora ao perfis gráficos das superfícies de resposta na Figura 14 (a-c), onde aumentos tanto na temperatura quanto no tempo têm um impacto significativo na extração dos analitos do RM-LP-NA. Isto ocorre porque, em altas temperaturas, há o aumento da difusão

dos analitos, resultando em taxas de transferência de massa mais altas dos analitos presentes na matriz sólida para o HS e, posteriormente, para a fibra SPME (Pawliszyn, 2009). Esta característica aprimora o enriquecimento das NAs na análise, pois a extração se torna mais eficiente com o aumento da temperatura. No entanto, este aumento de temperatura também extrai outros interferentes da matriz, o que diminui a seletividade no cromatograma e interfere na separação cromatográfica, como verificado em cromatograma experimental. Além disso, à 60°C, ocorreu um efeito de compactação do RM-LP-NA no frasco, dificultando sua agitação. Isso pode ser relacionado a composição dos excipientes do fármaco que compõe o RM-LP-NA, como o amido pré-gelatinizado e à lactose monoidratada. O amido pré-gelatinizado pode sofrer inchamento na presença de umidade residual, o que tende a aumentar a coesão entre partículas (Rowe *et al.*, 2021; Aulton e Taylor, 2018). A lactose monoidratada contém água de cristalização, cuja liberação parcial sob temperaturas moderadas pode favorecer a ocorrência do fenômeno de *caking*, caracterizado pelo empedramento e pela perda de fluidez do pó (Rowe *et al.*, 2021; Brittain, 2016). Portanto, a temperatura de extração foi investigada na faixa de 20 a 60 °C, e respostas satisfatórias foram obtidas utilizando uma temperatura de 45 °C, conforme mostrado na Figura 14-a e Figura 14-c. Essa temperatura garante boa taxa de extração das NAs para o método, enquanto melhora a seletividade frente aos interferentes da amostra, além de manter a fluidez necessária do material sólido em pó nas análises.

A SPME é uma técnica de extração por equilíbrio, e a escolha do tempo de extração é sempre um compromisso entre duração, sensibilidade e repetibilidade do método analítico (Pawliszyn, 2009). Portanto, o tempo de extração foi variado de 30 a 120 min neste estudo, e respostas satisfatórias foram obtidas empregando o tempo de 85 min, como mostrado na Figura 14-a e Figura 14-b. Este tempo de extração garante a sensibilidade necessária exigida para aplicações subsequentes em métodos validados com limites baixos de quantificação.

O efeito da agitação foi estudado variando a velocidade do agitador de 167 a 333 rpm. De acordo com a Figura 14-b e Figura 14-c, a agitação não apresentou influência significativa na eficiência de extração. Isso pode ser atribuído às propriedades das NAs avaliadas, que apresentam baixa massa molecular e elevada volatilidade. Nessas condições, o equilíbrio de partição é atingido rapidamente, mesmo em baixas velocidades de agitação, de modo que o aumento da agitação não promove ganho adicional na transferência de massa. Assim, a agitação exerce papel secundário na eficiência de extração, sendo mais relevante para garantir a homogeneização da amostra do que para intensificar o processo extrativo.

Entretanto, observações experimentais mostraram que a agitação baixa (como 167 rpm)

leva ao acúmulo de sólido nas paredes do frasco, impedindo a homogeneização adequada da amostra. Esse comportamento pode ser explicado pelo caráter reológico dos materiais granulares, que, em baixas condições de movimentação, tendem a formar regiões de compactação e acúmulo, dificultando a redistribuição uniforme do material sólido no meio (Clément, 1999).

Por outro lado, a agitação alta (333 rpm) resultou em uma mistura vigorosa que suspendeu o sólido no HS do frasco, causando sua aderência à fibra por interação eletrostática. A literatura sobre SPME destaca que, embora a agitação seja fundamental para reduzir a espessura da camada de difusão e acelerar o transporte de massa até a fibra, agitações excessivas podem introduzir artefatos, como o contato físico de partículas sólidas com a fibra, prejudicando a seletividade do processo de extração (Pawliszyn, 2012; Lord; Bojko, 2012).

Com base nessas observações, uma taxa de agitação de 250 rpm foi selecionada para os estudos subsequentes, pois essa condição representou um ponto de equilíbrio, sendo suficiente para promover a homogeneidade da amostra e otimizar a difusão dos analitos para o HS, sem gerar efeitos indesejados de acúmulo nas paredes ou de interação direta entre partículas sólidas e a fibra. Essa escolha está alinhada com as recomendações para o desenvolvimento de métodos de SPME, que sugerem a otimização da agitação como parâmetro crítico para assegurar tanto a reprodutibilidade quanto a eficiência do processo (Kudlejova; Risticovic; Vuckovic, 2012).

Os parâmetros de 250 rpm, 85 min e 45 °C foram selecionados para o preparo de amostra por HS/SPME, a ser empregado em ambos os métodos HS/SPME-GC/NPD e HS/SPME-GC/MS, para estudos subsequentes de validação e análise de amostras reais.

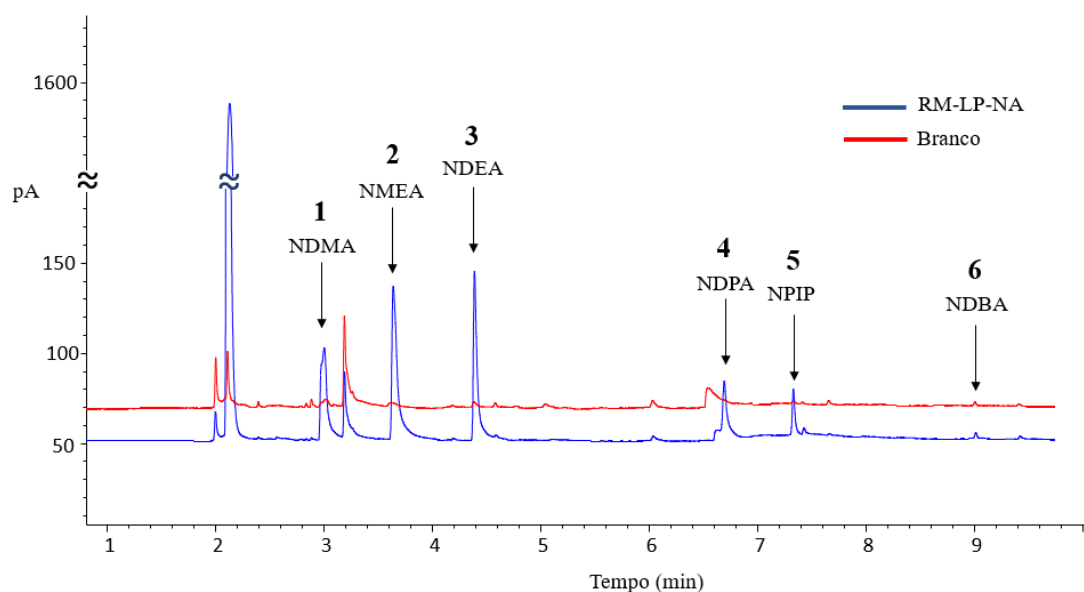
5.4 Validação dos métodos HS/SPME-GC/NPD e HS/SPME-GC/MS

Os principais parâmetros de mérito para o método proposto HS/SPME-GC/NPD para a determinação de NAs em comprimidos de losartana foram avaliados de acordo com a diretriz ICH Q2 (R2). A análise de seletividade foi realizada comparando o cromatograma do RM-LP-NA com a amostra sólida de comprimido de losartana sem adição de NAs (amostra em branco). Os métodos HS/SPME-GC/NPD (Figura 15) e HS/SPME-GC/MS (Figura 16) demonstraram boa seletividade nos cromatogramas, nos quais cada NA foi eficientemente separada dos interferentes na amostra, exceto a NDPA, que coeluiu com um interferente da matriz, e para fins de tratamento de dados posteriores a área do interferente foi subtraída.

Os demais parâmetros referentes a linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão

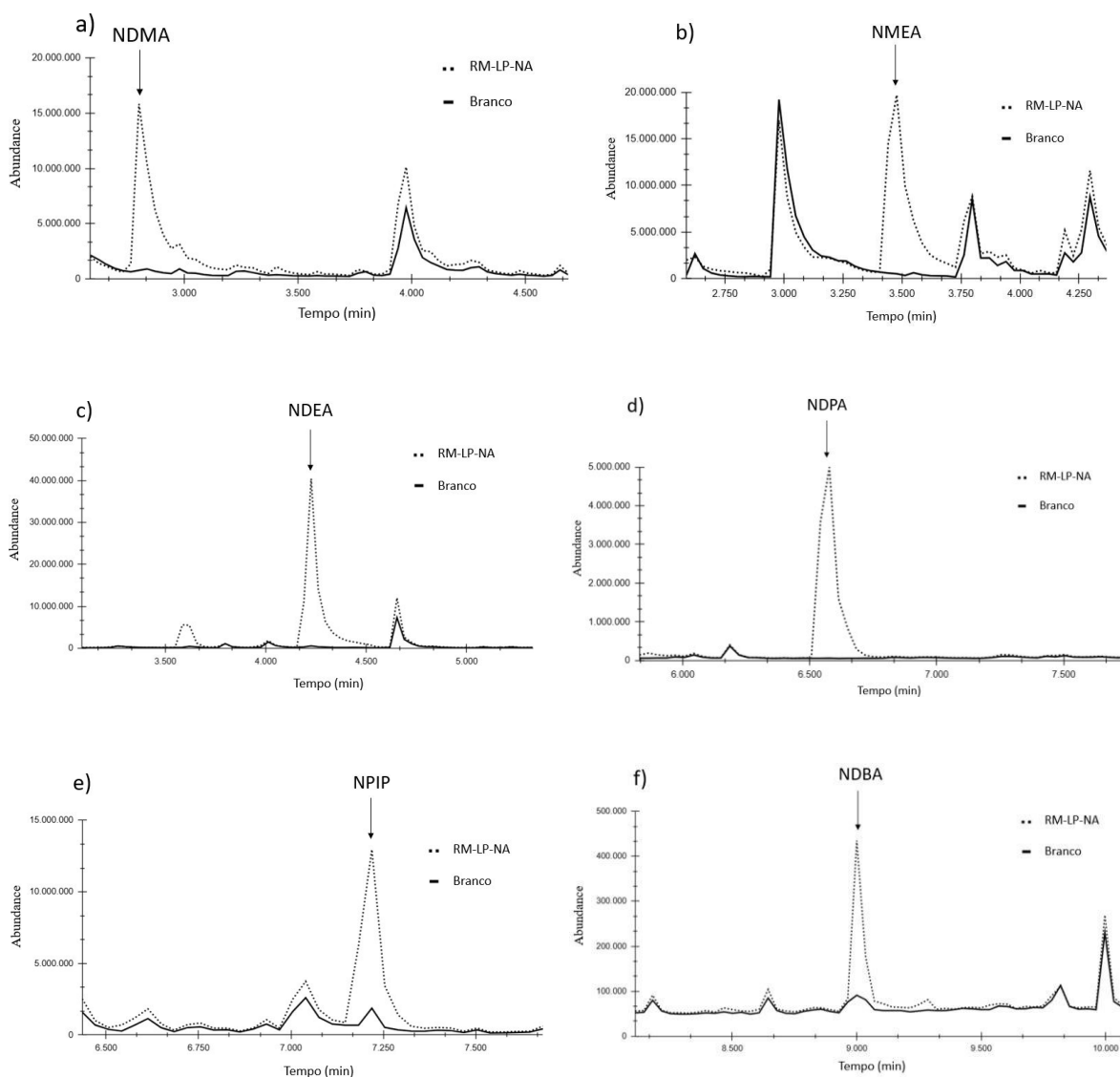
e exatidão do método foram investigados para ambos os métodos HS/SPME- GC/NPD e HS/SPME-GC/MS e estão dispostos na Tabela 12 e Tabela 13, respectivamente.

Figura 15. Comparação entre cromatogramas do RM-LP-NA na concentração das NAs de 0,056 mg kg⁻¹ e amostra isenta de NAs (branco). As extrações foram realizadas utilizando o método otimizado HS/SPME-GC/NPD. Os analitos e seus respectivos tempos de retenção são: 1 – NDMA (3,0 min), 2 – NMEA (3,66 min), 3 – NDEA (4,4 min), 4 – NDPA (6,7 min), 5 – NPIP (7,7 min) e 6 – NDBA (9,0 min). Os dados foram adquiridos utilizando o software ChemStation®.



Fonte: Adaptado de Germano *et al.* (2026).

Figura 16. Comparação entre cromatogramas (SIM) do RM-LP-NA com a concentração das NAs de $0,078 \text{ mg kg}^{-1}$ e amostra isenta de NAs (branco). As extrações foram realizadas empregando o método otimizado HS/SPME-GC/MS. Os analitos, canais de massa (m/z) para quantificação e tempos de retenção são: a) NDMA (m/z 74, 2,8 min); b) NMEA (m/z 88, 3,5 min); c) NDEA (m/z 102, 4,2 min); d) NDPA (m/z 130, 6,6 min); e) NPIP (m/z 114, 7,2 min) e f) NDBA (m/z 158, 9,0 min). Os dados foram adquiridos utilizando o software MSD ChemStation®.



Fonte: Adaptado de Germano *et al.* (2026).

Tabela 12. Figuras de mérito para o método HS/SPME-GC/NPD para a determinação de seis NAs em amostras de comprimidos de losartana.

Figuras de mérito	n ^a	Analito					
		NDMA	NMEA	NDEA	NDPA	NPIP	NDBA
Faixa linear de calibração (mg kg ⁻¹)	9	0,014 – 0,118	0,023 – 0,187	0,020 – 0,320	0,040 – 0,174	0,030 – 0,246	0,042 – 0,346
Coefficiente Angular	9	6430±150	8340±230	4560±120	2990±110	1293±35	69,0±2,5
Coefficiente Linear	9	12±11	-45±27	-136±23	-5±13	-27,5±5,4	-1,24±0,54
Coefficiente de determinação (R ²)	9	0,995	0,996	0,996	0,996	0,995	0,996
LD ^b (mg kg ⁻¹)	3	0,0001	0,0002	0,0004	0,0003	0,0015	0,0157
LQ ^c (mg kg ⁻¹)	3	0,0005	0,0006	0,0015	0,0008	0,0050	0,0519
RR ^d % (RSD %) 0,036 mg kg ⁻¹	3	79,7 (16,5)	88,3 (11,6)	105,5 (17,4)	110,5 (9,4)	113,3 (3,8)	104,4 (7,1)
RR ^d % (RSD %) 0,131 mg kg ⁻¹	3	88,5 (12,4)	100,6 (8,4)	93,3 (7,2)	112,6 (16,3)	103,3 (17,7)	121,3 (9,6)
RR ^d % (RSD %) 0,226 mg kg ⁻¹	3	109,5 (14,0)	95,9 (14,0)	111,0 (16,0)	122,0 (4,0)	117,0 (10,2)	107,8 (21,0)
Precisão Intra-dia ^e 0,036 mg kg ⁻¹	3	18,7	18,4	12,9	10,2	3,1	5,7
Precisão Intra-dia ^e 0,131 mg kg ⁻¹	3	9,9	11,5	9,7	3,7	6,5	11,7
Precisão Intra-dia ^e 0,226 mg kg ⁻¹	3	14,0	14,0	16,0	7,8	9,6	10,2
Precisão Inter-dia ^e 0,131 mg kg ⁻¹	9	16,3	15,6	13,1	12,5	17,2	14,7

^a Número de réplicas, ^b Limite de detecção calculado pela razão sinal/ruído, ^c Limite de quantificação calculado pela razão sinal/ruído, ^d Precisão obtida pela recuperação relativa (RR, %), ^e Precisão pela desvio padrão relativo (RSD, %). Fonte: Adaptado de Germano *et al.* (2026).

Tabela 13. Figuras de mérito para o método HS/SPME-GC/MS para a determinação de seis NAs em amostras de comprimidos de losartana.

Figura de mérito	n ^a	NDMA	NMEA	Analito NDEA	NDPA	NPIP	NDBA
Faixa de calibração linear (mg kg ⁻¹)	9	0,016 – 0,116	0,026 – 0,184	0,025 – 0,316	0,024 – 0,174	0,034 – 0,242	0,034 – 0,341
Coeficiente Angular	9	(16,4±0,5)×10 ⁶	(17,5±0,4)×10 ⁶	(15,2±0,5)×10 ⁶	(4,69±0,14)×10 ⁶	(4,98±0,19)×10 ⁶	(94,3±2,6)×10 ³
Coeficiente Linear	9	(121±35)×10 ³	(56±45)×10 ³	0,0	(-47±14)×10 ³	(44,5±2,9)×10 ³	687 ± 580
Coeficiente de determinação (R ²)	9	0,993	0,996	0,992	0,994	0,991	0,994
LD ^b (mg kg ⁻¹)	3	0,0016	0,0016	0,0009	0,0011	0,0037	0,0068
LQ ^c (mg kg ⁻¹)	3	0,0052	0,0052	0,0029	0,0036	0,0121	0,0225
RR ^d % (RSD %) 0,036 mg kg ⁻¹	3	88,2 (17,2)	106,0 (13,8)	82,5 (14,6)	96,8(0,8)	99,5 (12,3)	90,6 (17,7)
RR ^d % (RSD %) 0,131 mg kg ⁻¹	3	95,2(3,6)	95,8(1,9)	84,2(3,2)	81,5(4,6)	87,8 (10,2)	91,8 (12,7)
RR ^d % (RSD %) 0,226 mg kg ⁻¹	3	105,0(15,3)	84,0 (15,4)	77,0 (11,2)	94,0 (15,5)	118,0(11,9)	96(9,1)
Precisão Intra-dia ^e 0,036 mg kg ⁻¹	3	7,6	14,1	2,5	13,9	16,7	6,0
Precisão Intra-dia ^e 0,131 mg kg ⁻¹	3	7,8	7,9	2,7	12,9	13,4	12,4
Precisão Intra-dia ^e 0,226 mg kg ⁻¹	3	8,6	3,9	13,5	9,4	7,6	4,2
Precisão Inter-dia ^e 0,131 mg kg ⁻¹	9	10,7	5,9	4,6	10,7	6,3	17,4

^a Número de réplicas, ^b Limite de detecção calculado pela razão sinal/ruído, ^c Limite de quantificação calculado pela razão sinal/ruído, ^d Precisão obtida pela recuperação relativa (RR, %), ^e Precisão pela desvio padrão relativo (RSD, %). Fonte: Adaptado de Germano *et al.* (2026).

As curvas de calibração de matriz sólida com semelhança de matriz, variando de 0,014 a 0,346 mg kg⁻¹, foram analisadas para cada NA usando os métodos HS/SPME-GC/NPD (ANEXO B – Figura 1) e HS/SPME-GC/MS (ANEXO B – Figura 2). A linearidade expressa pela regressão linear demonstrou-se eficiente pelo coeficiente de determinação (R²) maior que 0,991 no intervalo investigado para as seis NAs em ambos os métodos.

A significância estatística do intercepto das curvas de calibração pelo método HS/SPME-GC/NPD foi avaliada por meio do teste t de Student ao nível de confiança de 95 %, utilizando os parâmetros obtidos por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Para todos os analitos, exceto para a NPIP (p valor = 0,0015), os valores de p foram maiores do que 0,05, e com isso considerou-se que o intercepto não é estatisticamente diferente de zero para 5 das NAs. Para o método HS/SPME-GC/MS, 4 das NAs apresentaram valores de p maiores do que 0,05, e com isso considerou-se que o intercepto não é estatisticamente diferente de zero, exceto para a NDPA (p valor = 0,0083) e NDMA (p valor = 0,011), sendo estes com intercepto significativamente diferente de zero. Isso implica que a relação entre concentração e resposta é consistente com o modelo linear passando pela origem, do ponto de vista estatístico, para 5 das NAs no método HS/SPME-GC/NPD e 4 das NAs no método HS/SPME-GC/MS. Para as NAs que obtiveram presença de intercepto estatisticamente diferente de zero, como a NPIP e NDPA e NDMA, isto pode estar associado a características específicas do analito e do sistema analítico, como possíveis contribuições de sinal de fundo ou resposta residual do sistema em baixas concentrações. Ressalta-se que, em ambos os métodos, os interceptos significativamente diferentes de zero apresentaram magnitude reduzida em relação à faixa de calibração estudada, não comprometendo a linearidade nem a aplicabilidade do método para o propósito analítico proposto.

Ambos os métodos alcançam a sensibilidade necessária para a análise proposta, com valores de limite de quantificação (LQ) variando de 0,0005 a 0,0519 mg kg⁻¹ no método HS/SPME-GC/NPD e de 0,0029 a 0,0225 mg kg⁻¹ no método HS/SPME-GC/MS. Todos os valores de LQ obtidos estão bem abaixo dos níveis máximos permitidos para as seis NAs estudadas nos comprimidos de losartana, demonstrando boa sensibilidade e adequação dos métodos, exceto para o NDBA. A NDBA apresentou limite de quantificação (LQ) de 0,052 mg kg⁻¹ no método HS/SPME-GC/NPD, sendo esse valor superior ao necessário para atender à legislação aplicável a essa NA em losartana (0,026 mg kg⁻¹). No caso da NDEA, o LQ foi de 0,0015 mg kg⁻¹ no método HS/SPME-GC/NPD, valor inferior ao limite estabelecido pela

agência reguladora brasileira ($0,0265 \text{ mg kg}^{-1}$), atendendo, portanto, à normativa vigente para a losartana (ANVISA, 2024). Dessa forma, conclui-se que o método é adequado para atender às normativas vigentes aplicáveis a cinco das NAs analisadas, com exceção da NDBA, para a qual o LQ obtido não foi suficiente para o atendimento regulatório, uma vez que a legislação estabelece o critério de 10% da ingestão aceitável diária para a losartana para a confirmação da ausência dessa NA no medicamento.

A exatidão, determinada pela recuperação relativa, mostrou um intervalo de 77 a 122% para ambos os métodos nos três níveis de concentração. De acordo com a AOAC (2016), intervalos de recuperação para análise de resíduos entre 60 e 115% são aceitáveis. Os resultados para a precisão intra-dia e inter-dia mostraram valores de RSD inferiores a 18,7% para ambos os métodos nos três níveis de concentração. Isso é considerado aceitável pois é inferior a 21%, dada a complexidade da preparação da amostra e o nível de concentração investigado (AOAC, 2016).

5.5 Análise de amostras comerciais de losartana

Treze amostras de comprimidos de losartana (F1 a F13) de diferentes fabricantes comerciais foram analisadas utilizando o método HS/SPME-GC/NPD para triagem e quantificação de NAs. Os dados experimentais estão apresentados na Tabela 14. Após a moagem, peneiração e pesagem dos comprimidos, o pó resultante foi submetido à análise direta de extração HS/SPME sem a necessidade de qualquer pré-tratamento adicional. As impurezas de NAs nos comprimidos de losartana foram facilmente extraídas diretamente das amostras sólidas.

Tabela 14. Dados experimentais das NAs em comprimidos de losartana analisados utilizando o método HS/SPME-GC/NPD para triagem e quantificação.

Código ^a	Ano de produção ^b	Concentração das NAs (mg kg ⁻¹)					
		NDMA	NMEA	NDEA	NDPA	NPIP	NDBA
F1	2021	< 0,0001	< 0,0002	<0,0015	< 0,0003	< 0,0015	< 0,0157
F2	2020	< 0,0001	< 0,0002	<0,0004	< 0,0003	< 0,0015	< 0,0157
F3	2022	< 0,0001	< 0,0002	<0,0004	< 0,0003	< 0,0015	< 0,0519
F4	2021	< 0,0001	< 0,0002	<0,0015	< 0,0003	< 0,0015	< 0,0519
F5	2021	< 0,0001	< 0,0002	<0,0015	< 0,0003	< 0,0015	< 0,0519
F6	2021	< 0,0001	< 0,0002	<0,0015	< 0,0003	< 0,0015	< 0,0519
F7	2021	< 0,0001	< 0,0002	<0,0004	< 0,0003	< 0,0015	< 0,0519
F8	2021	< 0,0001	< 0,0002	0,0442 ± 0,0004*	< 0,0003	< 0,0015	< 0,0519
F9	2022	< 0,0001	< 0,0002	<0,0015	< 0,0003	< 0,0015	< 0,0157
F10	2022	< 0,0001	< 0,0002	<0,0004	< 0,0003	< 0,0015	< 0,0519
F11	2022	< 0,0001	< 0,0002	<0,0004	< 0,0003	< 0,0015	< 0,0519
F12	2023	< 0,0001	< 0,0002	0,0492 ± 0,0049*	< 0,0003	< 0,0015	< 0,0519
F13	2024	< 0,0001	< 0,0002	<0,0004	< 0,0003	< 0,0015	< 0,0157

^a Códigos das amostras de diferentes fabricantes. Todas foram produzidas e adquiridas no Brasil.

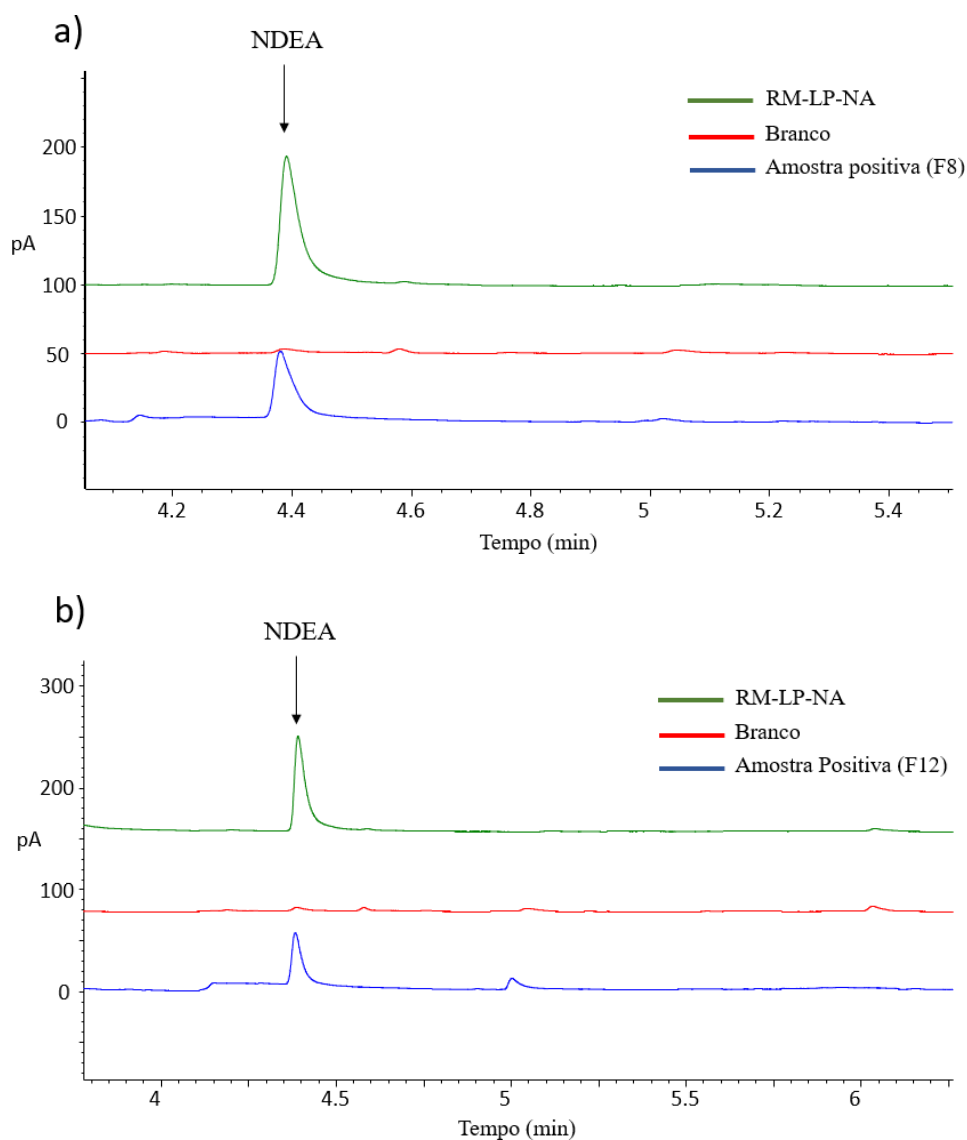
^b Informação obtida do rótulo comercial do produto farmacêutico.

* A confirmação da identidade do NDEA foi realizada empregando o método HS/SPME-GC/MS.

Fonte: Adaptado de Germano *et al.* (2026).

Não foram detectadas na triagem pelo método HS/SPME-GC/NPD as cinco NAs, NDMA, NMEA, NDPA, NPIP ou NDBA nas 13 amostras comerciais investigadas. Duas amostras, F8 e F12, indicaram a presença de NDEA na triagem. Os cromatogramas das amostras positivas para NDEA (F8 e F12) na triagem estão dispostos na Figura 17, com sobreposição aos cromatogramas de amostras com e sem a fortificação das NAs.

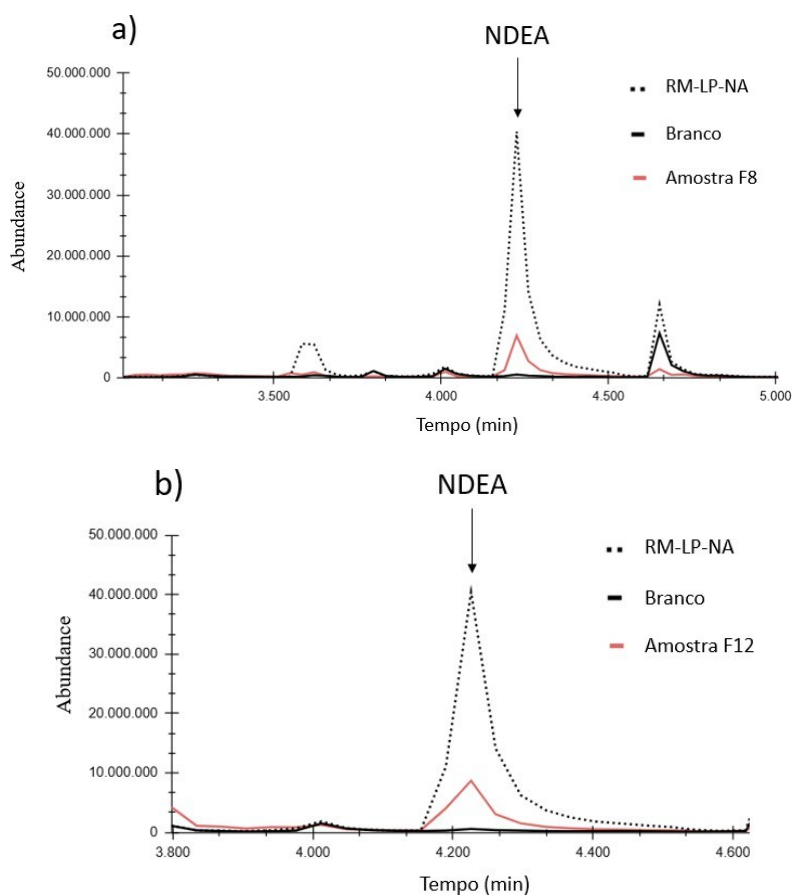
Figura 17. Cromatograma das amostras positivas para NDEA empregando o método HS/SPME-GC/NPD. A) NDEA (4,4 min) na amostra F8, b) NDEA (4,4 min) na amostra F12. A amostra fortificada está representada pelo RM-LP-NA diluído para a concentração de 0,056 mg kg⁻¹ de NDEA, e a amostra em branco é a amostra sólida de comprimido de losartana sem NAs. Os dados foram adquiridos pelo software *ChemStation*[®].



Fonte: Adaptado de Germano *et al.* (2026).

Considerando o risco de falso positivo pelo método de triagem, onde possíveis interferentes podem aparecer no mesmo tempo de retenção do analito, as mesmas amostras foram reanalisadas pelo método HS/SPME-GC/MS a fim de confirmar a presença inequívoca deste analito. A análise confirmatória indicou a presença de NDEA em ambas as amostras conforme observado na Figura 18. Esta confirmação empregando o método HS/SPME- GC/MS demonstra a eficácia do método HS/SPME-GC/NPD em identificar com precisão e exatidão o composto NDEA.

Figura 18. Cromatograma GC/MS (SIM) das amostras positivas para NDEA confirmadas utilizando o método otimizado e validado HS/SPME-GC/MS. A) NDEA (m/z 102, 4,2 min) na amostra F8, b) NDEA (m/z 102, 4,2 min) na amostra F12. A amostra RM-LP-NA é a amostra diluída para 0,078 mg kg⁻¹ de NDEA, e a amostra em branco é a amostra sólida de comprimido de losartana sem adição de NAs. Os dados foram adquiridos utilizando o software MSD *ChemStation*[®].



Fonte: Adaptado de Germano *et al.* (2026).

A presença da NDEA é considerada quando a sua concentração está acima do limite correspondente a 10% da IAD de NDEA para a losartana, o qual é $0,0265 \text{ mg kg}^{-1}$. As concentrações de NDEA detectadas nas amostras F8 ($0,0442 \pm 0,0004 \text{ mg kg}^{-1}$) e F12 ($0,0492 \pm 0,0049 \text{ mg kg}^{-1}$) excederam em aproximadamente 1,8 vezes o limite estabelecido pela ANVISA. Nesses casos, a presença da NDEA foi confirmada, indicando a necessidade de adoção de ações corretivas por parte do fabricante em relação a essas impurezas nos produtos. Esse resultado correlaciona-se com o fato de que a amostra F8 foi coletada durante um período de *recall*. A ação de *recall* constituiu uma estratégia de mitigação para tratar a contaminação do produto, promovendo sua retirada do mercado em razão da presença de NAs no período em que o medicamento foi comercializado, em 2022 (Monteiro *et al.*, 2023; *O Globo*, 2022; R7, 2022; ANVISA, 2024). Essa informação indica que o método HS/SPME-GC/NPD é capaz de fornecer resultados compatíveis com aqueles obtidos pela empresa fabricante do medicamento à época de sua produção e posterior recolhimento do mercado.

A amostra F8 é um medicamento genérico, conforme a Lei nº 9.787, de 1999 (Brasil, 1999), enquanto a amostra F12 corresponde a um medicamento de marca registrada, sendo este último geralmente precificado com valores superiores aos dos medicamentos genéricos. Essa observação sugere que produtores de qualquer categoria, independentemente da forma de produção, comercialização e precificação, podem estar sujeitos à presença de NAs. As amostras que testaram positivo para NDEA, F8 e F12, foram produzidas em 2021 e 2023, respectivamente, indicando que, apesar das medidas adotadas para a amostra F8, o monitoramento contínuo permanece necessário ao longo dos anos. Para esse propósito, o método HS/SPME-GC/NPD é altamente útil para a triagem de um grande número de amostras, em razão de seu baixo custo. No entanto, caso a presença de alguma NA seja identificada em uma amostra analisada por esse método de triagem, recomenda-se a aplicação de uma técnica confirmatória, como HS/SPME-GC/MS, para confirmar a identidade dos resultados positivos. Essa etapa é essencial para garantir a precisão das medições e subsidiar decisões adequadas de mitigação quanto à presença desses compostos.

5.6 Avaliação do caráter verde do método HS/SPME-GC/NPD

Quanto ao alinhamento do método HS/SPME-GC/NPD aos princípios da GAC, este foi avaliado empregando a AGREE (Pena-Pereira *et al.*, 2020). A ferramenta AGREE foi desenvolvida em 2020 e avalia o caráter verde de procedimentos analíticos considerando os doze princípios da GAC sugeridos por Galuska *et al.* (2013). Esta ferramenta considera diversos aspectos, incluindo amostragem, preparação da amostra, toxicidade de solventes/reagentes, geração de resíduos e instrumentação analítica.

O método HS/SPME-GC/NPD desenvolvido neste trabalho demonstra um ótimo caráter verde (Figura 19), com uma pontuação final de 0,64, a qual é muito próxima ao valor de 1,0, que descreve uma excelente sustentabilidade ambiental.

Figura 19. Resultado da avaliação do caráter verde do método HS/SPME-GC/NPD empregando a calculadora AGREE para a determinação de seis NAs em comprimidos de losartana. As variáveis de 1 a 12 representam os princípios GAC. A escala de cores vermelho–amarelo–verde indica o grau de sustentabilidade do método, onde o valor 1, representado pelo verde escuro, corresponde a um procedimento mais sustentável, e o valor 0, representado pelo vermelho, indica um procedimento menos sustentável.



Fonte: Germano *et al.* (2026).

Na Figura 19, observa-se que o maior impacto negativo no caráter verde do método está relacionado aos princípios 1, 3, 5, 8 e 9 da GAC.

Os princípios 1 e 3 foram penalizados, uma vez que o método requer que a análise seja

realizada em laboratório, com pré-tratamento e quatro etapas de preparo da amostra, o que implica perda de pontuação. Esses princípios priorizam evitar o tratamento da amostra e, sempre que possível, realizar medições *in situ*. No caso, conduzir a amostra em um laboratório é uma característica da análise farmacêutica em laboratórios de pesquisa, principalmente no caso da análise de produtos acabados em que o comprimido já saiu da linha de produção e precisa ser realizado o controle de qualidade do produto.

O princípio 5 está relacionado à preferência por métodos automatizados e miniaturizados. No presente método, o preparo e a extração são realizados manualmente, com o auxílio de um suporte para a fibra empregada na extração das NAs, não sendo automatizado. Apesar disso, a técnica apresenta o atributo de miniaturização, o que contribui para a redução da penalidade atribuída a este princípio.

O princípio 8 refere-se à adoção de métodos multianalitos, considerados preferíveis aos métodos de análise de um único analito. Neste caso, seis analitos são determinados em uma única leitura no GC, caracterizando o método como multianalito. No entanto, o tempo de preparo por amostra ultrapassa uma hora, sendo a extração a etapa mais demorada (85 min). Esse tempo prolongado impacta negativamente a frequência analítica do método, porém este tempo é necessário visto que o limite de quantificação requerido para atender a legislação depende diretamente do tempo de extração. Uma alternativa para melhorar o desempenho deste método em futuras aplicações é o emprego de análises em paralelo, permitindo realizar mais de uma análise por vez (Carasek *et al.*, 2025).

O princípio 9 está associado ao consumo de energia, o qual deve ser minimizado. Foi considerado o consumo energético relacionado ao uso do GC, reconhecido por sua alta demanda energética. Ainda assim, esse consumo é inferior ao observado em métodos acoplados a espectrômetros de massas, técnicas comumente empregadas para os mesmos analitos, o que representa uma leve vantagem comparativa.

Por outro lado, os princípios 2, 4, 6, 7, 10, 11 e 12 apresentaram maior alinhamento ao método, refletindo maior conformidade com o caráter verde. Os princípios 2 e 7 estão relacionados, respectivamente, ao baixo consumo de amostra e à baixa geração de resíduos. No presente método, utiliza-se 0,8 g de amostra, que corresponde ao próprio resíduo gerado posterior a análise. Como não há uso de solventes de qualquer natureza, o gerenciamento do resíduo sólido torna-se mais simples e seguro.

Os princípios 6 e 11 dizem respeito ao uso de agentes derivatizantes e reagentes tóxicos,

os quais devem ser evitados. O método avaliado não emprega nenhuma destas substâncias, o que reforça seu perfil sustentável. O princípio 10, que prioriza o uso de reagentes provenientes de fontes renováveis, também é contemplado, uma vez que o método não requer reagentes. O princípio 12, por sua vez, trata da segurança do operador, e é igualmente atendido pela ausência de substâncias tóxicas, o que reduz significativamente a exposição ocupacional a agentes perigosos. Estes atributos fortalecem o caráter verde do método analisado.

De forma geral, embora existam fatores que se desalinhem parcialmente aos princípios da Química Verde, majoritariamente os princípios são amplamente alinhados ao método, caracterizando uma pontuação final de 0,64, caracterizando o método como verde na aplicação de análises de NAs em medicamentos sólidos.

5.7 Comparação dos métodos com trabalhos da literatura

Existem vários métodos descritos na literatura para a análise de NAs em produtos farmacêuticos, que diferem em termos de técnicas de preparo de amostras e instrumentação (Tabela 15). Considerando os diferentes avanços metodológicos, convém investigar as vantagens relacionadas ao presente método proposto com as diferentes metodologias já desenvolvidas, buscando encontrar melhorias e lacunas nas investigações.

Tabela 15. Comparação do método proposto com outros métodos reportados para determinação de NAs em produtos farmacêuticos.

Instrumento ^a	Amostra	Preparo de amostra	NAs	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ^b	Recuperação (%) ^c	Precisão ^d	Referência
GC/NPD	Metformina HCl	FE/SHS	NDMA	0,25	85 a 108	4 a 6	Zheng <i>et al.</i> (2022)
GC/MS	Ranitidina, nizatidina, metformina, paracetamol, clorfeniramina, difenidramina e clonixina.	SF/HS	NDMA	5	92,77 a 106,54	< 5,94	Lee <i>et al.</i> (2021)
GC/MS/MS	Valsartana, irbesartana, pimasartana, rosartana, olmesartana, candesartana, metformina, ranitidina	SPE	NDMA, NDEA	0,9 (NDMA) 0,3 (NDEA)	95,0 a 105 (NDMA) e 93,6 a 104 (NDEA)	0,4 a 2,7 (NDMA) e 0,4 e 4,2 (NDEA)	Lim <i>et al.</i> (2020)
GC/MS	Ranitidina	HS/SPME	NDMA	5	918 a 94,9	3 a 20	Alshehri <i>et al.</i> (2020)
GC/MS/MS	Ranitidina, metformina e sartanas	HS/SPME	NDBA, NDEA, NDMA, NDPA, NEIPA, NdiPA, NDPhA, NMOR, NPYR, NPIP, NdiBA, NDINA, NDCHA, NMEA	50,0	86,5 a 113,9	0,8 a 10,3	Chang <i>et al.</i> (2022)
GC/MS	Losartana	HS/SPME	NDMA, NMEA, NDEA, NDPA, NPIP, NDBA	5,0 a 22	77 a 118	2,5 a 17,4	Presente estudo
GC/NPD	Losartana	HS/SPME	NDMA, NMEA, NDEA, NDPA, NPIP, NDBA	0,5 a 50	79,7 a 122	3,7 a 18,7	Presente estudo

^a Método de separação para a detecção de NAs.

^b Limite de quantificação calculado pela razão sinal/ruído.

^c Exatidão obtida pela recuperação relativa (RR, %).

^d Precisão pelo desvio padrão relativo (RSD, %).

Fonte: Adaptado de Germano *et al.* (2026).

Entre as técnicas baseadas em cromatografia gasosa empregadas, o espectrômetro de massa (MS) é o detector mais amplamente utilizado entre as metodologias, sendo um diferencial para o presente trabalho o emprego do detector NPD, considerando seu baixo custo. Zheng *et al* (2022) também utilizaram um sistema GC/NPD, alcançando o LQ de 0,25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a NDMA estudada. No presente estudo, foi alcançado o LQ de 0,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a NDMA, demonstrando sensibilidade próxima, mesmo empregando técnicas de preparo de amostras diferentes (FE/SHS e HS/SPME) em matrizes diferentes (metformina e losartana). A NDMA é a NA mais estudada, estando presente na maioria dos métodos e sendo exclusivamente estudada em algumas pesquisas devido à alta toxicidade (Zheng *et al.*, 2022; Lee *et al.*, 2021; Alshehri *et al.*, 2020).

No presente estudo, a ausência de uso de solvente para a extração dos analitos e a manipulação reduzida da amostra no preparo de amostra baseado em HS/SPME é o que o diferencia das outras metodologias (Zheng *et al.*, 2022; Wichitnithad *et al.*, 2021; Lim *et al.*, 2020; Alshehri *et al.*, 2020; Chang *et al.*, 2022). Chang *et al* (2022) desenvolveram um método HS/SPME-GC/MS/MS que envolveu manipulação extensiva da amostra antes da análise, incluindo sonicação, centrifugação e filtração. No caso de Lim *et al.* (2020), em seus estudos empregaram um cartucho de extração em fase sólida (SPE) para extrair os analitos, o que exigiu várias etapas antes da análise e uso de grande quantidade de solventes orgânicos. Com isso, observa-se que o preparo de amostra no presente estudo é simplificado e envolve menor manipulação da amostra, tendo em vista que foi realizada análise direta da amostra sólida. Essa abordagem representa uma melhoria notável, pois reduz a manipulação da amostra, a qual pode diminuir as perdas de analitos voláteis, além de ser mais ambientalmente amigável ao eliminar o uso de solventes do que os demais métodos comparativos.

No presente estudo, foi empregado um material de referência que simula melhor uma amostra real contendo NAs para mimetizar uma extração dos analitos em uma amostra sem adição de solventes no preparo e amostra. Em comparação aos estudos de Lee *et al.* (2021), que também propuseram uma metodologia sem solventes (SF/HS) acoplada a um sistema GC/MS, eles prepararam curvas de calibração adicionando diretamente soluções estoque contendo as NAs a produtos farmacêuticos sólidos para avaliar a linearidade da curva de calibração de seu método SF/HS-GC/MS. Nesse caso, a amostra não se assemelhava de forma próxima a uma amostra real contaminada, pois os analitos não estavam dispersos de forma homogênea na amostra sólida. Isso poderia afetar o transporte dos analitos para o HS e talvez não representar

adequadamente a amostra contaminada real. Portanto, o material de referência utilizado no presente estudo está mais alinhado com as condições reais de uma amostra, garantindo um transporte mais eficiente dos analitos da matriz para o HS no caso da análise direta das amostras sólidas e com isso uma validação metodológica mais confiável.

O método HS/SPME-GC/NPD alcançou um LQ de $0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ para a NDMA, sendo este valor mais baixo do que de outras metodologias, e com isso uma melhoria na sensibilidade quando comparado a outros estudos. Este método alcançou um valor de LQ 10 vezes mais baixo do que o LQ ($5 \mu\text{g kg}^{-1}$) alcançado para NDMA por Alshehri *et al.* (2020), que desenvolveram um método HS/SPME-GC/MS empregando uma fibra de extração diferente do presente método, a fibra de poliacrilato (PA). Da mesma forma, o método apresentado neste estudo obteve valores de LQ para NDMA 100 vezes mais baixos em comparação com o método HS/SPME-GC/MS/MS desenvolvido por Chang *et al.* (2022), que utilizaram a mesma fibra de extração SPME, a fibra de DVB/Car/PDMS. Esses resultados destacam a alta sensibilidade do sistema GC/NPD alcançada neste estudo.

O método HS/SPME-GC/NPD obteve valores aceitáveis para os parâmetros de validação, de acordo com outros métodos que também foram validados conforme as diretrizes da ICH e demonstraram precisão e exatidão aceitáveis em todos os métodos comparados.

6. CONCLUSÃO

No presente estudo foi possível obter um material de referência (RM-LP-NA) com homogeneidade e estabilidade dos analitos adequadas para o estudo, e com a concentração das NAs determinada por método farmacopeico adaptado e validado para garantir confiabilidade nos resultados dos ensaios. Para a determinação instrumental das seis NAs investigadas, foram empregados métodos cromatográficos via GC/NPD e GC/MS, os quais alcançaram eficiente separação entre as seis NAs nas condições selecionadas. Os parâmetros do preparo de amostras isento de solvente (HS/SPME) foram otimizados para alcançar condições ideais de extração, incluindo a seleção da fibra DVB/Car/PDMS, análise de 0,8 g de amostra, agitação da amostra sólida à 250 rpm, tempo de extração de 85 min e temperatura de extração de 45 °C. O método HS/SPME-GC/NPD foi validado, apresentando parâmetros adequados de linearidade, precisão e exatidão com limites de quantificação, em geral, inferiores à legislação. O método HS/SPME-GC/NPD validado foi empregado como método de triagem para investigação de NAs em treze amostras comerciais, e este detectou a NDEA em duas amostras. A identidade da NDEA foi confirmada pelo emprego do método complementar HS/SPME-GC/MS, indicando confiabilidade do resultado prévio pelo método HS/SPME-GC/NPD.

O caráter verde do método HS/SPME-GC/NPD foi avaliado por meio da calculadora AGREE, que confirmou sua conformidade com os princípios da GAC apresentando score de 0,64. O método desenvolvido destaca-se por seu perfil ambientalmente favorável, atribuído à ausência do uso de solventes, além de sua simplicidade operacional e baixo custo. Essa abordagem permite a determinação simultânea de seis NAs por meio da análise direta de amostras sólidas de comprimidos de losartana, sem necessidade de etapas complexas de preparo. O método de triagem desenvolvido atende os limites definidos pela legislação e apresenta excelente sensibilidade em comparação a outros estudos da literatura.

7. PERSPECTIVAS

O método HS/SPME-GC/NPD pode ser adequado para investigações relacionadas à presença de NAs em uma ampla gama de matrizes sólidas, como IFAs puros ou produtos farmacêuticos acabados, sendo necessárias novas validações para as diferentes matrizes investigadas. Sua aplicação é útil tanto no monitoramento durante a produção quanto na análise de amostras disponíveis no mercado, podendo ser facilmente implementado em rotinas de controle de qualidade em ambientes industriais e laboratoriais.

Caso seja necessária a produção do RM-LP-NA, ou de outro material de referência, em trabalhos futuros que deem continuidade a este estudo, o material produzido pode ser avaliado em períodos mais longos de armazenamento (1 a 2 anos), a fim de obter dados de estabilidade que atendam aos requisitos da ISO 33405:2024, a qual estabelece critérios associados à caracterização da homogeneidade e estabilidade de materiais de referência, bem como da ISO 17034:2016, que padroniza os requisitos gerais de competência dos produtores de materiais de referência (ISO, 2016; ISO, 2024).

Considerando a dificuldade de obtenção comercial de materiais de referência e a consequente necessidade de produzi-los para a construção de curvas de calibração nas aplicações do método HS/SPME-GC/NPD, uma alternativa para a quantificação de amostras sem a utilização desses materiais é o emprego da técnica denominada Microextração em Fase Sólida com Injeções Múltiplas do *Headspace* (MHS/SPME, do inglês *Multiple Headspace Solid-Phase Microextraction*). Essa metodologia já vem sendo empregada na literatura, como descrito por Pizarro *et al.* (2007), e consiste na extração sequencial dos analitos por HS/SPME em um mesmo frasco até que estes sejam completamente extraídos, considerando-se a natureza não exaustiva da SPME em uma única extração. Dessa forma, a área total do analito é obtida sem interferência da matriz da amostra, e a calibração pode ser realizada por injeção de padrões líquidos, dispensando o uso de curvas baseadas em diluições sólido-sólido com o RM-LP-NA. Assim, o método alternativo MHS/SPME pode ser explorado em pesquisas futuras como uma estratégia para reduzir ou substituir a necessidade do uso de materiais de referência.

8. REFERÊNCIAS

- Alshehri, Y. M., Alghamdi, T. S., Aldawsari, F. S. HS-SPME-GC/MS as an alternative method for NDMA analysis in ranitidine products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 191, 2020.
- Amayreh, M. Determination of N-nitrosamines in water by automated headspace solid-phase microextraction. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 44(1), 269–278, 2019.
- Anastas, P., Eghbali, N. Green Chemistry: Principles and Practice. *Chemical Society Reviews*, 39, 301–312, 2010.
- Andrade, R., Reyes, F. G. R., Rath, S. A method for the determination of volatile N-nitrosamines in food by HS-SPME-GC-TEA. *Food Chemistry*, 91(1), 173–179, 2005.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Anvisa lança programa de monitoramento de nitrosaminas. 2020a. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2020/anvisa-lanca-programa-de-monitoramento-de-nitrosaminas>. Acessado em: 15 Janeiro 2022.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Suspensa importação do insumo farmacêutico ranitidina. 2020b. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2019/suspensa-importacao-do-insumo-farmacutico-ranitidina>. Acessado em: 15 Janeiro 2022.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Adoção de medidas para medicamentos para pressão alta. 2020c. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2019/adocao-de-medidas-para-medicamentos-para-pressao-alta>. Acessado em: 10 janeiro 2022.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC nº 494, de 15 de abril de 2021. Diário Oficial da União: seção 1, Ed. 74, p. 237. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-494-de-15-de-abril-de-2021-315224985>. Acessado em: 15 novembro 2021.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC nº 283, de 17 de maio de 2019. Dispõe sobre investigação, controle e eliminação de nitrosaminas potencialmente carcinogênicas em antagonistas de receptor de angiotensina II. Diário Oficial da União: seção 1, Ed. 97, p. 61. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-283-de-17-de-maio-de-2019-118357341>. Acessado em: 15 novembro 2021.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC nº 677, de 28 de abril de 2022. Dispõe sobre avaliação de risco e controle de N-Nitrosaminas potencialmente carcinogênicas em Insumos Farmacêuticos Ativos (IFA) e medicamentos de uso humano. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6279847/RDC_677_2022_.pdf/39723d56-

[7fd4-4f1a-af2d-218358d67540](#). Acessado em: 17 julho 2023.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2017/rdc0166_24_07_2017.pdf. Acessado em: 25 julho 2024.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia sobre o Controle de Nitrosaminas em Insumos Farmacêuticos Ativos e Medicamentos. Guia nº 50/2021 – versão 1. 2021b. Disponível em: [http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6279847/\(1\)Guia_50_Nitrosaminas_rev_fi_nal_para+publica%C3%A7%C3%A3o.pdf/12af2904-e5a7-4774-9528-f4f633cac2bf](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6279847/(1)Guia_50_Nitrosaminas_rev_fi_nal_para+publica%C3%A7%C3%A3o.pdf/12af2904-e5a7-4774-9528-f4f633cac2bf). Acessado em: 15 dezembro 2021.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia sobre o Controle de Nitrosaminas em Insumos Farmacêuticos Ativos e Medicamentos. Guia nº 50/2021 – versão 3. 2023. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6279847/Guia_50_vers%C3%A3o+3_12+06+23.pdf/fb31d2c8-16cc-4176-9578-bf85d9dea053. Acessado em: 07 agosto 2023.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia sobre o Controle de Nitrosaminas em Insumos Farmacêuticos Ativos e Medicamentos. Guia nº 50/2021 – versão 4. 2024. Disponível em: <https://anexosportal.datalegis.net/arquivos/1860881.pdf>. Acessado em: 07 agosto 2025.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official Methods of Analysis: Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. AOAC International: Maryland. 2016.

Arthur, C. L., Pawliszyn, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, 62, 2145–2148, 1990.

Ashworth, I. W., *et al.* Potential for the formation of N-Nitrosamines during the manufacture of active pharmaceutical ingredients: An assessment of the risk posed by trace nitrite in water. *Organic Process Research and Development*, 24(9), 1629–1646, 2020.

Aulton, M. E.; Taylor, K. Aulton's pharmaceuticals: the design and manufacture of medicines. 5. ed. London: Elsevier, 2018.

Bahrani, S. H., Raofie, F. Supercritical fluid extraction assisted by magnetic solid-phase extraction method using MWCNTs/Fe₃O₄@coPANI-PTH as preconcentration and gas chromatography mass spectrometry analysis for determining nitrosamines in valsartan and losartan tablets. *Journal of Chromatography A*, 1756, 2025.

Batista Junior, A. C., Rocha, Y. A., Chaves, A. R. Miniaturized sample preparation strategies for the determination of N-nitrosamines in pharmaceutical products: A comprehensive

review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Open*, 6, 2025.

Borges, K. B., Figueiredo, E. C., Queiroz, M. E. C. Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos. 1ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015.

Brasil. (1999). Lei Nº. 9,787, 10 de fevereiro de 1999: Estabelece o medicamento genérico. Diário Oficial da União. Brasília. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19787.htm. Acessado em: 21 janeiro 2025

Brittain, H. G. Polymorphism in pharmaceutical solids. 2. ed. New York: Informa Healthcare, 2016.

Byrd, J. B., Chertow, G. M., Bhalla, V. Hypertension hot potato – Anatomy of the angiotensin-receptor blocker recalls. *The New England Journal of Medicine*, 380, 1589– 1591, 2019.

Carasek, E., Santos, A. V., Turazzi, F. C., Morés, L., Effting, L., Barra, G. M. de O. Recent trends in the development of green analytical sample preparation methods using advanced materials. *Journal of Separation Science*, 48(5), 2025.

Carlos, G., Martini, P. R. R., Machioli, L. F., Garcia, C. V., Paim, C. S., de Oliveira, T. F., Mendez, A. S. L. Development of a sensitive LC-MS/MS method for simultaneous determination of three nitrosamines in losartan API and assessment of nitrosamines formation. *Microchemical Journal*, 208, 2025.

Chemical Abstracts Service (CAS). SciFinder[®]: Base de dados. Disponível em: <https://scifinder-n.cas.org>. Acessado em: 10 dezembro 2025.

Charoo, N. A., Dharani, S., Khan, M. A., Rahman, Z. Nitroso impurities in drug products: An overview of risk assessment, regulatory milieu, and control strategy. *AAPS PharmSciTech*, 24(2), 2023.

Chang, S. H., Ho, H. Y., Chang, C. C., Zang, C. Z., Hsu, Y. H., Lin, M. C., Tseng, S. H., Wang, D. Y. Evaluation and optimization of a HS-SPME-assisted GC-MS/MS method for monitoring nitrosamine impurities in diverse pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 221, 2022.

Chang, S. H., *et al.* Screening of nitrosamine impurities in sartan pharmaceuticals by GC-MS/MS. *Mass Spectrometry Letters*, 12(2), 31–40, 2021.

Chen, Y., Xia, L., Liang, R., Lu, Z., Li, L., Huo, B., Li, G., Hu, Y. Advanced materials for sample preparation in recent decade. *TrAC – Trends in Analytical Chemistry*, 120, 2019.

Clément, E. Rheology of granular media. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 4, p. 294-299, 1999.

Collins, C. H., Braga, G. L., Bonato, P. S. Fundamentos de cromatografia. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2006.

- Feng, D., *et al.* Evaluation of simulant migration of volatile nitrosamines from latex gloves and balloons by HS-SPME-GC-MS. *Journal of Chromatographic Science*, 50(8), 733– 738, 2012.
- Fritzsche, M., *et al.* NDMA analytics in metformin products: Comparison of methods and pitfalls. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 168, 106026, 2022.
- Gan, P., Zhang, X., Wang, Y., Zhou, Q., Zou, X. Salt-assisted liquid-liquid microextraction-programmed temperature vaporizer-gas chromatography-tandem Q-Exactive Orbitrap mass spectrometry for simultaneous analysis of sixteen nitrosamines in drinking water. *Talanta*, 296, 2026.
- Galuszka, A., Migaszewski, Z., Namieśnik, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC – Trends in Analytical Chemistry*, 50, 78384, 2013.
- Germano, A. T., Micke, G. A., Vitali, L. A novel green HS/SPME-GC/NPD method for screening and quantification of nitrosamines in solid samples: Application to losartan tablets. *Talanta*, 296, 128514, 2026.
- Giménez-Campillo, C., Pastor-Belda, M., Campillo, N., Hernández-Córdoba, M., Viñas, P. 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.
- Golob, N., Grahek, R., Ross, M., Roškar, R. Nitrocellulose blister material as a source of N-nitrosamine contamination of pharmaceutical drug products. *International Journal of Pharmaceutics*, 618, 2022.
- Gonzalez-Alatorre, G., *et al.* Quantification of N-Nitrosamines in white wine using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry*, 75(4), 519–525, 2020.
- Grebel, J. E., Suffet, I. H. (Mel). Nitrogen-phosphorus detection and nitrogen chemiluminescence detection of volatile nitrosamines in water matrices: Optimization and performance comparison. *Journal of Chromatography A*, 1175, 141–144, 2007.
- Horne, S., *et al.* Regulatory experiences with root causes and risk factors for nitrosamine impurities in pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 112, 1166–1182, 2023.
- Hypertension. World Health Organization (WHO). 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hypertension>. Acessado em: 4 janeiro 2025.
- ICH - International council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use. ICH Q2(R2) – Validation of analytical procedures: harmonised guideline. 2023. Disponível em

https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q2%28R2%29_Guideline_2023_1130.pdf

. Acessado em: 14 dezembro 2024

- ISO - International Organization for Standardization. ISO 33405:2024 - Reference materials: Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability. Genebra, 2024.
- ISO - International Organization for Standardization. ISO 17034:2016 - General requirements for the competence of reference material producers. Genebra, 2016.
- Jurado-Sánchez, B., Ballesteros, E., Gallego, M.. Comparison of the sensitivities of seven N-nitrosamines in pre-screened waters using an automated preconcentration system and gas chromatography with different detectors. *Journal of Chromatography A*, 1154(1–2), 66–73, 2007.
- Krug, F. J. Métodos de preparos de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. 1ª ed., 340 p., Piracicaba, 2008.
- Kruhlak, N. L., *et al.* Determining recommended acceptable intake limits for N-nitrosamine impurities in pharmaceuticals: Development and application of the Carcinogenic Potency Categorization Approach (CPCA). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 150, 2024.
- Kudlejova, L.; Risticvic, S.; Vuckovic, D. Solid-phase microextraction method development. In: PAWLISZYN, J. (org.). *Handbook of Solid Phase Microextraction*. Oxford: Elsevier, 2012. p. 201-239.
- Kurfürst, U. Solid Sample Analysis. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 423 p., 1998.
- Lee, D. H., Hwang, S. H., Park, S., Lee, J., Oh, H. B., Han, S. B., Liu, K. H., Lee, Y. M., Pyo, H. S., Hong, J. A solvent-free headspace GC/MS method for sensitive screening of N-nitrosodimethylamine in drug products. *Analytical Methods*, 13, 3402–3409, 2021.
- Lemke, T. L., Williams, D. A., Roche, V. F., Zito, S. W. Foye's Principles of Medicinal Chemistry. 7ª ed., 2013.
- Li, K., *et al.* Estimated cancer risks associated with nitrosamine contamination in commonly used medications. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(18), 2021.
- Lim, H. H., Oh, Y. S., Shin, H. S. 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. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 189, 113460, 2020.
- Liu, J., *et al.* Development of a sensitive and stable GC-MS/MS method for simultaneous determination of four N-nitrosamine genotoxic impurities in sartan substances. *Journal*

of Analytical Science and Technology, 12(1), 2021.

- Llop, A., Borrull, F., Pocurull, E. Fully automated determination of N-nitrosamines in environmental waters by headspace solid-phase microextraction followed by GC-MS/MS. *Journal of Separation Science*, 33(23–24), 3692–3700, 2010.
- Locke, G. R., Talley, N. J., Fett, S. L., Zinsmeister, A. R., Melton, L. J. Prevalence and clinical spectrum of gastroesophageal reflux: A population-based study in Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterology*, 112, 1448–1456, 1997.
- Lona-Ramirez, F. J., *et al.* Gas chromatography/mass spectrometry for the determination of nitrosamines in red wine. *Food Chemistry*, 196, 1131–1136, 2016.
- López-Rodríguez, R., McManus, J. A., Murphy, N. S., Ott, M. A., Burns, M. J. Pathways for N-nitroso compound formation: Secondary amines and beyond. *Organic Process Research and Development*, 24(9), 1558–1585, 2020.
- Lord, H.; Bojko, B. Drug analysis by SPME. In: PAWLISZYN, J. (org.). *Handbook of Solid Phase Microextraction*. Oxford: Elsevier, 2012. p. 333-369.
- Lu, S., *et al.* Facile and sensitive determination of N-nitrosamines in food samples by high-performance liquid chromatography via combining fluorescent labeling with dispersive liquid-liquid microextraction. *Food Chemistry*, 234, 408–415, 2017.
- Manchuri, K. M., Shaik, M. A., Gopireddy, V. S. R., Sultana, N., Gogineni, S. Analytical methodologies to detect N-nitrosamine impurities in active pharmaceutical ingredients, drug products and other matrices. *Chemical Research in Toxicology*, 37, 1456–148, 2024.
- MERCK KGaA. Certified reference materials. Darmstadt: Merck. 2026. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/en/products/analytical-chemistry/reference-materials/certified-reference-materials>. Acesso em: 7 jan. 2026.
- Monteiro, M. A., de Lima, P. C., Novotny, T. S., Santana, D. S., Lima, M. E. D., Dantas, A. S. C. L., Ferreira, L. O. dos S., de Souza, M. N., Maranhão, R. L. do N., Ochs, S. de M. Investigation of carcinogenic impurities of N-nitrosamines in sartan pharmaceutical products marketed in Brazil: Development and validation of method based on high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 112, 1305–1314, 2023.
- Moser, J., Ashworth, I. W., Harris, L., Hillier, M. C., Nanda, K. K., Scrivens, G. N- nitrosamine formation in pharmaceutical solid drug products: Experimental observations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 112(5), 1255–1267, 2023.
- Myznikov, L. V., Hrabalek, A., Koldobskii, G. I. Drugs in the tetrazole series. (Review). *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 43(1), 1–9, 2007.
- Novotny, T. S., Monteiro, M. A., de Lima, P. C., Ochs, S. de M., Maranhão, R. L. do N., Vaz, F. A. S., Marques, F. F. de C. Thymol-based hydrophobic deep eutectic solvents as a

green approach for screening polar nitrosamines in sartans pharmaceutical products by ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction combined with HPLC-DAD. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 112(5), 1231–1245, 2023.

Nowak, P. M., Wietecha-Posłuszny, R., Pawliszyn, J. White analytical chemistry: An approach to reconcile the principles of green analytical chemistry and functionality. *TrAC – Trends in Analytical Chemistry*, 138, 2021.

O Globo. Evelin Azevedo. Sanofi Medley recolhe remédios com losartana. Publicado em 09/03/2022. Disponível em: <https://oglobo.globo.com/saude/medicina/sanofi-medley-recolhe-remedios-com-losartana-25425042>. Acessado em: 17 agosto 2022.

O Globo. Taís Codeco. Losartana: Anvisa determina recolhimento do remédio para pressão alta por conter impurezas. Publicado em 23/06/2022. Disponível em: <https://oglobo.globo.com/saude/noticia/2022/06/losartana-anvisa-determina-recolhimento-do-remedio-para-pressao-alta-por-conterem-impurezas-losartana.ghtml>. Acessado em: 17 agosto 2022.

Omena, E., Oenning, A. L., Merib, J., Richter, P., Rosero-Moreano, M., Carasek, E. A green and simple sample preparation method to determine pesticides in rice using a combination of SPME and rotating disk sorption devices. *Analytica Chimica Acta*, 1069, 57–65, 2019.

Official Medicines Control Laboratories (OMCL). Determination of NDMA (HS-GC-MS). 2018a. Disponível em: <https://www.edqm.eu/sites/default/files/omcl-ndma-method-palg-ie-september2018.pdf>. Acessado em: 14 novembro 2021.

Official Medicines Control Laboratories (OMCL). Determination of NDMA and NDEA in sartan drug substances by HPLC/UV. 2020a. Disponível em: https://www.edqm.eu/sites/default/files/method_19a0416-01_ndma_and_nde_a_in_sartan_by_hplc-uv_-_ansm.pdf. Acessado em: 14 dezembro 2021.

Official Medicines Control Laboratories (OMCL). GC-MS Method NDMA in Metformin- HCl API and Finished dosage forms (Shimadzu GCMS QP 2020plus). 2020b. Disponível em: https://www.edqm.eu/sites/default/files/medias/fichiers/OMCL/omcl_method_parametere_ndma_api.fdf_metformin_de-by.pdf. Acessado em: 14 janeiro 2022.

Official Medicines Control Laboratories (OMCL). GC-MS Method NDMA in Ranitidin-API (Shimadzu GC-MS QP 2020plus). 2020c. Disponível em: https://www.edqm.eu/sites/default/files/medias/fichiers/OMCL/omcl_lgl_method_for_determination_of_nitrosamines_in_ranitidine_-_25102019.pdf. Acessado em: 14 janeiro 2022.

Parr, M. K., Joseph, J. F. NDMA impurity in valsartan and other pharmaceutical products: Analytical methods for the determination of N-nitrosamines. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 164, 536–549, 2019.

Pawliszyn, J. Handbook of Solid Phase Microextraction. Beijing: Chemical Industry Press of

China, 2009.

Pawliszyn, J. Theory of solid-phase microextraction. In: PAWLISZYN, J. (org.). *Handbook of Solid Phase Microextraction*. Oxford: Elsevier, 2012. p. 13-66.

Pena-Pereira, F., Wojnowski, W., Tobiszewski, M. AGREE – Analytical GREENness Metric approach and software. *Analytical Chemistry*, 92, 10076–10082, 2020.

Pérez, D. M., *et al.* Solid-phase microextraction of N-nitrosodimethylamine in beer. *Food Chemistry*, 107(3), 1348–1352, 2008.

Pereira dos Santos, N. G., Medina, D. A. V., Lanças, F. M. Water as a green solvent for sustainable sample preparation: Single drop microextraction of N-nitrosamines from losartan tablets. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 417(7), 1283–1292, 2025.

Peris-Pastor, G., Azorín, C., Grau, J., Benedé, J. L., Chisvert, A. Miniaturization as a smart strategy to achieve greener sample preparation approaches: A view through greenness assessment. *TrAC – Trends in Analytical Chemistry*, 170, 2024.

Pizarro, C., Pérez-del-Notario, N., González-Sáiz, J.M. Multiple headspace solid-phase microextraction for eliminating matrix effect in the simultaneous determination of haloanisoles and volatile phenols in wines, *Journal of Chromatography A*, 1166, 2007.

R7. Anvisa determina recolhimento de remédios à base de losartana, usados para pressão alta. Publicado em 23/06/2022. Disponível em: <https://noticias.r7.com/saude/anvisa-determina-recolhimento-de-remedios-a-base-de-losartana-usados-para-pressao-alta>. Acessado em: 17 agosto 2022.

Roasa, J., Liu, H., Shao, S. An optimised HS-SPME-GC-MS method for the detection of volatile nitrosamines in meat samples. *Food Additives and Contaminants – Part A*, 36(3), 396–404, 2019.

Roche, V. F., *et al.* Foye's Principles of Medicinal Chemistry. [s.l.: s.n.].

Rowe, R. C.; Sheskey, P. J.; Quinn, M. E. Handbook of pharmaceutical excipients. 9. ed. London: Pharmaceutical Press, 2021.

Sieira, B. J., Carpinteiro, I., Rodil, R., Quintana, J. B., Cela, R. Determination of N-nitrosamines by gas chromatography coupled to quadrupole–time-of-flight mass spectrometry in water samples. *Separations*, 7(1), 2020.

Suresh Kumar, A. B., Dey, D., Balaji, T. S., Karthik, H., Sathishkumar, K., McDaid, P., Fitzpatrick, B., Awasthi, A., Davies, S., Dirat, O. Nitrite in pharmaceutical manufacturing water: Development of an ultra-sensitive analytical method, typical data, and discussion of potential nitrosamine formation in drug substance and drug product from water. *Organic Process Research and Development*, 28(7), 2614–2622, 2024.

Thresher, A., *et al.* Are all nitrosamines concerning? A review of mutagenicity and

carcinogenicity data. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 116, 2020.

United States Pharmacopeia (USP). General Chapter, <1469> Nitrosamine Impurities. USP- NF, Rockville, 2024.

U.S. Food & Drug Administration (FDA). Press announcements: FDA announces voluntary recall of several medicines containing valsartan following detection of an impurity. 2018a. Disponível em: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-announces-voluntary-recall-several-medicines-containing-valsartan-following-detection-impurity>.

U.S. Food & Drug Administration (FDA). FDA updates and press announcements on angiotensin II receptor blocker (ARB) recalls (valsartan, losartan, and irbesartan). 2018b. Disponível em: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-press-announcements-angiotensin-ii-receptor-blocker-arb-recalls-valsartan-losartan>.

U.S. Food & Drug Administration (FDA). Combine direct injection NDMA and NDEA impurity assay by GC-MS. 2018c. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/117807/download>.

U.S. Food & Drug Administration (FDA). Combined NDMA and NDEA impurity assay by GC-MS-headspace. 2019a. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/124025/download>.

U.S. Food & Drug Administration (FDA). Combined direct injection NDMA, NDEA, NDIPA, and NDBA impurity assay by GC-MS/MS. 2019b.

U.S. Food & Drug Administration (FDA). LC-HRMS method for the determination of NDMA in ranitidine drug substance and drug product. 2019c. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/130801/download>.

U.S. Food & Drug Administration (FDA). LC-MS/MS method for the determination of NDMA in ranitidine drug substance and solid dosage drug product. 2019d. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/131868/download>.

U.S. Food & Drug Administration (FDA). LC-HRMS method for the determination of NDMA in metformin drug substance and drug product. 2020a. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/134914/download>.

U.S. Food & Drug Administration (FDA). LC-ESI-HRMS method for the determination of nitrosamine impurities in metformin drug substance and drug product. 2020b. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/138617/download>.

U.S. Food & Drug Administration (FDA). Control of N-nitrosamine impurities in human drugs. 2021. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/141720/download>.

Wichitnithad, W., Nantaphol, S., Noppakhunsomboon, K., Thitikornpong, W., Rojsitthisak, P. Current status and prospects of development of analytical methods for determining

nitrosamine and N-nitroso impurities in pharmaceuticals. *Talanta*, 254, 2023.

Wichitnithad, W., Sudtanon, O., Srisunak, P., Cheewatanakornkool, K., Nantaphol, S., Rojsitthisak, P. Development of a sensitive headspace gas chromatography–mass spectrometry method for the simultaneous determination of nitrosamines in losartan active pharmaceutical ingredients. *ACS Omega*, 6, 11048–11058, 2021.

Witkowska, A. B., *et al.* Development of a sensitive screening method for simultaneous determination of nine genotoxic nitrosamines in active pharmaceutical ingredients by GC-MS. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20), 2022.

Yamamoto, E., Kan-no, H., Tomita, N., Ando, D., Miyazaki, T., Izutsu, K. Isolation of N-nitrosodimethylamine from drug substances using solid-phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 210, 2022.

Zakaria, O., Rezali, M. F. Reference materials as a crucial tool for validation and verification of the analytical process. *Procedia – Social and Behavioral Sciences*, 121, 204–213, 2014.

Zeisler, R. Reference material for small-sample analysis. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 360, 376–379, 1998.

Zhang, Y., Widart, J., Ziemons, E., Hubert, P., Hubert, C. N-nitrosamine risk assessment in pharmaceuticals: Where are we from a regulatory point of view in 2025? *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Open*, 6, 2025.

Zheng, J., Kirkpatrick, C. L., Lee, D., Han, X., Martinez, A. I., Gallagher, K., Evans, R. K., Mudur, S. V., Liang, X., Drake, J., Buhler, L. A., Mowery, M. D. A full evaporation static headspace gas chromatography method with nitrogen phosphorous detection for ultrasensitive analysis of semi-volatile nitrosamines in pharmaceutical products. *AAPS Journal*, 24, 2022.

Zmysłowski, A., Książek, I., Szterk, A. N-nitrosodimethylamine contamination in the metformin finished products. *Molecules*, 25(22), 2020.

Zou, Y., *et al.* Bioisosteres in drug discovery: Focus on tetrazole. *Future Medicinal Chemistry*, 12(2), 91–93, 2020.

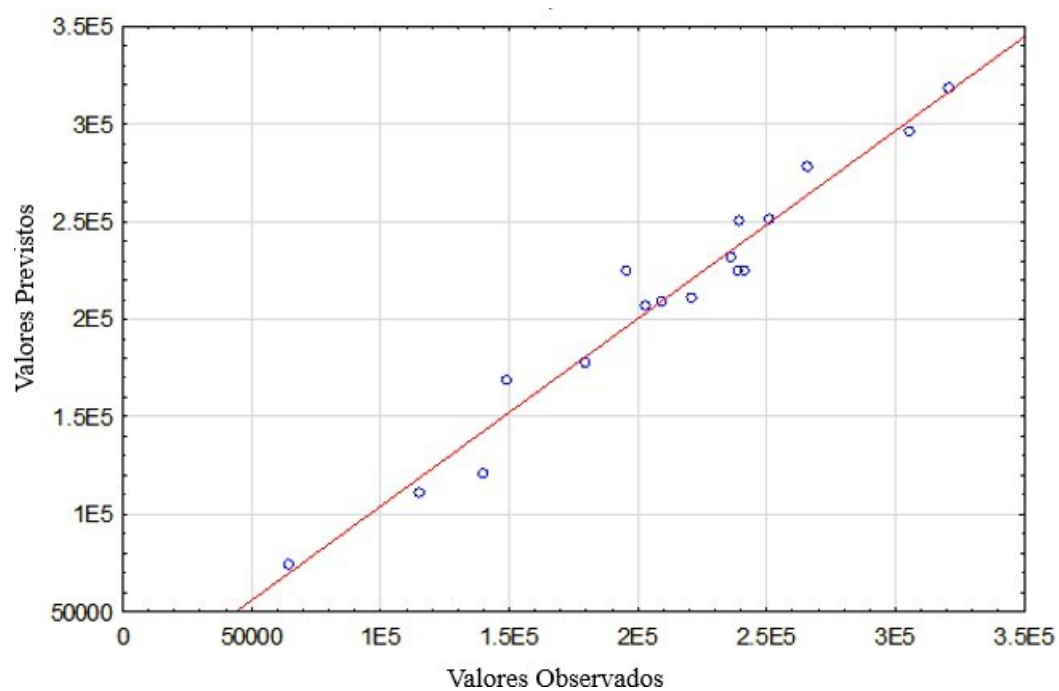
ANEXO A

Figura 1. Tabela ANOVA referente ao planejamento composto central para as variáveis Tempo de extração (min), temperatura de extração (°C) e agitação (rpm). Dados obtidos no software *Statistica*® 13.0.

ANOVA; Var.:Resposta; R-sqr=.96128; Adj:.9115 (Tratamento TCC) 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Pure Error=664613E3 DV: Resposta					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Agitação (rpm)(L)	2.123560E+09	1	2.123560E+09	3.19518	0.215763
Agitação (rpm)(Q)	3.068673E+07	1	3.068673E+07	0.04617	0.849783
(2)Temperatura de Extração (°C)(L)	3.794911E+10	1	3.794911E+10	57.09953	0.017066
Temperatura de Extração (°C)(Q)	5.507561E+09	1	5.507561E+09	8.28686	0.102460
(3)Tempo de extração (min)(L)	1.979332E+10	1	1.979332E+10	29.78171	0.031976
Tempo de extração (min)(Q)	8.338010E+07	1	8.338010E+07	0.12546	0.757048
1L by 2L	6.075326E+07	1	6.075326E+07	0.09141	0.790935
1L by 3L	1.876566E+08	1	1.876566E+08	0.28235	0.648273
2L by 3L	3.810645E+05	1	3.810645E+05	0.00057	0.983071
Lack of Fit	1.372587E+09	5	2.745175E+08	0.41305	0.816045
Pure Error	1.329227E+09	2	6.646134E+08		
Total SS	6.977986E+10	16			

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

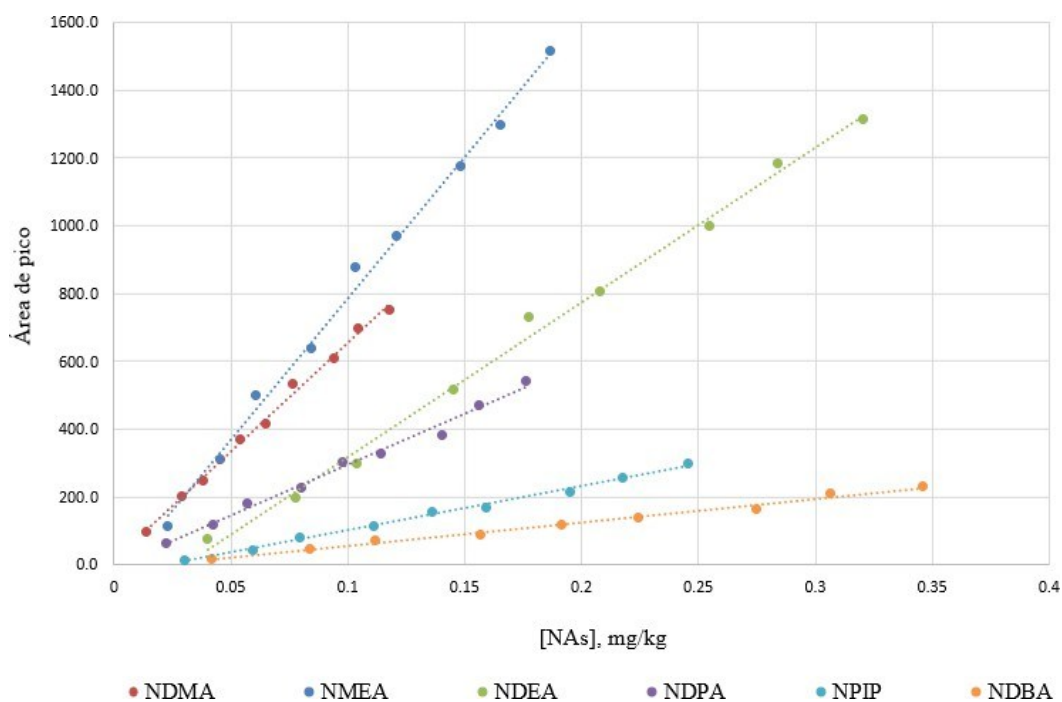
Figura 2. Gráfico dos valores previstos pelo modelo vs os valores experimentais observados referente ao planejamento composto central para as variáveis Tempo de extração (min), temperatura de extração (°C) e agitação (rpm). Dados obtidos no software Statistica® 13.0.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

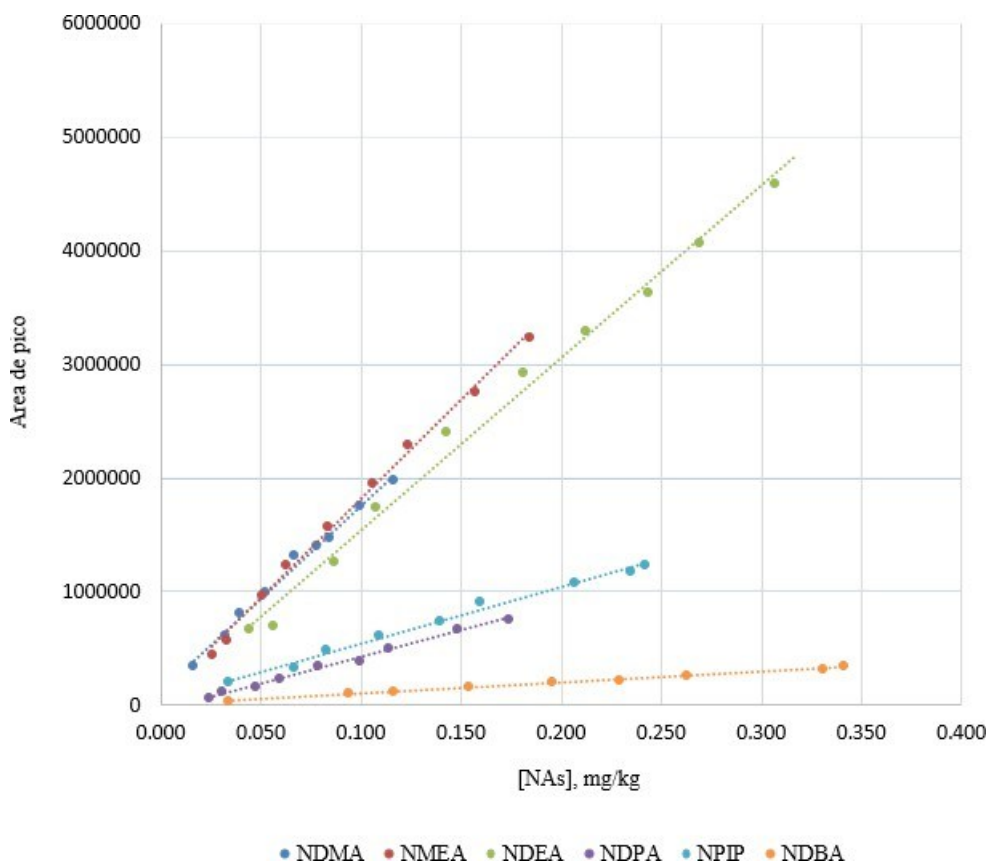
ANEXO B

Figura 1: Curvas de calibração por semelhança de matriz (n=3) em nove níveis de concentração, variando de 0,014 a 0,346 mg kg⁻¹ para cada nitrosamina empregando o método HS/SPME-GC/NPD. Os dados foram plotados utilizando o software Excel[®].



Fonte: Adaptado de Germano *et al.* (2026).

Figura 2. Curvas de calibração por semelhança de matriz (n=3) em nove níveis de concentração, variando de 0,016 a 0,341 mg kg⁻¹ para cada nitrosamina empregando o método HS/SPME-GC/MS. Os dados foram plotados usando o software Excel[®]. Para o NDBA, os valores de resposta foram multiplicados por 10 para melhorar a visualização dos dados.



Fonte: Adaptado de Germano *et al.* (2026).

APÊNDICE

Atividades Realizadas no Período do Doutorado (2022 – 2025)

➤ Produção Científica em projetos paralelos a tese de doutorado

- I. de Andrade, C. S., Pazzini, I. A. E., Bredun, M. A., Burin, V. M., Gonzaga, L. V., **Germano, A. T.**, Vitali, L., Costa, A. C. O., Müller, C. M. O. New insights into the utilization of grumixama (*Eugenia brasiliensis* Lamarck): Valorization of perishable native fruits through the production of powders by the foam-mat drying technique. *Food Research International*, 228, 2026.
- II. Motta, G. E., **Germano, A. T.**, Vitali, L., Valencia, G. A., Ferreira, S. R. S. Comparative Green Extraction Methods for the Valorization of the Bracts from Banana's Inflorescence. *Waste and Biomass Valorization*, 2026.
- III. Dotto, M. E. P., Guesser, F., Savaris, J. M., Hartmann, C. S., **Germano, A. T.**, Garcia, L. F. R., Teixeira, C. S. How the NaOCl solution concentration and temperature impact chlorine levels, tissue dissolution and pH. *Brazilian Dental Journal*, 2025.
- IV. de Lima, N. D., Wanderley, B. R. S. M., Vitali, L., **Germano, A. T.**, Maranhão, T. A., Moroni, L. S., Fritzen-Freire, C. B., Amboni, R. D. M. C. Valorization of *Passiflora caerulea* L. seeds via ultrasound-assisted extraction with natural deep eutectic solvents: Phenolics, in vitro bioaccessibility, and antimicrobial properties. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2025.
- V. Krepsky, L.M., Loos Moritz, A.H., Corrêa Pitz, M.A., Bachmann, L., Siebert, D.A., Flegar, P., Lešnjak, S., Tirić, A., **Germano, A.T.**, da Silva, M., Vaz, C.R., Benvenuti, L., de Gasper, A.L., Santin, J.R., Machado, I.D., Vitali, L., Končić, M.Z. and Alberton, M.D. Antiaging, Wound-Healing Properties and Chemical Characterization of Crude Hydroalcoholic Extract and Fractions of *Myrcia neoobscura*. *Chemistry & Biodiversity*, 2025.
- VI. Rudke, C. R. M.; Rudke, A. R.; **Germano, A. T.**; Vitali, L.; Zielinski, A. A. F.; Ferreira, S. R. S. Phenolic Compounds and Pectin-Rich Extracts Recovered from Peach Pomace by Sequential Pressurized Liquid Extractions. *Food and Bioprocess Technology*, 18, 5180-5195, 2025.
- VII. Souza, M. A. de A.; Rudke, A. R.; **Germano, A. T.**; Vitali, L.; Ferreira, S. R. S. Sequential high-pressure extraction using green solvents to recover bioactive compounds from sesame cake. *Journal of Supercritical Fluids*, 215, 106421, 2025.
- VIII. De Almeida, A. V. C; Pereira, E. F.; Schneider, K; Gomes, B.; **Germano, A. T.**; Budziak, D.; Welter, L. J.; De Oliveira, H. M.; Stolberg, J.; Vitali, L.; Soldi, C. Color, volatile organic and phenolic compounds in garlic after curing in a shaded environment at ambient conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 222, 113373, 2025.

- IX. Soares, L. de A.; **Germano, A. T.**; Vitali, L.; Mazzuti, S.; Santana, L. C. L. A. Solid- state fermentation as a pre-treatment method for the extraction of bioactive compounds from pomegranate (*Punica granatum L.*) and jatobá peel (*Hymenaea courbaril L.*). *Food Bioscience*, 63, 105716, 2025.
- X. Costa, G. O.; **Germano, A. T.**; Bretanha, L. C.; Micke, G. A.; Siwe-noundou, X.; Sandjo, L. P.. GC-MS comparison of fatty acids profile of oils extracted from viscera of Tainha (*Mugil liza*) and Tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Natural Product Research*, 38, 2780-2785, 2024.
- XI. Baumgarten, L. G.; Dreyer, J. P.; De Campos, C. E. M.; **Germano, A. T.**; Vitali, L.; Spinelli, A.; Santana, E. R.; Winiarski, J. P.; Vieira, I. C. Two-dimensional titanium carbide MXene embedded in exfoliated graphite nanoplatelets for voltammetric sensing of thiamethoxam in beekeeping products. *Electrochimica Acta*, 494, 144423, 2024.
- XII. **Tavares, A.**; Mafra, G.; Carasek, E.; Micke, G. A.; Vitali, L. Determination of five 3-alkyl-2-methoxypyrazines employing HS-SPME-GC-NPD: Application in evaluation of off-flavor of South American wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 105, 104237, 2022.

➤ Coorientação

- I) Wilson Clemente dos Passos. Desenvolvimento de um método analítico para determinação de *N*-nitrosaminas em losartana potássica empregando microextração em fase sólida e Cromatografia Gasosa. 2023. Projeto de iniciação científica (PIBIC). Orientador: Prof. Dr. Luciano Vitali. Colaboradora: **Amanda T. Germano**.
- II) Wilson Clemente dos Passos. Desenvolvimento de método analítico para determinação de *N*-nitrosaminas em produto cárneo empregando Microextração em Fase Sólida e Cromatografia Gasosa. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Bacharelado em Química pela Universidade Federal de Santa Catarina. Orientador: Prof. Dr. Luciano Vitali. Coorientadora: **Amanda T. Germano**.

➤ Participação em Congressos e simpósio.

- I) XX Congresso Latino Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas. Apresentação do trabalho “Ultrasound-assisted extraction method for the assessment of phenolic compounds in cocoa bean shells by LC-MS/MS”. Germer, F. L., Germano, A. T., Vitali, L., Chaves, E. S. 2025.
- II) XXIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Apresentação de E-pôster do trabalho “Harvest time influence on phenolic compounds and antioxidant activity in canudo-de-pito honey.” Gomes, V. V., Antunes, A. C., Hahn, L., **Germano, A. T.**,

Micke, G., Vitali, L., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O. 2024.

III) II Simpósio de Graduação e Pós-Graduação em Química da UFSC. Apresentação de trabalho “Química analítica aplicada à avaliação de vinhos: Desenvolvimento de método para determinação de 3-alquil-2-metoxipirazinas”. **Germano, A. T.** 2024.

IV) XXIII Congresso Latino-Americano de Ciência do Solo/ XXXVIII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo. Apresentação de resumo em anais da EPAGRI, 2023. p. 53-53 intitulado “Solos ácidos sulfatados como instrumento de gestão territorial na Ilha de Santa Catarina”. Rosolem, G. P. N ; Simas, P. H. ; Passos, W. C. ; **Germano, A. T.**; Batistão, A. C. ;Heberle, D. A. ; Loss, A. 2023.

I)

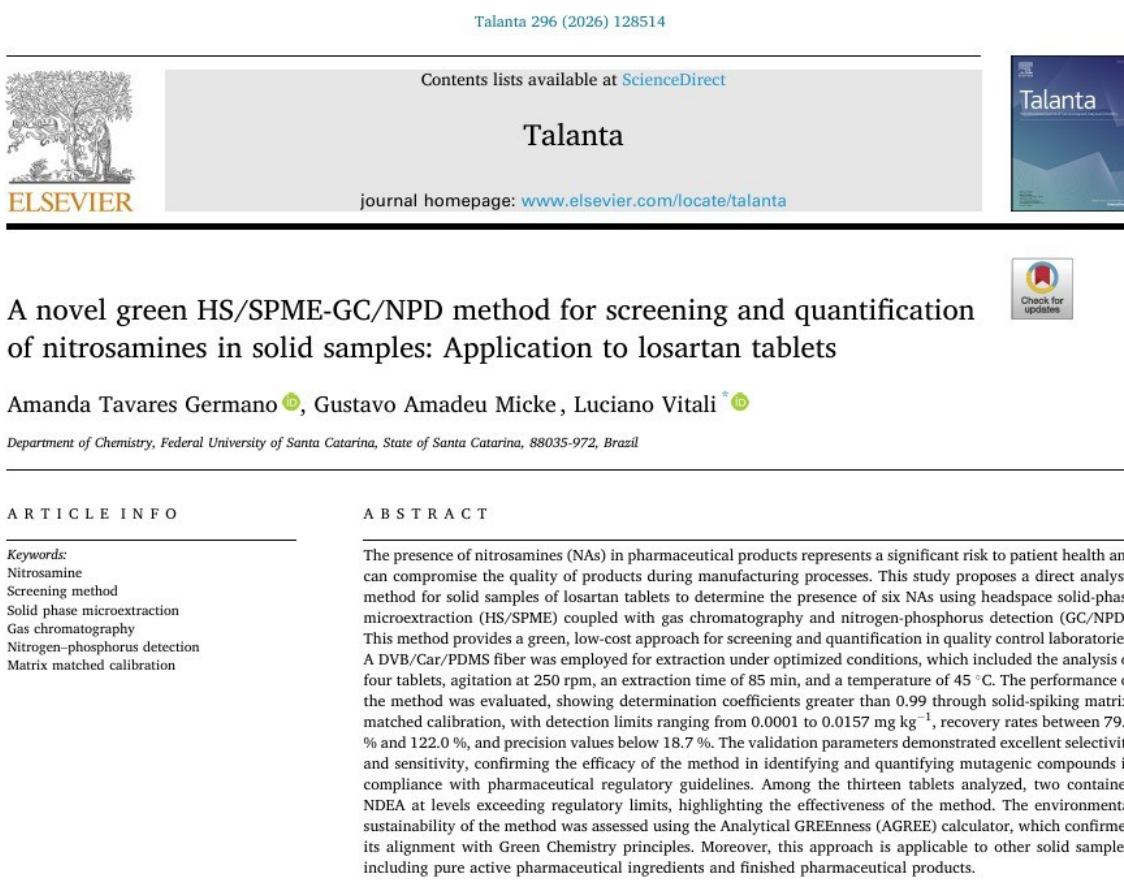
➤ Participação de bancas

I) Enders, M. S. P.; **Germano, A. T.**. Participação em banca de Guinther Schlösser Schmitz. Sensor eletroquímico ratiométrico à base de nanomateriais bidimensionais e nanopartículas de prata aplicado na determinação de L tirosina. 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina.

➤ Publicação do artigo referente a tese de doutorado

Germano, A. T.; Micke, G. A.; Vitali, L. A novel green HS/SPME-GC/NPD method for screening and quantification of nitrosamines in solid samples: application to losartan tablets. *Talanta*, v. 296, p. 128514, 2026. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2025.128514>

Figura 1: Ilustração da primeira página do artigo científico.



Fonte: Germano *et al.* (2026).