Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

DETERMINAÇÃO DE FARMÁCOS ANTI-INFLAMATÓRIOS EM URINA HUMANA POR MEPS-HPLC-DAD

Laísa Rodrigues da Silva Oliveira

Prof. Dr. Carlos Eduardo Domingues Nazario

CAMPO GRANDE – MS

2018

Unidade XI – Instituto de Química – UFMS
Cidade Universitária, s/n * Caixa Postal 549 Fone/Fax 067xx 3345-7009 Fone 067xx 3345-7010
79070-900 * Campo Grande (MS) *
http://www.ufms.br e-mail: quimiba.inqui@ufms.br

Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

DETERMINAÇÃO DE FARMÁCOS ANTI-INFLAMATÓRIOS EM URINA HUMANA POR MEPS-HPLC-DAD

Laísa Rodrigues da Silva Oliveira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção do título de Mestre em Química (área de concentração: Química)

Prof. Dr. Carlos Eduardo Domingues Nazario.

CAMPO GRANDE – MS

2018

Unidade XI – Instituto de Química – UFMS
Cidade Universitária, s/n * Caixa Postal 549 Fone/Fax 067xx 3345-7009 Fone 067xx 3345-7010
79070-900 * Campo Grande (MS) *
http://www.ufms.br e-mail: pgquimica.propp@ufms.br

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
MESTRADO E DOUTORADO

TERMO DE DEFESA

(X) – Dissertação ( ) – Tese ( ) – Qualificação

ALUNA
LAÍSA RODRIGUES DA SILVA OLIVEIRA

TÍTULO DO TRABALHO
DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS EM URINA HUMANA POR MEPS-HPLC-DAD

Defesa de Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Química – Nível de Mestrado e Doutorado (Resolução nº 207/2018) da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos necessários para titulação no curso.

COMISSÃO EXAMINADORA		
NOME	**INSTITUIÇÃO DE ENSINO**	**ASSINATURA**
Carlos Eduardo Domingues Nazario	UFMS	
Juliano Carvalho Cardoso	UFMS	
Najla Mohamad Kassab	UFMS	
Lincoln Carlos Silva de Oliveira	UFMS	

Campo Grande, 7 de dezembro de 2018.

DEDICATÓRIA

Ao amor incondicional de meus familiares, em especial: Meus pais, Aparecida Rodrigues da Silva Oliveira e Francisco de Assis Oliveira, e ao meu irmão Jefferson Rodrigues da Silva Oliveira.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me outorgar o dom da vida e todas as suas oportunidades, que tem me doutrinado continuamente a ser alguém melhor a cada dia não só para comigo mesma, mas também para o meu próximo e minha pátria.

À minha Família, pois só eles sabem realmente das minhas dificuldades e anseios.

À minha amada Mãe Aparecida Rodrigues da Silva Oliveira por toda atenção, pelo amor incondicional, carinho, zelo, compreensão, dedicação, por me dar à luz e ser minha melhor amiga. Ao meu querido Pai Francisco de Assis Oliveira por conselhos, palavras de apoio nos momentos mais difíceis, sempre botando fé em cada passo que eu dou.

Ao meu não só irmão, mas também melhor amigo, aliado, cumplice, colega de pós-graduação, Jefferson Rodrigues da Silva Oliveira, pois é a nele que me espelho, me expiro, e agradeço por me ajudar com as todas minhas dificuldades, pelos ensinamentos, por sempre estar do meu lado nos caminhos que trilhei e em todos os momentos, principalmente nos que mais precisei e por ser essa pessoa na qual tenho confiança integral.

Ao Polar, amigo que perdi durante o mestrado, mas que fez parte da minha vida por nove anos e sempre foi um ótimo "cãopanheiro" e esteve ao meu lado nos estudos e que só tenho boas lembranças. Ao Jessie, meu eterno gato serelepe, que perdi duas semanas antes de se tornar Mestre em Química, agradeço toda a sua companhia durante os últimos um ano e quatro meses, pois ele sempre esteve presente nos momentos de estudo e durante a escrita deste trabalho, além de me proporcionar momentos de descontração e ternura dos quais só tenho boas recordações.

Aos meus queridíssimos tios que sempre estão apoiando meus passos, grandes fãs que sempre torcendo a favor e vibrando pelas minhas conquistas, em especial, Anatálio Rodrigues e Jorgina Manuela e Ant

ônio Rodrigues.

Ao Professor Doutor Carlos Eduardo Domingues Nazario por me conceder a oportunidade de ser uma de suas primeiras orientadas como aluna do mestrado, assim como, permitir me aventurar na área da Química Analítica e conhecer uma das suas vertentes como as técnicas modernas de preparo de amostra, além de toda paciência e apoio.

Ao Doutoranda Karla Regina Warszawski pelas caronas no início do mestrado e momentos culturais, pelas primeiras aprendizagens na área de química analítica que deram um norte e foi de grande valia, bem como os conselhos, paciência e amizade.

Ao Doutorando Leandro Fontoura Cavalheiro pela companhia durante os almoços, os cafezinhos da tarde e por sempre estar disposto a dar apoio moral e suporte técnico, sendo sempre cortês, pacato, enfim, por ser um grande amigo de trabalho e fazer jus ao seu sobrenome (Cavalheiro).

À Dannyelle Silva por ser minha amiga, parceira de mestrado e nas disciplinas, além de uma ouvinte paciente nesses dois últimos anos, e também, por ter os melhores bordões.

À Bruna de Paula Pires por meramente ser a minha melhor amiga, que a química me proporcionou, da graduação que levarei para a vida toda, por sempre me ouvir, pela autenticidade e todos bons momentos.

Ao Ranielli Wallissom pelo apoio continuo, por ter a melhor risada, dono do abraço mais apertado do mundo e por ser simplesmente uma pessoa incrível e amável.

Aos Professores doutores Juliano Carvalho Cardoso e Nájla Mohamad Kassab por gentilmente aceitarem fazer parte da minha banca de dissertação de mestrado, como membros titulares. E ao Professor doutor Lincoln Carlos Silva Oliveira como membro suplente da banca.

Aos demais membros do LABCOM: Osmar Nunes, Mário Romero, Brunão, Chicão, Amandha Kaiser e Eduardo Sobieski, e também aos amigos de outros laboratórios, como as irmãs Geovanna Vilalva e Talita Vilalva, agradeço a todos supracitados, pelos bons momentos assim como a qualquer dica e/ou auxilio que tenham oferecido, contribuindo para meu crescimento profissional e pessoal.

Aos professores doutores do INQUI/UFMS que foram responsáveis pela minha construção profissional durante o as disciplinas do mestrado. Aos técnicos do INQUI/UFMS, especialmente: Ademar Ferreira, Jacqueline Maciel e Leopoldo Albigesi Barbosa por toda assistência e profissionalismo.

Enfim, a todas as pessoas do meio acadêmico e também aos amigos de fora que torcem por mim e que contribuíram diretamente ou indiretamente na realização desse trabalho.

“Nada é tão grande que não possa ser alcançado e nada é tão pequeno que não seja importante. ”

Allan Kardec

RESUMO

Os anti-inflamatórios não esteroidais (NSAIDs) são fármacos comumente utilizados no tratamento de inflamações, dores, edemas, e também, no tratamento de distúrbios musculares e reumáticos. O mecanismo de ação dos NSAIDs é caracterizado pela inibição da oxidação do ácido araquidônico, que impedem uma ou ambas isoformas da enzima ciclooxigenase (COX-1 e COX-2), responsável pelo desencadeamento da resposta inflamatória. O constante uso de NSAIDs tem sido associado a ocorrência de reações adversas como: doenças cardiovasculares, problemas gastrointestinais e debilidade das funções renais. A monitorização terapêutica de fármacos utiliza metodologias analíticas para avaliar fluidos biológicos, garantindo que não ocorra a subdosagem ou superdosagem e, consequentemente, a redução dos gastos com os tratamentos, bem como, a decorrência de efeitos colaterais causados por fármacos. Diante disso, jugou-se necessário desenvolver, otimizar e validar um método analítico para quantificar os NSAIDs: ibuprofeno, cetoprofeno e fenoprofeno em amostras biológicas de urina fortificada, por cromatografia líquida de alto eficiência (HPLC) acoplada ao detector por arranjos de diodos (DAD), utilizando microextração com sorbente empacotado (MEPS) na etapa de preparo de amostra. A MEPS trata-se de uma técnica miniaturizada que demanda pequena quantidade de amostra, utiliza baixos volumes de solventes e, portanto, gera menor quantidade de resíduos. No procedimento de otimização da separação cromatográfica, em HPLC-DAD, utilizou-se uma coluna C18 Zorbax Eclipse (150 mm×4,6 mm; 5µm), a fase móvel selecionada para o estudo acetonitrila: água acidificada com ácido acético 0,1 % na proporção de 50:50 (v/v), em modo isocrático. Para a técnica de extração foram otimizadas as seguintes condições: ciclos de aspiração, volume e tipo de solvente de eluição, solvente de *clean up* e utilizou-se como sorbente uma fase polimérica funcionalizada, Oasis HLB, no procedimento de otimização da extração e, por conseguinte, na etapa de validação analítica. Na validação analítica, a linearidade foi avaliada pela construção de curvas analíticas realizada com a fortificação das amostras de branco de urina na faixa de 3,0 a 10,5 µg mL^{-1}obtendo-se após aplicação de ponderações estatísticas coeficientes de correlação (r) 0,9779; 0,9934 e 0,9910, para cetoprofeno, fenoprofeno e ibuprofeno, respectivamente. Os limites de detecção e quantificação compreenderam valores entre 0,88−1,23 µg mL^{-1} e 2,67−3,10, respectivamente. Os valores de precisão intra e inter-dias variaram entre 0,10−14,04% e a exatidão intra e inter-dias os valores obtidos ficaram na faixa de -9,14–11,78 %. Além disso, valores de recuperação relativa foram obtidos na faixa de 83,10−103,5% e recuperação absoluta de 97,6−126,2%. Os resultados demostraram-se bastante promissores, tendo como perspectiva a aplicação do método para determinação em amostras reais de urina humana e determinação de outros parâmetros ainda não avaliados como efeito matriz e a robustez.

Palavras-chave: NSAIDs, MEPS, ibuprofeno, cetoprofeno, fenoprofeno.

ABSTRACT

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are drugs commonly used in the treatment of inflammation, pain, swelling, and also in the treatment of muscular and rheumatic disorders. The mechanism of action of NSAIDs is characterized by the inhibition of arachidonic acid oxidation, which prevents one or both isoforms of the enzyme cyclooxygenase (COX-1 and COX-2), responsible for triggering the inflammatory response. The continual use of NSAIDs has been associated with the occurrence of adverse reactions such as: cardiovascular diseases, gastrointestinal problems and renal function impairment. Therapeutic drug monitoring employs analytical methodologies to evaluate biological fluids, ensuring that underdosage or overdosage does not occur and, consequently, reduction of treatment costs, as well as the consequence of side effects caused by drugs. Therefore, it was necessary to develop, optimize and validate an analytical method to quantify the NSAIDs: ibuprofen, ketoprofen and fenoprofen in biological samples of fortified urine, by high-performance liquid chromatography (HPLC) attached with diode array detector (DAD) using microextraction by packaged sorbent (MEPS) in the sample preparation step. MEPS is a miniaturized technique that requires a small amount of sample, spends low volume of solvents and, as a result, generates less waste. In the chromatographic separation optimization procedure, C18 Zorbax Eclipse column (150 mm × 4.6 mm; 5μm) was used, the mobile phase selected for the study acetonitrile: water acidified with 0.1% acetic acid in the ratio of 50:50 (v / v), in isocratic mode. For the extraction technique, the following conditions were optimized: suction cycles, volume and type of elution solvent, clean up solvent and a functionalized polymer phase, Oasis HLB, was used as the sorbent in the extraction optimization procedure and therefore in the analytical validation step. In the analytical validation, the linearity was evaluated by the construction of analytical curves performed with the fortification of the urine blank samples in the range of 3.0 to 10.5 mg / L, after applying statistical weights statistical correlation coefficients (r) 0.9779; 0.9934 and 0.9910, for ketoprofen, fenoprofen and ibuprofen, respectively. The limits of detection and quantification included values between 0.88-1.23 μg mL^{-1} and 2.67-3.10, respectively. The repeatability and intermediary precision attain values varied between 0.10-14.04% and accuracy values were in the range of -9.14-11.78%. In addition, relative recovery values were obtained in the range of 83.10-103.5% and absolute recovery of 97.6-126.2%. The results showed to be very promising, taking as perspective the application of the method for determination in real samples of human urine and determination of other parameters not yet evaluated as matrix effect and robustness.

Key words: NSAIDs, MEPS, ibuprofen, ketoprofen, fenoprofen.

ÍNDICE DE ESQUEMAS E FIGURAS

Figura 1 Ciclo do Ácido Araquidônico. 4
Figura 2 Estrutura química ácido acetil salicílico. 4
Figura 4 Etapas envolvidas no desenvolvimento de um método analítico....8
Figura 5 Esquema do equipamento de HPLC. 11
Figura 6 Fluxograma resumo de algumas técnicas de preparo de amostra. 14
Figura 7 Representação dos formatos de dispositivos de extração mais empregados em SPE. 15
Figura 8 Etapas do procedimento de extração em SPE:....17
Figura 9- Formato da MEPS....18
Figura 10- Etapas do procedimento de extração em MEPS: 19
Figura 11 Modos de Operações com a MEPS:....22
Figura 12 Componentes do dispositivo MEPS modificado. 23
Figura 13 Estrutura polimérica da fase extratora apolar PS-DVB. 24
Figura 14 Estrutura polimérica da fase extratora Oasis HLB comercializada pela Waters®. .25
Figura 15 Busca pelos tópicos utilizando microextraction*, MEPS*e Urine*. 26
Figura 16 Busca pelos tópicos utilizando microextraction*, MEPS*, Urine* e NSAIDs....26
Figura 17 Dispositivo MEPS utilizado.....33
Figura 18 Fluxograma extração com o MEPS: Otimização com o sorbente Oasis HLB.....34
Figura 19 Cromatogramas obtidos nas diferentes proporções testadas.....38
Figura 20 Gráfico do fator de retenção (k) *versus* a concentração da fase móvel.....39
Figura 21 Otimização com ACN:H_2O + ác. Acético 0,1 % na proporção de 50:50. 40
Figura 22 Otimização em modo gradiente. 42
Figura 23 Extração com MEPS microcoluna com a fase extratora Oasis HLB. Teste de extração: (A) com acidificação e (B) sem acidificação da amostra. 44
Figura 24 Extração com MEPS microcoluna com a fase extratora Oasis HLB. Teste com o volume de solvente de eluição: (A) 100 µL e (B) 200 µL com o eluente ACN:H_2O + ác. Acético 0,1 % na proporção de 50:50 v/v. 45
Figura 25 Extração com MEPS microcoluna com a fase extratora Oasis HLB. Teste ciclos aspiração/dispersão na etapa de extração com a amostra.....45
Figura 26 Extração com MEPS microcoluna com a fase extratora Oasis HLB. Teste de solvente de lavagem: (A) água e (B) água: metanol 95:5 (v/v) 46

Figura 27 Extração com MEPS microcoluna com a fase extratora Oasis HLB. Teste de ciclos de aspiração/dispersão na etapa de lavagem. 47
Figura 28 Extração com MEPS Coluna HLB Oasis. Teste número de ciclos de aspiração/dispersão na etapa de eluição e solvente de eluição. 48
Figura 29 Cromatograma Otimização da MEPS com coluna HLB Oasis na matriz urina. 49
Figura 30 Cromatograma do branco de urina não fortificado. Comprimento de onda monitorado 220 nm. 50
Figura 31 Cromatograma Otimização da MEPS com coluna Oasis HLB na matriz urina fortificada. 50
Figura 32 Curva analítica para o cetoprofeno. 70
Figura 33 Curva analítica com ponderação (1/y) para o cetoprofeno. 70
Figura 34 Gráfico de resíduos para o cetoprofeno. 71
Figura 35 Gráfico de resíduos com ponderação (1/y) para o cetoprofeno. 71
Figura 36 Curva analítica para o fenoprofeno. 72
Figura 37 Curva analítica com ponderação ($1/x^2$) para o fenoprofeno. 72
Figura 38 Gráfico de resíduos para o fenoprofeno. 73
Figura 39 Gráfico de resíduos com ponderação ($1/x^2$) para o fenoprofeno. 73
Figura 40 Curva analítica para o ibuprofeno. 74
Figura 41 Curva analítica com ponderação ($1/y^{1/2}$) para o ibuprofeno. 74
Figura 42 Gráfico de resíduos para o ibuprofeno. 75
Figura 43 Gráfico de resíduos com ponderação ($1/y^{1/2}$) para o ibuprofeno. 75

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Classificação dos NSAIDs quanto a estrutura química. 5
Tabela 2 Publicação relacionadas à determinação de NSAIDs em fluídos biológicos com diferentes técnicas de preparo de amostra. 27
Tabela 3 Parâmetros cromatográficos. 41
Tabela 4 Parâmetros da curva analítica para os NSAIDs. 51
Tabela 5 Dados da análise de variância (ANOVA) para o cetoprofeno. 52
Tabela 6 Dados da análise de variância (ANOVA) para o fenoprofeno. 53
Tabela 7 Dados da análise de variância (ANOVA) para o ibuprofeno. 54
Tabela 8 Dados da curva analítica para os NSAIDs após as ponderações. 54
Tabela 9 Precisão para o método de análise NSAIDs em urina. 55
Tabela 10 Exatidões para o método de análise NSAIDs em urina após as ponderações. 56
Tabela 11 Recuperação para o método de análise NSAIDs em urina. 56
Tabela 12 Comparação dos dados obtidos com os da literatura. 59

SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	ácido araquidônico
AALLME	microextração líquido-líquido assistida por ar
AAS	ácido acetil salicílico
ACN	acetonitrila
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
ANOVA	Análise de variância
BAμE−μLD	microextração por adsorção em barra com desorção de microlíquido dispersivo líquido-líquido
BIN	Barrel Insert and Needle assembly
NSAIDs	*non-steroidal anti-inflammatory drugs*
C18	octadecilsilano
C2	dissilano
C8	octilsilano
CE	eletroforese capilar
CEP	comitê de ética em pesquisa
CG	cromatografia gasosa
COXIBs	inibidor seletivo da cicloxigenase
COX	cicloxigenase
COX−1	cicloxigenase 1
COX−1	cicloxigenase 2
c-TNTs	nanotubos de dióxido de titânio revestidos com carbono
DAD	detector por arranjo de diodos
DLLME	extração líquido-líquido dispersiva
DLLME-SFO	microextração baseada na solidificação de gotículas orgânicas flutuantes
d−LPME	microextração em fase líquida dinâmica
DP	desvio padrão
dp	diâmetro e partícula
d−SPE	extração em fase sólida dispersiva
DPR	desvio padrão relativo
FDA	*food drug administration*

FID	detector de ionização em chama
H	altura equivalente a um prato teórico
h	altura reduzida do prato
HF−LPME	microextração em fase líquida com fibra oca
HLB	*hydrophilic-lipophilic balanced*
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
IQSC	Instituto de Química de São Carlos
k	fator de retenção
L	comprimento da coluna
LLE	extração líquido-líquido
LPME	Microextração em fase líquida
PGs	prostaglandinas
pH	potencial hidrogeniônico
PMME	microextração de polímero monolítico
RDC	resolução da diretoria colegiada
RDSE	extração por sorção de disco rotativo
Rs	resolução
SDME	extração por gota única
SCX	Trocador de cátions forte
SAX	Trocador ânions forte
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas
SF−μLPME	microextração em fase líquida com fluxo duplo interrompido
SLM	Membrana Líquida Suportada
SM−LLME	Microextração líquido-líquido de membrana de agitação
SPE	extração em fase sólida
SBSE	extração por barra sortiva de agitação
SPME	microextração em fase sólida
TDM	monitorização terapêutica de fármacos
TF	fator de alargamento
T_R	tempo de retenção
Tm	tempo morto
LD	limite de detecção
LQ	limite de quantificação
MEPS	microextração por sorbente empacotado

MeOH	metanol
MS	espectrometria de massas
NSAIDs	anti-inflamatórios não esteroidais
nº	número
n	número de pratos teóricos
PGC	poros carbono grafitizado
PS−DVB	poliestireno-divinilbenzeno
PTFE	politetrafluretileno
UAMD−SPME	microextração dispersiva magnética em fase sólida assistida por ultrassom
UHPLC	*ultra high performance liquid chromatography*
USA	Estados Unidos da América
UV	ultravioleta
UV−Vis	ultravioleta visível
Wb	largura da linha de base
α	fator de separação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **1**
1.1 ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIS (NSAIDs) 3
1.1.1 Derivados do ácido propiônico 6
1.2 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS 8
1.2.1 Monitorização terapêutica de fármacos (TDM) 9
1.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) 11
1.3 TÉCNICAS DE PREPARO 12
1.3.1 Extração em fase sólida (SPE) 14
1.3.2 Microextração por sorbente empacotado (MEPS) 17
2 OBJETIVOS **31**
2.1 OBJETIVOS GERAIS 31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 31
3 METODOLOGIA **32**
3.1 MATERIAIS 32
3.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES 32
3.3 MÉTODO CROMATOGRÁFICO 32
3.4 AMOSTRAS BIOLÓGICAS 33
3.5 DISPOSITIVO MEPS 33
3.6 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO COM O MEPS 33
3.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO 35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO **37**
4.1 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO 37
4.2 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO POR MEPS 42
4.3 VALIDAÇÃO ANALÍTICA 49
4.3.1 Seletividade 49
4.3.2 Linearidade, LOD e LOQ 51

4.3.3 Precisão e exatidão 55

4.3.4 Recuperação 56

4.3.5 Comparação dos dados obtidos com a literatura 57

5 CONCLUSÃO 60

6 PERPECTIVAS 61

7 REFERÊNCIAS 62

ANEXO I 70

1 INTRODUÇÃO

A determinação de fármacos em fluidos biológicos (urina, sangue total, plasma, saliva, leite materno, cabelo, entre outros) é de extrema importância, pois permitem avaliar a segurança e a eficácia desses compostos, bem como prever possíveis problemas farmacológicos nos âmbitos farmacocinéticos e farmacodinâmicos, que podem causar efeitos toxicológicos, que por sua vez, ocasionam comprometimento de órgãos, como por exemplo, os rins que realizam a filtragem do sangue e a excreção de substâncias indesejáveis oriundas do metabolismo [1].

Diante do aumento da densidade demográfica, surgimento de novas doenças e a facilidade no acesso e obtenção de medicamentos, há necessidade do desenvolvimento de metodologias de análise de fármacos em fluidos biológicos (bioanálises) que sejam modernas, sensíveis, seletivas e simultâneas sendo as mesmas, extremamente úteis para o campo clínico e toxicológico, com a finalidade de avaliar novas formulações de fármacos e aplicar tais metodologias na monitorização terapêutica, estudos de bioequivalência e biodisponibilidade em amostras biológicas [2,3].

Dentro do desenvolvimento de um método analítico, o preparo da amostra é a etapa que demanda maior tempo do analista e a mais determinante, pois a manipulação excessiva da amostra leva a ocorrência de perdas e propagação de erros na quantificação. A preparação de amostra tem a finalidade de remover interferentes e concentrar os analitos de interesse [4,5].

Inúmeros métodos de preparo de amostra têm sido desenvolvidos, destacando-se as técnicas miniaturizadas que apresentam como inovação o baixo volume no consumo de amostra e solventes e baixa geração de resíduos. Nesse contexto, a microextração com sorbente empacotado (MEPS) apresenta vantagens como redução da quantidade de solvente e amostra necessários para análise, elevado fator de concentração dos analitos, possibilidade de automação, tornando-a adequada aos princípios da química verde [6,7].

Os anti-inflamatórios não esteroidais (*non-steroidal anti-inflammatory drugs* – NSAIDs) são um grupo de compostos habitualmente utilizados no alivio dos sintomas das inflamações, porém o mecanismo de ação desses fármacos relaciona-se diretamente aos efeitos colaterais como: danos ao intestino, prejuízo das funções renais e até mesmo infarto do miocárdio. Desta maneira, ressalva-se a acuidade no desenvolvimento de métodos para monitoramento dessa classe de fármacos em fluidos biológicos [8,9,10].

A determinação desse grupo de fármacos pode ser realizada pela coleta de sangue ou de urina pois, a maioria dos NSAIDs sofre biotransformação hepático e os metabólitos são excretados pela urina. A via urinária é um método de coleta bastante vantajoso por ser não invasivo, visto que diferentemente da via sanguínea, método invasivo, no qual acaba sendo bastante incomodo ao paciente principalmente para idosos, crianças e recém nascidos [11].

Desse modo, se faz necessário desenvolver, otimizar e validar metodologias analíticas para quantificar os NSAIDs (cetoprofeno, fenoprofeno e ibuprofeno) em amostras biológicas de urina humana, por cromatografia líquida de alto eficiência (HPLC), utilizando técnicas de preparo de amostra miniaturizadas em concordância com os fundamentos da química verde, como a microextração com sorbente empacotado (MEPS).

1.1 ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIS (NSAIDS)

O processo inflamatório corresponde a uma resposta do organismo frente a diferentes agentes infecciosos ou por decorrência de trauma causado nos tecidos. Esse processo fisiológico trata-se de uma ação coordenada entre o sistema imunológico e o tecido que sofreu a lesão. A inflamação é caracterizada mecanicamente por uma fase aguda na qual ocorre a vasodilatação local transitória seguida de uma permeabilidade capilar aumentada, a fase posterior, subaguda, qualificada pela infiltração de leucócitos e células fagocitárias e a fase crônica, qualificada por degeneração tecidual e fibrose [12,13].

Os NSAIDs) são fármacos comumente utilizados e estão entre os mais prescritos em todo o mundo. Dentre os seus principais empregos estão para o tratamento de inflamações, dores, edemas, bem como em distúrbios musculares com ou sem danos no sistema nervoso e doenças reumáticas [9].

Os NSAIDs tratam-se de uma classe farmacológica que possuem como mecanismo de ação atuação na via metabólica do ciclo do ácido araquidônico (AA) **Figura 1**. Eles agem como agentes inibidores da glicoproteína cicloxigenase (COX). Percursor da cascata enzimática do processo inflamatório, o AA é um ácido graxo essencial derivado do ácido linoleico obtido diretamente pela dieta, contêm 20 carbonos com 4 instaurações em sua cadeia. O AA é liberado pelas fosfolipases para sofrer oxidação pelas COX−1 e COX−2 produzindo as prostaglandinas (PGs), lipídios que desempenham funções mediadoras no organismo.

A COX apresenta-se em duas isoformas COX−1 e COX−2, que se diferem quanto às suas sensibilidades à inibição por determinados tipos de NSAIDs. A COX−1 encontra-se em grande parte das células na forma de enzima constitutiva nos tecidos como nas plaquetas do sangue e na produção de PGs responsáveis pela homeostasia dos tecidos. Já a COX−2 é induzida durante o processo inflamatório pelas de citocinas e por mediadores da inflamação [3,11].

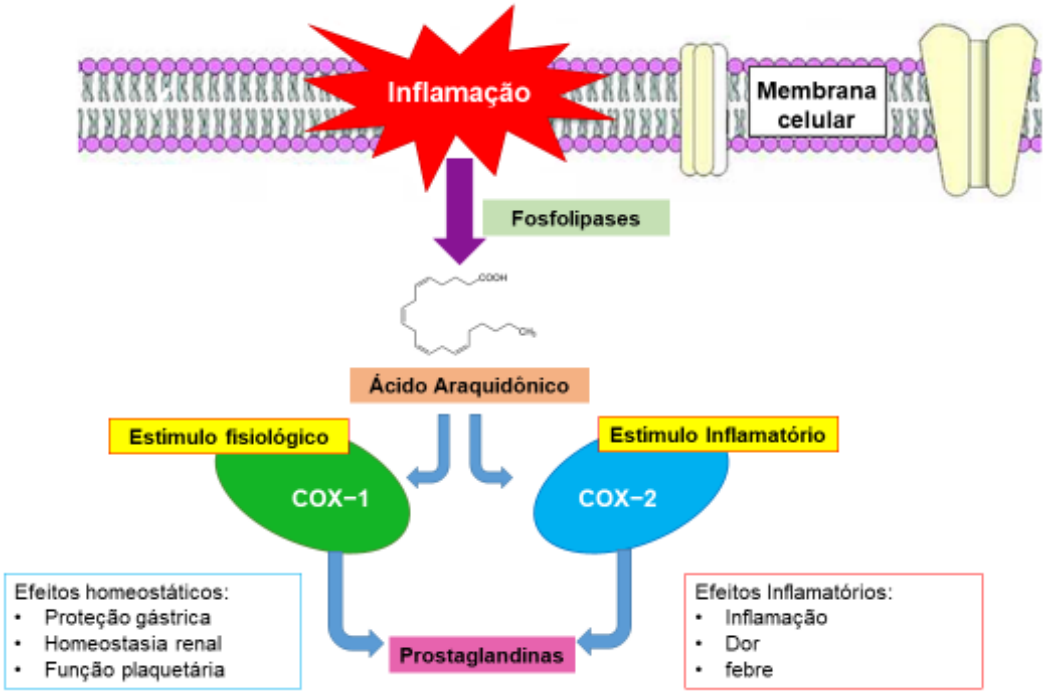


Figura 1 Ciclo do Ácido Araquidônico.
Fonte Adaptado: FENILBUTAZONACAVAL, 2011 [14].

Sintetizado em 1897, pelo químico alemão Felix Hoffman, o ácido acetil salicílico (AAS) **Figura 2**, popularmente conhecido como aspirina®, foi o primeiro anti-inflamatório criado, no qual ainda é bastante utilizado no alivio de sintomas da inflamação. Após as primeiras décadas de sua criação, exames endoscópicos realizados em alguns pacientes comprovaram que o uso contínuo do AAS provocava lesões gastrointestinais. Posteriormente, atribuiu-se esse efeito devido à ação do fármaco na supressão das PGs responsáveis pela proteção gástrica [15,16].

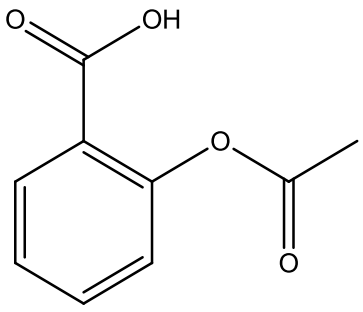


Figura 2 Estrutura química ácido acetil salicílico.

Atualmente, existem mais de 35 tipos de NSAIDs disponíveis para uso clínico e podem ser classificados quanto a sua estrutura química **Tabela 1**. O mecanismo de ação desses fármacos se deve a interrupção da oxidação do AA, pela capacidade de inibir uma ou

ambas isoformas das cicloxigenases (COX-1 e COX-2), dependendo do grau de seletividade desse inibidor, o que leva ao alivio dos sintomas da inflamação, assim como, a supressão da produção de PGs responsáveis pelos efeitos homeostáticos [3].

Tabela 1 Classificação dos NSAIDs quanto a estrutura química.

Salicilatos	**Derivados do ácido acético**	**Derivados do ácido fenilantranílico**	**Derivados do ácido propiônico**	**Derivados do ácido enolico**	**Derivados coxibs**
Ácido salicílico AAS diflunisal	Diclofenaco de sódio Indometacina Sulindaco Etodolaco cetorolaco	Ácido mefenâmico Ácido flufenâmico	Ibuprofeno Naproxeno Cetoprofeno Fenoprofeno	Piroxican meloxican	Celecoxibe Rofecoxibe
Inibidores não seletivos					**Inibidores seletivos COX−2**

As reações adversas de um NSAIDS são comumente atribuídas ao bloqueio da atividade da COX−1, enquanto que a ação anti-inflamatória resulta do bloqueio da COX−2, diante disso foi desenvolvida uma nova classe desses medicamentos inibidores seletivos específicos para COX−2, denominado COXIBs, com a finalidade de evitar efeitos adversos causados por alguns tipos de inibidores não seletivos [8,9,13,17].

Em 1998, celocoxib foi o primeiro COXIBs aprovado para o uso nos EUA pela *Food Drug administration*−FDA com finalidade de contornar os efeitos causados pelos inibidores não seletivos. Os COXIBs têm eficácia equivalente aos NSAIDs e representaram um avanço farmacológico no tratamento anti-inflamatório. No entanto, essas drogas são de alto custo e tais compostos apresentam efeitos colaterais indistinguíveis dos NSAIDS, quanto a persistência de potenciais efeitos adversos na função renal, moderados sintomas gastrointestinais, prováveis consequências cardiovasculares, ademais, problemas de fertilidade [18,19].

Considerando que muitos desses fármacos são de fácil acesso, o uso de NSAIDs tem sido bastante questionado, uma vez que sua comercialização ocorre sem a obrigatoriedade da prescrição médica, o que favorece o uso irracional de medicamentos. Ressalva-se que há casos relatados na literatura que comprovam a existência de reações adversas como o aumento do risco cardiovascular, incidências de infarto do miocárdio, hipertensão arterial, problemas gastrointestinais e prejuízo de funções renais, assim como insuficiência renal aguda devido ao prolongamento ou superdosagem do uso desse grupo farmacológico, uma vez que esses riscos

são ainda maiores nos pacientes que já possuem uma pré-disposição, bem como, histórico de doenças cardíacas, intestinais e renais [8,9,10].

1.1.1 Derivados do ácido propiônico

Os NSAIDs, objeto de estudo do presente trabalho: ibuprofeno, cetoprofeno e fenoprofeno (**Figura 3**) concernem a classe dos derivados do ácido propiônico, inibidores não seletivos da COX, confere efeitos colaterais comuns as outras classes de NSAIDs. Dentre os usos terapêuticos, são aprovados para o tratamento sintomático de artrite reumatoide e osteoartrite, e também, para dor espondilite anciolosante, artrite gotosa aguda, tendinite, bursite, enxaqueca e dismenorreia primária [12].

Quanto as características físico-químicas os três fármacos supracitados apresentam-se na forma de pó branco cristalino com pka entre 4,45−5,30, solúveis em solventes orgânicos como acetona, metanol e praticamente insolúveis em água [20,21].

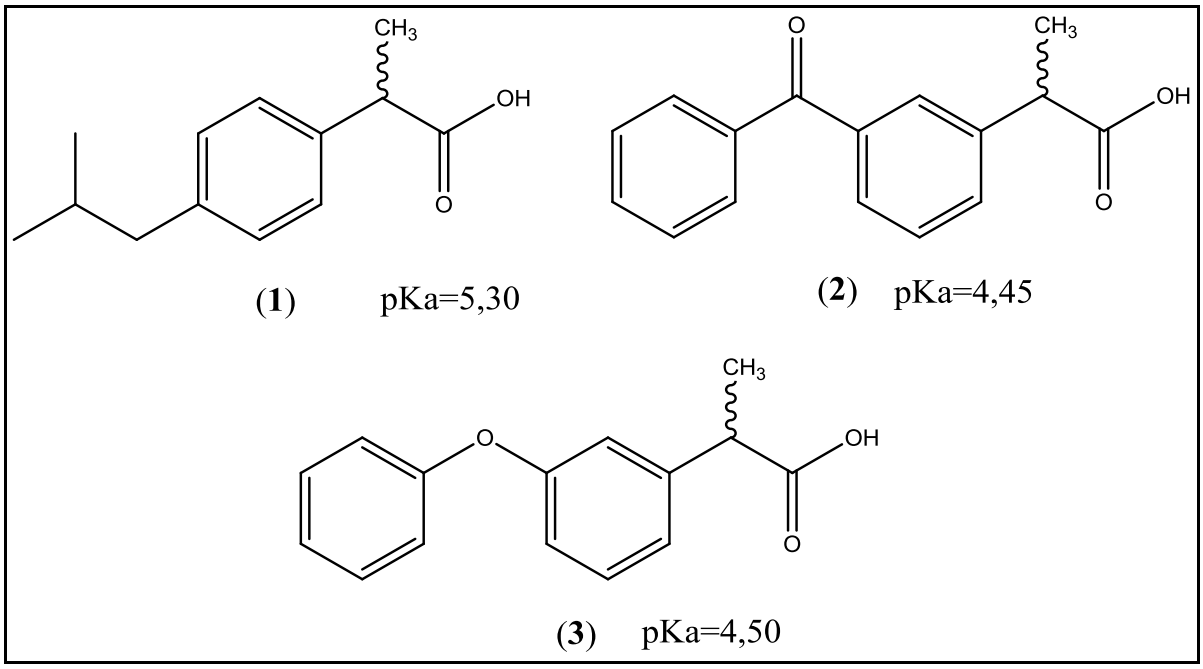


Figura 3 Estruturas químicas dos fármacos: (**1**) ibuprofeno, (**2**) cetoprofeno e (**3**)fenoprofeno.
Fonte: Próprio autor.

1.1.1.1 Ibuprofeno

Lançado comercialmente em 1969, o ibuprofeno é um NSAIDS, inibidor não seletivo, derivado do ácido propiônico, sendo o primeiro medicamento utilizado para o alivio de inflamações agudas e crônicas, bem como para efeito antipirético e analgésico. É extremamente empregado na terapêutica de dores leves e moderadas, assim como dor de cabeça, febre, cólicas menstruais, gripes e resfriados, dores musculares e reumáticas [22,23,24].

Em relação aos efeitos adversos, o ibuprofeno é considerado bem mais tolerado que o AAS e que a indometacina, além disso, é utilizado em pacientes com histórico de intolerância gastrointestinal aos outros NSAIDs. Entretanto, ainda há um índice de 5 a 15% de pacientes que ainda sofrem efeitos colaterais gastrointestinais [12].

1.1.1.2 Cetoprofeno

O cetoprofeno é um inibidor da cicloxigenase e da lipoxigenase, agindo sobre as isoformas 1 e 2, porém com certo grau de seletividade pela COX-2. Dessa forma, inibe a síntese de prostaglandinas, promovendo um potente efeito analgésico e anti-inflamatório, além disso, possui outros efeitos a nível celular e tecidual. Já quanto às lipoxigenases o mesmo atua por inibir a enzima responsável pela formação do AA inibindo o processo inflamatório [20,25].

Os efeitos adversos associados ao uso do cetoprofeno, por administração oral podem levar à ocorrência de problemas gastrointestinais e danos renais. Para uso tópico, está disponível como medicamento de referência, genérico e similar sob a forma gel 2,5%, além das preparações em farmácias de manipulação [26].

1.1.1.3 Fenoprofeno

Derivado do ácido propiônico, o fenoprofeno é um NSAIDS comumente utilizado nos USA cuja aplicação se assemelha os demais fármacos anti-inflamatórias, embora seja considerado o mais nefrotóxico da classe. A vantagem significativa do uso desse fármaco é que ele apresenta pouca atividade antiplaquetária, fato que reduz a possível incidência de ataques isquêmicos transitórios [12,27].

1.2 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS

O desenvolvimento de um método analítico visa obter informações qualitativas e/ou quantitativa do(s) analito(s) de interesse, seja ele presente no estado sólido, líquido, gasoso ou misturas. O procedimento analítico pode ser empregado com diferentes matrizes como ar, água, solo, alimentos e fluidos biológicos, com a finalidade de verificar a formação de um produto, composição química e para estudo de diversas propriedades físicas [28].

As etapas de um método analítico (**Figura 4**) são fundamentais para garantir a obtenção de parâmetros analíticos (exatidão, precisão e entre outros) com dados confiáveis das análises de amostras químicas de natureza complexas, como os fluidos biológicos. Dentre essas etapas, as mais suscetíveis a erros são aquelas cuja intervenção humana é direta, tais como: a coleta, o armazenamento e o preparo da amostra [28].



Figura 4 Etapas envolvidas no desenvolvimento de um método analítico
Fonte Adaptado: FIGUEIREDO, *et al*., 2015 [28].

A bioanálise está relacionada com a análise drogas de abuso, produtos naturais, fármacos e seus metabolitos em amostras biológicas através de métodos bioanalíticos que evolvem todas as etapas do método analítico convencional, contudo sob protocolos específicos [29].

Os métodos bioanalíticos têm fundamental importância para a indústria farmacêutica no desenvolvimento de novas formulações de medicamentos. Além disso, as bioanálises são empregadas no campo clínico em estudos toxicológicos, análise forense, dopagem, controle e identificação de biomarcadores no diagnóstico de muitas doenças e monitorização terapêutica

de fármacos para estudos farmacológicos (farmacocinéticos e farmacodinâmicos) e estudos de bioequivalência [29,2].

O desenvolvimento de novos métodos de análise ou mesmo alguma alteração de métodos existentes, por exemplo, o método de preparo de amostra ou analise instrumental empregada é essencial, uma vez que, uma pequena modificação pode gerar um grande avanço que colabora para diminuição de gastos desnecessários de materiais e solventes, desgaste de equipamento e excesso de resíduos [29].

Após a etapa de preparo de amostras, os constituintes químicos podem ser separados, identificados e quantificados a partir de diferentes tipos de mecanismos, dependendo da técnica aplicada. Na separação de fármacos e seus metabólicos em bioanálises são comumente utilizadas técnicas cromatográficas como: cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e eletroforese capilar (CE), combinados com detectores: ionização em chama (FID), ultravioleta (UV), detector por arranjo de diodos (DAD), espectrometria de massas (MS/MS), dentre outros [28,29].

1.2.1 Monitorização terapêutica de fármacos (TDM)

Com o desenvolvimento de novos fármacos promissores para a cura e alivio de doenças, logo houve também uma maior facilidade na aquisição de medicamentos. A automedicação e o emprego de fármacos sem prescrição médica são uma problemática para campo clínico, visto que consequentemente o uso abusivo desses fármacos levam ao aumento de intoxicações devido fatores como: exposição ambiental, erro terapêutico, uso incorreto ou reação adversa ao medicamento, no qual o diagnóstico é dado através da análise toxicológica. A toxicologia clínica objetiva prevenir e tratar os efeitos tóxicos dessas substâncias [2,30,31].

Dados do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX) para o ano de 2015 informaram que 31,67 % das intoxicações registradas no Brasil foram por medicamentos contra 3,68% por agrotóxico agrícola e 2,18% por agrotóxico doméstico 4,02 % por drogas de abuso. As intoxicações podem ocorrer por exposição a fármacos terapêuticos e outras substâncias. A toxicidade dos medicamentos é prevista através de estudos farmacológicos, entretanto, o mau uso e doses abusivas geram um grande problema para saúde pública, como aumento da mortalidade [12,32].

As substâncias frequentemente envolvidas em exposição humana são os analgésicos que ocupam a primeira posição, seguidos por sedativos/hipnóticos/antipsicóticos e produtos de

limpeza domésticas. Com relação à fatalidade, os sedativos/hípnóticos/antipsicóticos lideram, seguidos por opióides e medicamentos cardiovasculares [33,12].

A monitorização terapêutica de fármacos (*Therapeutic drug monitoring*−TDM) consiste em um método que visa otimizar o emprego de fármacos no controle da dosagem, evitando ou detectando precocemente a ocorrência de níveis tóxicos ou subterapêuticos, no campo clínico, permite ainda constatar a aderência do paciente ao tratamento e identificar interações medicamentosas inesperadas. Além disso, a TDM permite avaliar e caracterizar o perfil farmacocinético de candidatos a novos medicamentos em estudos clínicos [34,35].

A TDM pode ser definida como a extensão da farmacocinética que propõe otimizar os tratamentos farmacológicos, para o alcance de maior eficiência terapêutica e menores efeitos adversos. A evolução das técnicas de instrumentação analítica e do conhecimento farmacológico permitiu a aplicação da TDM na melhoria de casos clínicos, garantindo segurança e eficácia de tratamentos clínicos farmacológicos, estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos tornando, dessa maneira, proeminente a gestão terapêutica [2,30,31].

A absorção e a depuração do fármaco são influenciadas por múltiplos fatores, incluindo idade, sexo, metabolismo, estado da doença, função do órgão, interações medicamentosas, genética e obesidade, dos quais podem gerar um grande impacto na concentração real da droga na corrente sanguínea do paciente. Com a TDM é possível rastrear a dosagem específica do paciente obtendo o máximo efeito terapêutico e mínimo de toxicidade [12,2,36].

A TDM se alinha as determinações de métodos analíticos, uma vez que se trata de uma fase pré-analítica, no qual através da seleção da matriz apropriada, no caso a coleta do fluídos biológico se realiza ensaios com a finalidade de obter dados para interpretação farmacocinética o que futuramente pode implicar na decisão médica posológica [2,36].

O desenvolvimento de métodos analíticos que proporcionem maior seletividade, precisão, exatidão, dentre outros parâmetros analíticos, são imprescindíveis para obtenção de dados com maior confiança na TDM. Desse modo, é necessário que a etapa de amostragem seja realizada no tempo certo e da maneira correta após a dosagem medicamentosa para interpretação clínica dos dados e efetivação de estudos farmacológicos [2,35].

Portanto, na TDM a determinação de fármacos por meio de ensaios analíticos com fluídos biológicos é de extrema importância, pois permitem avaliar a segurança e a eficácia destas drogas, bem como prever possíveis problemas farmacológicos, que podem gerar efeitos toxicológicos e consequentemente desencadear no comprometimento de órgãos, como os rins que realizam a filtragem do sangue e a excreção de substâncias indesejáveis oriundas do metabolismo [1].

1.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Os métodos de separação constituem uma parte primordial para o desenvolvimento de métodos bioanalíticos em análises clínicas e toxicológicas. Existem várias técnicas de separação de misturas dos componentes de uma amostra, sendo a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) uma das técnicas modernas relevante e amplamente utilizada na análise e quantificação de fármacos e seus metabolitos em fluidos biológicos [29].

O HPLC trata-se de um tipo de cromatografia líquida realizada através de um instrumento automatizado, no qual emprega colunas empacotadas com materiais especialmente preparados e uma fase móvel, eluída sob altas pressões. Esse instrumento permite a separação de misturas e realização de analises qualitativas e quantitativas de uma variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras em poucos minutos e com excelente resolução, eficiência e detectabilidade [37].

Apesar de se basear nos princípios da cromatografia líquida clássica, no que diz respeito aos mecanismos de extração (partição em fase normal ou reversa, adsorção, exclusão e troca iônica), essa técnica se difere pela sofisticação, pois requer um equipamento com componentes especiais para a sua operação (**Figura 5**).

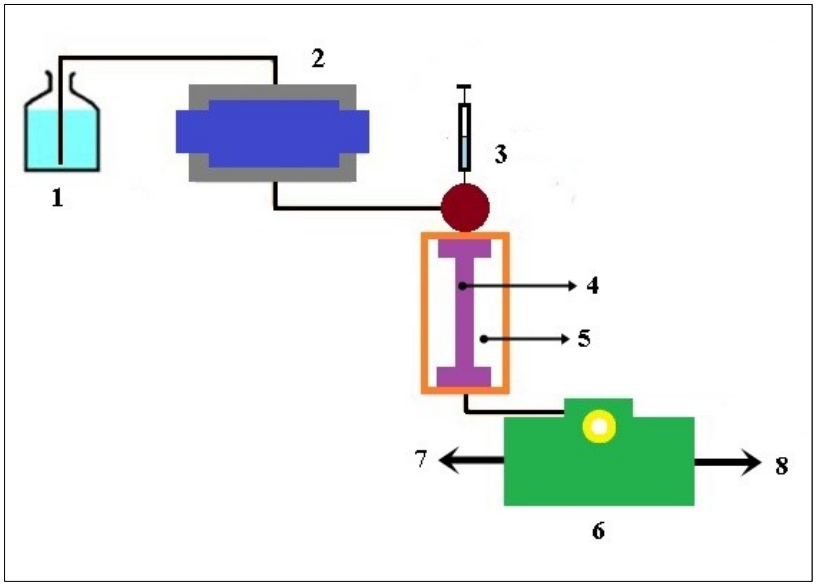


Figura 5 Esquema do equipamento de HPLC.
(**1**) Reservatórios das fases móveis, (**2**) bomba, (**3**) sistema de injeção, (**4**) coluna cromatográfica, (**5**) forno cromatográfico, (**6**) detector, (**7**) descarte e (**8**) tratamento de dados.
Fonte: Próprio autor.

Com o emprego de colunas feitas de aço inoxidável (comprimento:3 −25 cm, diâmetro: internos: 2−5 mm) empacotadas com fase estacionárias com diâmetro de partículas cada vez menores (1 até 10 μm), têm-se uma maior resistência à passagem da fase móvel, dessa maneira, se faz necessário a introdução de um sistema de bombas que operam sob altas pressões (400 até 1000 bar) e vazões na faixa de 0,1 a 10 mL mim^{-1} [37,38].

Com relação ao sistema de injeção, é realizado através da operação de um sistema de válvulas onde uma pequena quantidade amostra (μL) pode ser introduzida manualmente, no entanto, atualmente a maioria dos equipamentos possuem autoamostradores, que são capazes de injetar um grande número de amostras sem a presença do analista [38].

O detector tem a função de identificar os componentes advindos da coluna, dentre as principais caraterísticas desejáveis na escolha de um detector são a elevada sensibilidade e seletividade, baixo limite de detecção e estabilidade frente a mudanças na composição da fase móvel e de temperatura. O detector por espectroscopia de ultravioleta-visível (UV/Vis) constitui uma alternativa bastante econômica e de fácil uso quando comparado ao detector MS. Esse detector é o mais utilizado em HPLC, cujo princípio se baseia na absorção de luz ultravioleta ou visível por parte da amostra, quando nela passa radiação eletromagnética, geradas principalmente por lâmpadas de deutério e/ou tungstênio, o que lhe confere alta seletividade para compostos com grupos cromóforos [37,38].

O detector espectrofotométrico por arranjo de diodos (DAD), utilizado no presente trabalho, é bastante útil, uma vez que, o comprimento de onda pode ser variado (190−800 nm) possibilitando uma varredura de toda a região do UV-Vis, em uma única corrida cromatográfica. Dessa maneira, permite a distinção de vários componentes em uma amostra, pois o conhecimento do espectro de absorvância de cada composto possibilita a seleção do comprimento de onda com absorvância máxima de cada um deles, sendo possível a diferenciação de substâncias que tiverem tempo de retenção muito próximo [37,38].

1.3 TÉCNICAS DE PREPARO

Mesmo com os avanços tecnológicos recentes na instrumentação analítica, em muitos casos, as amostras não podem ser analisadas na sua forma original, pois ainda não existem equipamentos capazes de realizar determinações analíticas com a presença da matriz e seus interferentes. Dessa maneira, o instrumento utilizado pode não apresentar sensibilidade analítica almejada para quantificar e/ou qualificar os analitos, até mesmo, em níveis traços. Visando contornar problemas de complexidade da matriz e a presença de interferentes,

durante o processo do desenvolvimento de um método analítico, deve-se empregar a etapa de preparo da amostra [28,39].

O preparo de amostra possui a finalidade de isolar os compostos de interesse, procurando reduzir ou eliminar os interferentes da matriz, isto é, concentrar preferencialmente os analitos para que ao ser introduzido no sistema de análise apresente maior seletividade e, consequentemente, facilitar as determinações em baixas concentrações [28].

Dentre as etapas envolvidas durante a análise química, o preparo de amostra ainda é a que demanda maior tempo, cerca de 80% do tempo total da análise, fora que devido a manipulação excessiva e até mesmo o emprego de uma técnica inadequada no preparo de amostra pode ocasionar a propagação e também tornar-se a principal fonte de erros na análise química [39].

Atualmente, o preparo de amostra precisa ser rápido, seletivo, reprodutível e exato, mesmo com amostras complexas, como fluídos biológicos e amostras ambientais. Dessa forma, os avanços científicos objetiva diminuir a quantidade de erros, o custo, uso de solventes e quantidade de amostras e, por conseguinte, procedimentos com maior automação. Além disso, o emprego do preparo de amostra garante o prolongamento da vida útil do equipamento cromatográfico, bem como, a prevenção de contaminações [39].

Existem diversas técnicas que podem ser empregadas no preparo de amostras. Pode-se citar como técnicas clássicas (**Figura 6**): a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE). Em contrapartida, essas técnicas convencionais LLE e SPE requerem grandes quantidades de amostra, maior tempo de análise e também demandam um elevado consumo de solventes orgânicos, o que vai em contraposição aos princípios da química verde [40,41].

Na tentativa de contornar tais problemas, têm se destacado as técnicas de extração miniaturizadas (**Figura 6**), por exemplo, de extração líquido-líquido: extração líquido-líquido dispersiva (DLLME); extração por gota única (SDME); microextração em fase líquida (LPME); e também, técnicas miniaturadas de extração sólido-líquido: microextração em fase sólida (SPME); extração por sorção em barra de agitação (SBSE) e microextração por sorbente empacotado (MEPS) [28].

Portanto, almeja-se que no preparo de amostra a ser aplicado na análise de fármacos em matrizes biológicas apresente como características em um único procedimento determinar uma variedade de fármacos, até mesmo, com propriedades distintas e que se atinja boas recuperações, remova os compostos interferentes da amostra; proporcione robustez, boa precisão, exatidão, baixo custo e utilize volumes reduzidos de solvente [39,40,41].

No presente trabalho optou-se pela utilização da MEPS, visto que é uma técnica ainda pouco empregada no campo de preparação de amostras de fluidos biológicos, além disso, ela trata-se de uma técnica miniaturizada que demanda pequena quantidade de amostra, utiliza baixo volume de solventes e consequentemente gera menor quantidade de resíduos. Em resumo, a MEPS trata-se da miniaturização da SPE. A seguir, encontra-se uma concisa descrição teórica sobre SPE, cujo os princípios são de fundamental importância para o posterior entendimento acerca da técnica principal empregada neste trabalho, a MEPS, que também será delineada.

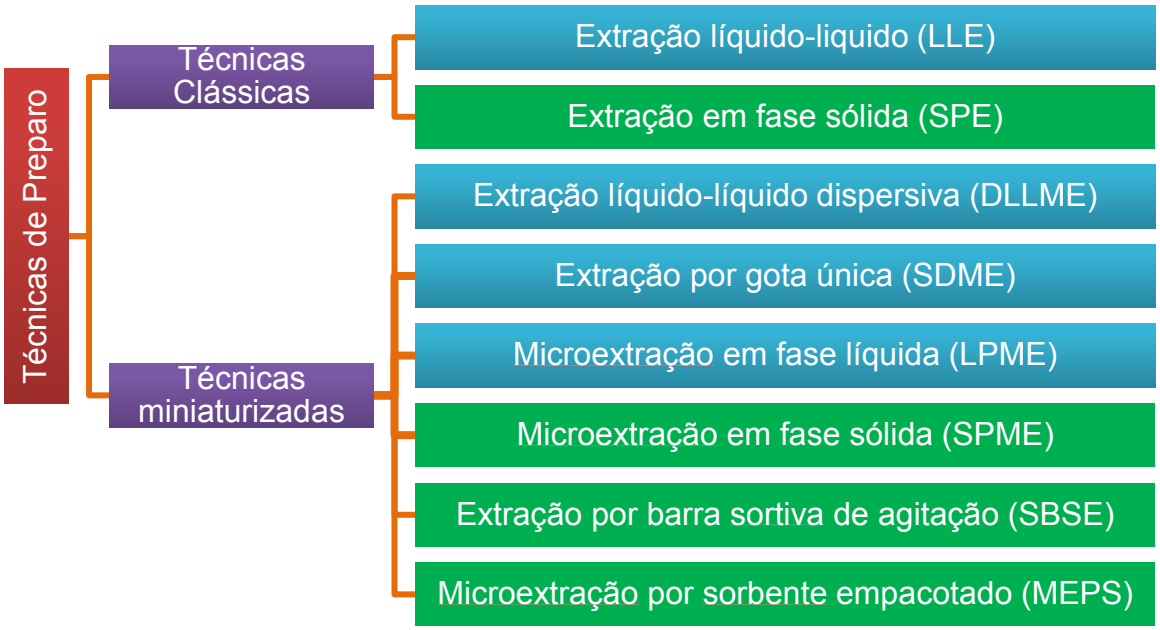


Figura 6 Fluxograma resumo de algumas técnicas de preparo de amostra.
Fonte: Próprio autor.

1.3.1 Extração em fase sólida (SPE)

A extração em fase sólida (*solid-phase extraction*−SPE) baseia-se nos princípios da cromatografia clássica (partição em fase normal ou reversa, adsorção, exclusão e troca iônica), assim sendo, uma técnica de extração por sorção. Foi empregada incialmente em 1970 e comercializada mais tarde em 1978. Assim como qualquer técnica de preparo a SPE possui como objetivo extração e/ou concentração do analito, isolamento do analito, ademais, isolamento da matriz ou limpeza da amostra (*clean-up*) e inclusive pode ser utilizada para a estocagem da amostra [28,42].

A SPE é empregada na extração de amostras líquidas e/ou fluidas e empregada especialmente para concentração de analitos semi-voláteis e não voláteis, porém também pode

ser utilizada na extração de amostras sólidas, sucedidas de uma pré-extração por solventes. Pode-se dizer que a SPE supre as desvantagens apresentadas pela extração líquido-líquido (LLE), principalmente pelo baixo consumo de solventes orgânicos e alto poder extrativo em comparações com esta outra técnica [28,43].

1.3.1.1 Formatos da SPE

O formato mais conhecido e utilizado da SPE é na forma de cartucho em forma de seringa ou barril, empacotado internamente por algum tipo de material sorbente mantido fixo no dispositivo por filtros geralmente feitos de politetrafluretileno (PTFE) ou vidro, além destas formas, pode ser encontrada em forma de disco de extração (**Figura 7**) [42,44].

Na maioria das vezes, o cartucho com forma de seringa, é composto por um tubo de polipropileno ou vidro, de 1 mL a 6 mL, contendo cerca de 50 a 500 mg de sorbente, com tamanhos de partícula de 40 a 60 µm, fixado no tubo por meio de dois filtros de tamanho de poros igual a 20 µm. Nos discos, o tamanho dos sorbentes variam entre 5 e 12 µm e com 6 nm de diâmetro de poro, sendo que o disco típico possui cerca de 47 mm de diâmetro interno, 0,5 mm de espessura e contém 500 mg de sorbente [5].

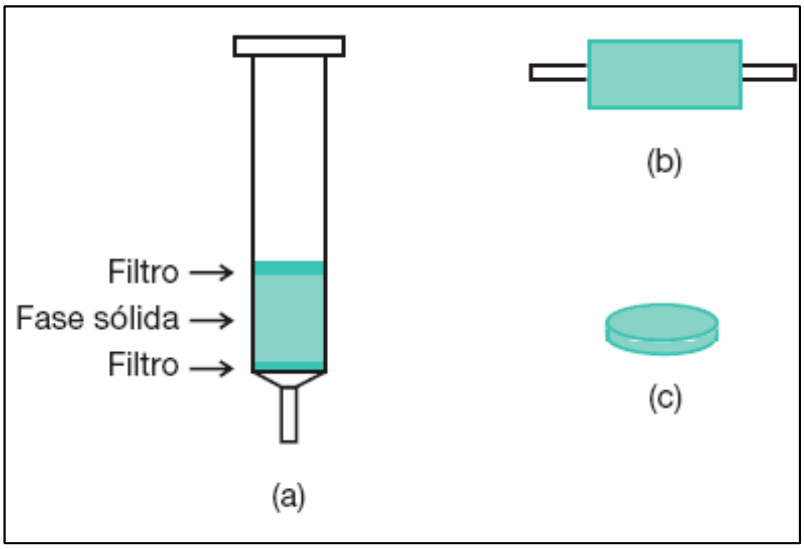


Figura 7 Representação dos formatos de dispositivos de extração mais empregados em SPE. (a) Forma de seringa; (b) cartucho inicial na forma de barril; (c) disco.
Fonte Retirado: FIGUEIREDO, *et al*., 2015 [28]

1.3.1.2 Procedimento de extração da SPE

Os mecanismos de separação obedecem os princípios da cromatografia clássica, no qual a escolha do material sorbente vai depender diretamente da natureza do analito de interesse e da matriz, sendo então os mecanismos mais utilizados em SPE: adsorção, partição, troca iônica e exclusão. Desse modo, o tipo de interações intermoleculares entre o analito e a fase extratora influenciam diretamente no processo extrativo, tais como interações de London, eletrostática, dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido, íon-dipolo, íon-íon e ligação de hidrogênio [42].

O procedimento de extração da SPE pode ser resumidamente descrito (**Figura 8**) em quatro etapas: (1º) condicionamento ou ativação o sorbente com o solvente adequado, para ajustar as forças do solvente de eluição com a do solvente da amostra, (2º) adição ou percolação da amostra seguida pela retenção dos analitos, (3º) remoção dos interferentes ou lavagem (*clean-up*), (4º) eluição do analito [42].

Durante a otimização do procedimento de extração vários parâmetros devem ser avaliados como: a escolha do tipo e quantidade de sorbente, volume da amostra e de solvente para o condicionamento do cartucho, para a eliminação dos interferentes e eluição dos analitos, velocidade de aplicação da amostra e, em alguns casos, ajustes é preciso ajustes de pH da amostra para estabilizar os analitos e aumentar a sua retenção na fase extratora. [45]

O condicionamento do cartucho é a etapa que destina-se a acionar as forças do sorbente, e o solvente a ser utilizado nesse passo depende diretamente do tipo de fase extratora utilizada. O condicionamento também tem como finalidade eliminar qualquer impureza que possa estar presente no cartucho [45].

A concentração dos analitos tem como objetivo principal reter o analito no sorbente através da passagem de grande volume de amostra, deixando passar os interferentes. Já na etapa de limpeza (*clean up*) é essencial a escolha correta do solvente e/ou eluente, para eliminar ao máximo apenas os compostos indesejáveis provenientes da matriz, que podem intervir no método analítico e, dessa maneira, não ocorrer a perda do analito de interesse [45].

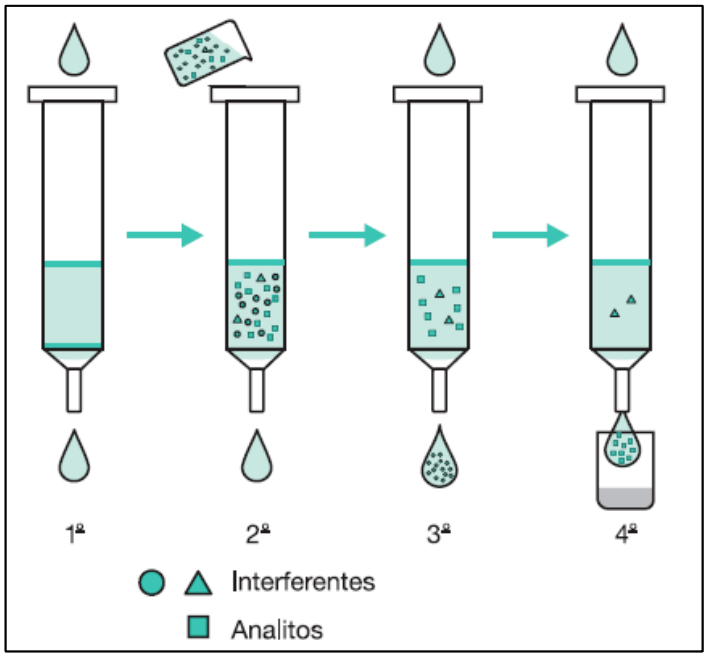


Figura 8 Etapas do procedimento de extração em SPE:
(1º) condicionamento, (2º) introdução ou percolação da amostra, (3º) lavagem com solvente ou *clean-up*; (4º) eluição do analito.
Fonte Retirado: FIGUEIREDO, *et al*., 2015 [28].

Dessa maneira, pode-se dizer que a SPE em comparações com a LLE apresenta como benefício o menor consumo de solvente orgânico, ausência de emulsões, automatização, tendo como consequência melhores taxas de recuperação do analito, redução do volume de resíduos tóxicos, aumento da seletividade e concentração do analito, bem como, a disponibilidade comercial de muitos equipamentos e variedade de fases extratoras [46]. Dentre as desvantagens pode-se afirmar que a SPE possui o tempo de análise elevado, altos custos dos cartuchos (visto que são utilizados apenas uma vez) e dos dispositivos comerciais multivias (*manifolds*), bem como, eventual dificuldade na escolha adequada do material sorbente para matriz e analito de interesse [39].

1.3.2 Microextração por sorbente empacotado (MEPS)

Desenvolvida no Laboratório de Astra Zeneca, na Suécia em 2004, pelo químico Mohamed Abdel-Rehin, considerada como uma técnica relativamente nova, a microextração por sorbente empacotato (*Microextraction by packed sorbent*–MEPS) é uma técnica de extração em fase sólida miniaturizada. Trata-se da miniaturização da SPE, sendo assim segue os mesmos princípios da extração em fase sólida: partição em fase normal ou reversa, adsorção, exclusão e troca iônica. O seu grande diferencial em relação a SPE está na redução

da quantidade requerida de amostra e dos volumes de solventes na etapa extrativa, cerca de 10 a 100 vezes, o que implica numa diminuição na escala de mililitros (mL) para microlitros (μL)

1.3.2.1 Formato da MEPS

A MEPS consiste em uma seringa cromatográfica (**Figura 9**), na qual possui uma pequena microcoluna (≈1 cm × 0,2 mm d.i.), também conhecida como BIN (*Barrel Insert and Needle assembly*) preenchida com 1−4 mg de do material sorbente, que se encontra conectada diretamente à agulha da seringa e empacotado com filtros (*Frits*) de polietileno em ambos os lados [47].

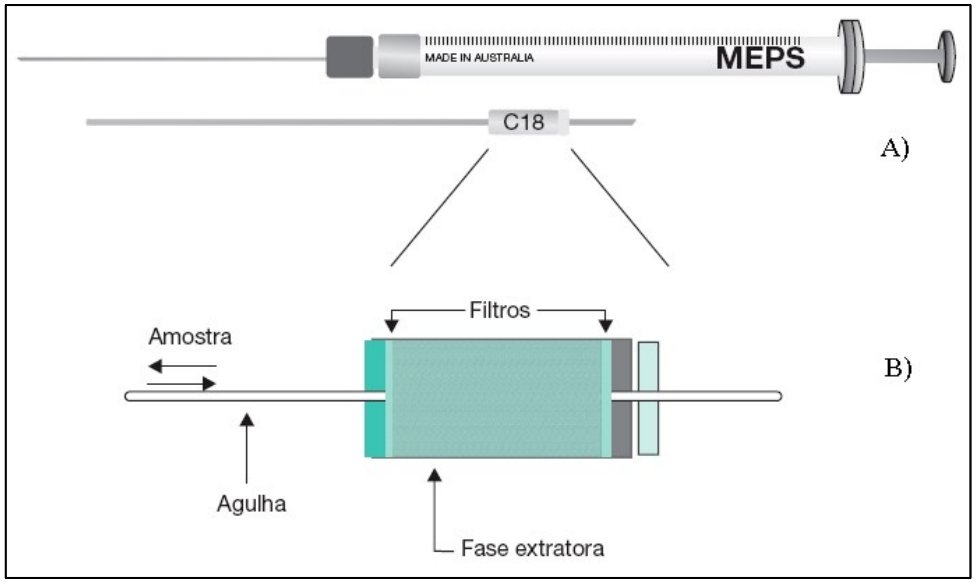


Figura 9- Formato da MEPS.
(A) Representação da seringa MEPS. (**B**) Representação do dispositivo de extração acoplado à agulha do sistema para MEPS.
Fonte Retirado: FIGUEIREDO, *et al*., 2015 [28].

1.3.2.2 Procedimento de extração

O procedimento de extração com o dispositivo MEPS é simples como descrito na **Figura 10**. Similarmente a SPE, a MEPS possui quatro etapas de extração, porém por se tratar de uma seringa não há a percolação da amostra, mas sim a realização de ciclos de aspiração e dispersão da amostra. Incialmente é feito o (1º) condicionamento da fase estacionária através da aspiração e dispersão de um solvente apropriado; (2º) extração ou aspiração da amostra

para interagir com o sorbente e, em seguida, é dispensada, sendo esse ciclo repetido inúmeras vezes para aumentar a eficácia da extração; etapa (3º) limpeza (*Clean-up*) da fase estacionária, para eliminação de interferentes da matriz; (4º) eluição do analito com solvente adequado [47].

Em virtude de sua miniaturização e baixo volume (µL) de solvente obtido na eluição, contendo os analitos de interesse, pode ser injetado diretamente no instrumento analítico: HPLC, GC, CE e EM. Logo, as técnicas miniaturizas representa um extraordinário avanço, uma vez que, facilitam a automação durante os procedimentos analíticos [47].

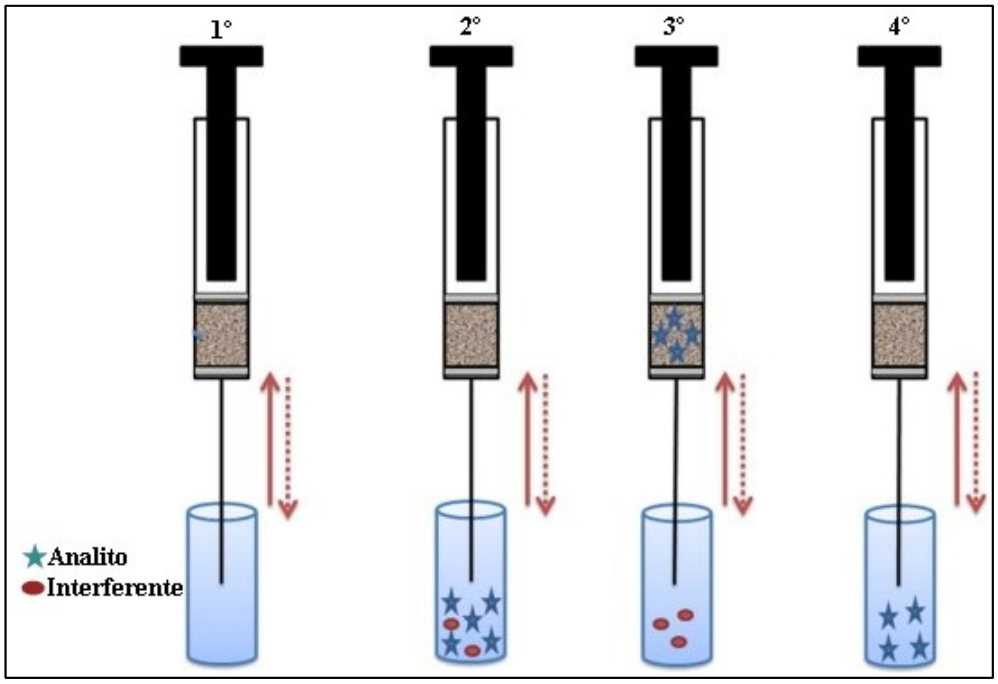


Figura 10- Etapas do procedimento de extração em MEPS:
(1º) condicionamento, (2º) extração ou aspiração da amostra, (3º) limpeza ou *clean-up*; (4º) eluição do analito.
Fonte Retirado: MAHDI MOEIN, *et al.,* 2015 [48].

No procedimento de extração há diversos parâmetros que devem ser otimizados como: volume de amostra, pH da amostra, número de ciclos aspirar/dispensar; composição e volume dos solventes das etapas de limpeza e eluição dos analitos. As microcolunas de MEPS, dependendo da complexidade da amostra e dos cuidados do analista, podem ser reutilizadas de 50 a 100 vezes, o que difere dos cartuchos de SPE, que em geral não são reutilizáveis [28].

Essa técnica tem sido aplicada para análise de uma variedade de analitos em matrizes ambientais, alimentos e com grande destaque às análises de fármacos em fluidos biológicos com aplicações na área clínica, uma vez que, demanda uma pequena quantidade (10−250 µL) de amostra [49].

Por se tratar de uma matriz complexa, devido à presença de proteínas e dentre outros compostos endógenos, os fluídos biológicos necessitam de uma etapa adicional de pré-preparo de amostra. Geralmente para sangue total, plasma e urina são realizados procedimento de precipitação das proteínas com acidificação e/ou adição de solventes orgânicos (acetonitrila ou metanol) e pode ser feito ajustes de pH com soluções-tampão. Por conseguinte, a diluição da amostra biológica com solução-tampão diminui a viscosidade da amostra, consequentemente, favorece a transferência de massas dos solutos para a fase extratora e previne o entupimento das microcolunas de MEPS [28,49].

A etapa de pré-preparo visa não somente tornar mínimo o efeito da matriz biológica no procedimento de MEPS, mas também gerar cromatogramas mais limpos, com menores ruídos na linha de base e aumentar a robustez, isto é, fornece o aumento da vida útil das microcolunas [49].

Previamente ao procedimento de extração, a escolha do sorbente é um fator importante para a aquisição de altas taxas de recuperação, pois a fase extratora deve ser adequada para a retenção do soluto almejado, por exemplo, fases reversas (C2, C8 e C18) são ideias para extrair compostos lipofílicos, assim como as fases poliméricas que possuem agrupamentos iônicos se adequam a determinações de solutos de caráter ácidos ou básicos [28].

Diferente da SPE, a etapa de condicionamento na MEPS visa não somente o ajuste da força do sorbente para o recebimento da amostra aquosa, como também, objetiva a limpeza da microcoluna que pode ser reutilizada nas demais extrações, desse modo, reduzindo o efeito memória (*carry-over*). Geralmente, é ativada ou condicionada com alíquotas de solvente orgânico e, em seguida, por um solvente mais polar como água ou solução-tampão [50].

A concentração dos analitos é realizada por um ou vários ciclos de aspiração/dispersão da amostra (10–250 µL) com o mesmo volume da amostra em um recipiente ou pela aspiração de um volume fixo seguida da dispersão no descarte. O aumento do número de ciclos favorece a percolação da amostra e a interação soluto/sorbente, consequentemente, aumenta a taxa de recuperação dos analitos, entretanto acima de 10 ciclos de extração completos torna-se inviável, pois a técnica tem como um dos objetivos facilitar a extração dos analitos de interesse por consequência do maior número de ciclos aumenta-se o tempo da etapa de preparo [50].

Na etapa de limpeza, os interferentes podem ser removidos com o uso de solventes (50–100 µL) como água, soluções ácidas (0,1 % ácido fórmico), soluções-tampão ou mistura de água com solvente orgânico (5−10% metanol, acetonitrila ou isopropanol). A concentração do solvente orgânico, bem como, o pH das soluções-tampão são parâmetros importantes a

serem avaliados, uma vez que, podem ocasionar a perda do soluto. Logo, a etapa de lavagem ocasiona a remoção de compostos endógenos remanescentes aumentando a seletividade e obtenção de extratos mais puros [50].

A técnica MEPS ao contrário da SPE não requer uma etapa adicional de evaporação ou redissolução do extrato, pois os analitos sorvidos na fase sólida são eluídos com uma alíquota (20–200 μL) de fase móvel utilizada no próprio processo cromatográfico ou por um solvente orgânico compatível injeção no sistema analítico. A dessorção pode ser realizada em apenas um ciclo ou em vários ciclos de aspirar/dispersar no mesmo recipiente. Quanto maior a massa do sorbente, maiores serão os volumes de solvente para os procedimentos de eluição (dessorção), limpeza e condicionamento da fase extratora [28,50].

Para se obter maior recuperação, o pH da solução eluente (ionização dos solutos) também é um parâmetro importante a ser ajustado dependendo do analito de interesse. O aumento do volume do eluente e da concentração de solvente orgânico na solução favorece a dessorção dos fármacos, porém, ocasiona uma diluição do extrato obtido [28,50].

1.3.2.3 Modos de operação

Atualmente, houve um grande desenvolvimento quanto ao modo de operação com o dispositivo MEPS, por se tratar de uma de microextração, o que facilita ainda mais a automação no procedimento de extração e, consequentemente, em todo processo analítico. A MEPS está disponível comercialmente nas formas manual, semiautomática e automatizada.

Primeiramente, no modo de operação *off-line* (modo manual), no qual todas as etapas da extração (condicionamento, extração, limpeza, eluição e injeção) são realizadas manualmente pelo analista. A microcoluna de extração (BIN) está inserida internamente na microsseringa e não podem ser separadas, impossibilitando a troca da fase extratora (**Figura 11 A)**. Por conseguinte, a microcoluna passou a ser fixada na parte externa fixada na agulha, sendo possível a sua remoção do corpo da microsseringa, dessa maneira, admitindo a troca do sorbente em conjunto com a retirada da agulha e a microcoluna (**Figura 11 B)**, porém comercialmente não existe um dispositivo que admite a troca da fase extratora, pois a microcoluna é lacrada não permitindo a sua abertura [51].

No modo de operação *at-line* (semiautomático) (**Figura 11 C**) a microsseringa MEPS está acoplada ao dispensador automático (por exemplo: *eVol® XR hand-held automated analytical syringe*), o qual permite que possa ser programado os ciclos de aspiração/dispensão

nas quatro etapas extrativas e, também, admite delinear a quantidade de volumes exatos e precisos de 200 nL a 1 mL e o controle da vazão [51].

Com relação ao modo de operação *online* (em linha indiretamente) pode ser realizado por plataformas totalmente automatizados que são capazes de realizar todas as etapas envolvidas no processo de extração. O modo *online* no processo com MEPS consiste na junção do dispersor automático com amostradores e um auto injetor (por exemplo: *CombiPal autosampler*®, procedimento em linha com GC) (**Figura 11 D**) [28,51].

Ambas configurações semiautomática e automática, implica na diminuição dos coeficientes de variação interensaios (precisão analítica) e a redução do tempo de extração para alguns minutos (1-2 min), visto que minimizam os erros intrínsecos ao operador humano. No MEPS, o procedimento repetitivo de aspirar/dispensar a amostra por vários ciclos, para a pré-concentração dos analitos, quando realizado manualmente, é visto como uma desvantagem para a técnica. Porém, apesar de ser o primeiro formato comercial disponível e o mais simples, a MEPS manual, ainda é amplamente empregada pela comunidade cientifica [28,51].

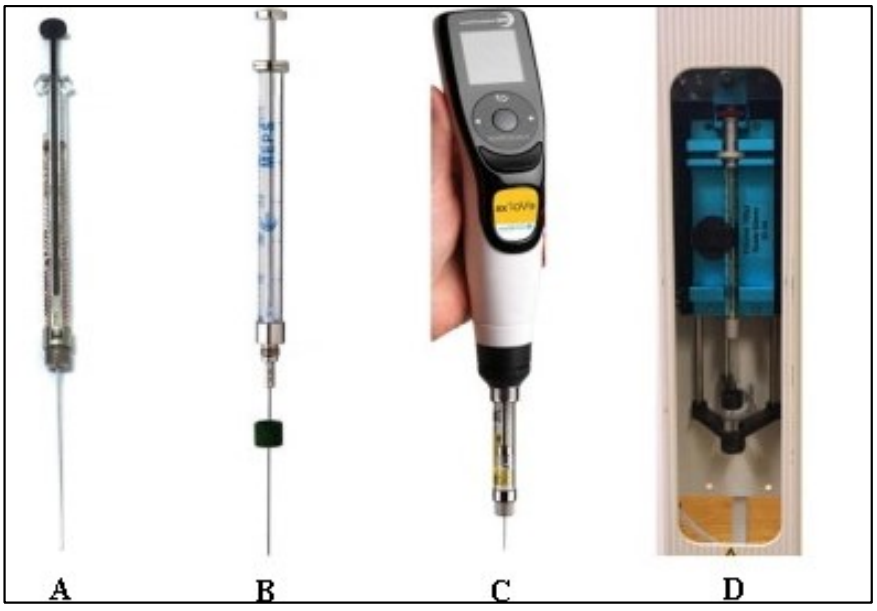


Figura 11 Modos de Operações com a MEPS:
(**A**) e (**B**) manual ou *off-line*, (**C**) semiautomático ou *at-line* e (**D**) automático ou *online.* Fonte Retirado: MAHDI MOEIN, *et al.,* 2015 [48].

No presente trabalho a técnica de MEPS foi desenvolvida utilizando-se um dispositivo projetado no laboratório e confeccionado pela oficina mecânica do Intituto de Química de São Carlos−IQSC (**Figura 12**). O protótipo foi elaborado visando superar algumas das limitações do análogo comercial desenvolvido pela SGE *Analytical Science* (fácil entupimento,

impossibilidade de regeneração, troca dos *frits,* troca do sorberte, e também, o limitado número de fases extratoras disponíveis comercialmente para a técnica).

Embora o método empregado seja manual, a grande vantagem do dispositivo utilizado é a possibilidade de livre escolha do material sorbente, devido a microcoluna ser completamente móvel, tanto da agulha quando da microsseringa, e totalmente desmontável permitindo que o próprio analista realize a troca da fase extratora e *frits*, o que garante uma melhor eficiência do método.

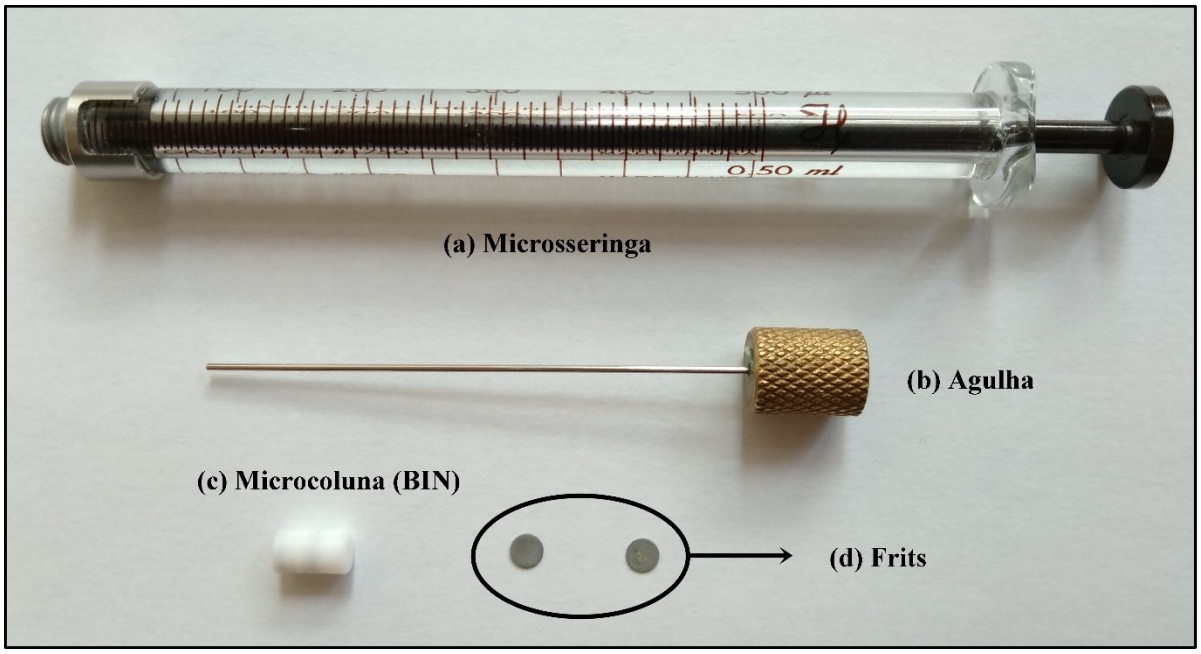


Figura 12 Componentes do dispositivo MEPS modificado.
(a) Microsseringa, (**b**) agulha, (**c**) microcoluna (BIN) e (**d**) *frits*.
Fonte: Próprio autor.

1.3.2.4 Tipos de fases

A seletividade está diretamente relacionada ao tipo de fase extratora, quando se trabalha com a MEPS, é um importante parâmetro a ser avaliado. A escolha fundamenta-se na polaridade dos analitos e da amostra, em virtude que a não interação efetiva dos analitos com a fase extratora provoca o baixo rendimento do processo [28].

As fases disponíveis comercialmente consideradas tradicionais, pois ainda são bastante empregadas na cromatografia líquida e na SPE, têm-se: fase normal sílica (SiO_2) e as fases reversas octadecilsilano (C18), octilsilano (C8), dissilano (C2). Essas fases a base de sílica, são estáveis em valores de pH entre 2 e 8, abaixo do pH 2 ocorre a quebra dos agrupamentos

silanóis e em pH acima de 8 favorece a solubilização da sílica. Além dessas, há também fases como: trocador de cátions forte (SCX), trocador de ânions forte (SAX) e fase mista M1 (80% C8 e 20% SCX); poliestireno-divinilbenzeno (PS-DVB) e carbono grafítico poroso [49,51].

A quantidade de fase extratora utilizada nas extrações por MEPS é inferior a 5 mg. Entretanto, a variedade de fases extratoras para MEPS disponíveis comercialmente é inferior as disponíveis para SPE. Os materiais sorbentes para MEPS, apresentam diâmetro de partícula 30−50 μm e porosidade de 60 Å [49].

A introdução de fases extratoras de material polimérico, por exemplo, PS-DVB (**Figura 13**) foi um avanço que possibilitou a extração de compostos polares, uma vez que, essas fases têm aumentado a interação soluto/sorbente de forma eficiente, por possuírem características hidrofóbicas devido à grande quantidade de carbono na constituição estrutural, que lhe confere maior área superficial e ainda diferentemente das fases clássicas tem capacidade de aplicação numa vasta faixa de pH (1−13) [52,53].

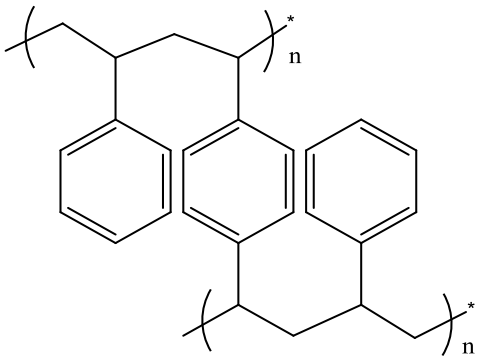


Figura 13 Estrutura polimérica da fase extratora apolar PS-DVB.

Atualmente o emprego de fases de materiais poliméricos funcionalizados tem mostrado uma relação de recuperação e reprodutibilidade maior, tanto para os compostos polares quanto para os não polares. Essas fases têm apresentado bons resultados na extração de fármacos, pois esses compostos (com grupamentos ácidos e básicos) podem interagir com a parte lipofílica ou hidrofílica do sorbente (*hydrophilic-lipophilic-balanced*−HLB), isto é, aumentar o poder de retenção dos analitos, como por exemplo, a fase extratora comercializada pela Waters® Oasis HLB (**Figura 14**) [52,53,54].

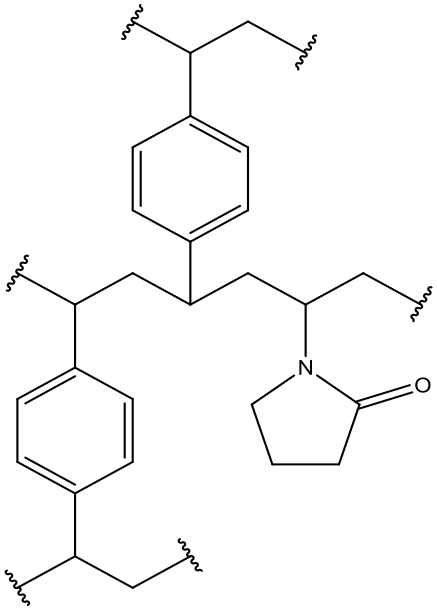


Figura 14 Estrutura polimérica da fase extratora Oasis HLB comercializada pela Waters®.

1.3.2.5 Aplicações e publicações relacionadas a MEPS em fluídos biológicos

Apesar de relativamente nova devido a sua versatilidade, a MEPS, tem sido bastante empregada em diversos tipos de analises em matrizes ambientais, alimentos e com destaque no campo clínico, farmacológico e toxicológico em determinações de fármacos em fluídos biológicos (urina, sague total, plasma, saliva, cabelo, leite materno, etc), por ser adequada aos princípios da química verde, baixo consumo de solventes e demanda pequena quantidade de amostra (μL) [49,51].

Um levantamento baseado no sistema de busca bibliográfica *Scopus* demostrou 63 artigos relacionados aos tópicos: MEPS, microextração e o fluido biológico urina, entre os anos de 2005 a 2018, sendo o ano de 2013 e 2015 com maior número de publicações (**Figura 15**). Quando se restringe a busca para os tópicos: MEPS, microextração, urina e NSAIDs, existem apenas 3 publicações relacionadas [1,55,56], entre 2013-2016 (**Figura 16**). Dentre essas publicações, foram determinados em plasma e urina, os fármacos cetoprofeno e ibuprofeno, porém nenhuma delas determinou o fármaco fenoprofeno em urina humana, além disso, no presente trabalho o método empregado difere-se no que diz respeito a configuração do dispositivo MEPS.

A **Tabela 2** refere-se a revisão da literatura de metodologias analíticas que determinaram os fármacos cetoprofeno e ibuprofeno em fluídos biológicos utilizando-se

diferentes técnicas de preparo de amostra miniaturizadas. Ressalva-se que o fenoprofeno não foi determinado em nenhum desses trabalhos.

Diante disso, avaliando as problemáticas ocasionadas pelo uso continuo de fármacos anti-inflamatórios e o fato de que na literatura não há muitos estudos que contemplam a quantificação de NSAIDs em urina humana, por HPLC com o emprego da técnica de MEPS na etapa de preparo de amostra. Assim, julgou-se necessária a proposta de um estudo para o desenvolvimento de um método analítico para a quantificação simultânea dos NSAIDs já supracitados na matriz biológica urina humana.

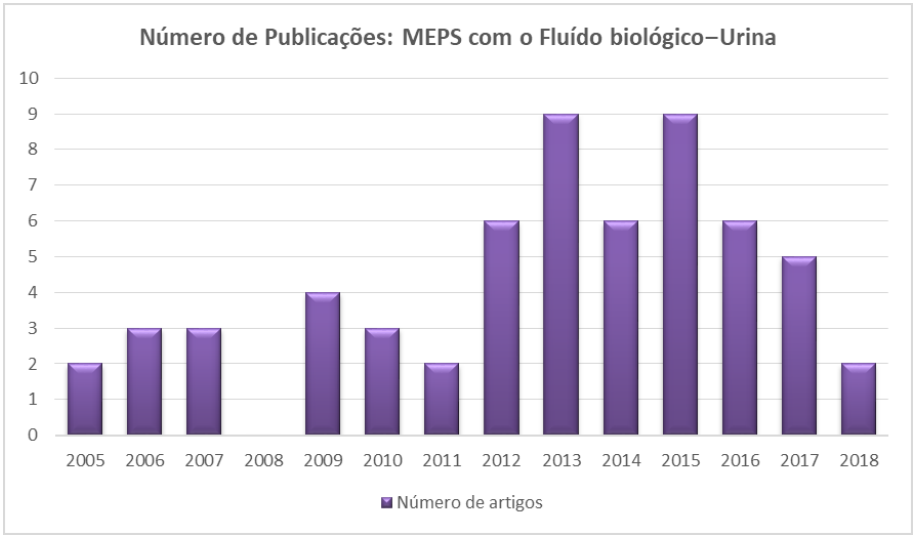


Figura 15 Busca pelos tópicos utilizando microextraction*, MEPS*e Urine*.
Fonte: *Scopus*. Dia da Pesquisa: 25/04/2018 17h.

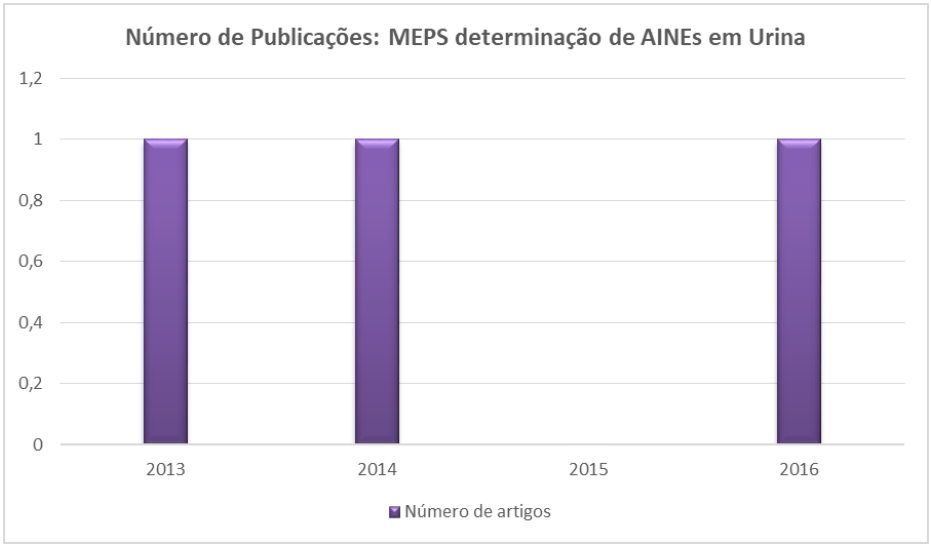


Figura 16 Busca pelos tópicos utilizando microextraction*, MEPS*, Urine* e NSAIDs.
Fonte: *Scopus*. Dia da Pesquisa: 25/04/2018 17h.

Tabela 2 Publicação relacionadas à determinação de NSAIDs em fluídos biológicos com diferentes técnicas de preparo de amostra.

Fármacos	Matriz	Técnica de preparo	Método de separação	Análise instrumental	Observações	Ano	Ref.
furprofeno indoprofeno cetoprofeno fenobufeno ibuprofeno flurbiprofen indometacina	plasma e urina	MEPS Sorbente: Strata-X	4,6 mm × 250 mm C18	HPLC-PDA	LOD=0,03 μg mL^{-1} LOQ= 0,1 μg mL^{-1}	2016	[55]
furprofeno indoprofeno cetoprofeno fenobufeno ibuprofeno flurbiprofeno indometacina	plasma e urina	MEPS Sorbente: Strata-X	4,6 mm × 250 mm C18	HPLC-PDA	LOD=0,03 μg mL^{-1} LOQ= 0,1 μg mL^{-1}	2014	[1]
ácido acetil salicílico cetoprofeno diclofenaco naproxeno ibuprofeno	urina	MEPS Sorbente: C18	100 mm ×3 mm C18	UHPLC	LOD=1,07-16,2 ng mL^{-1}	2013	[56]
cetoprofeno naproxeno diclofenato ibuprofeno	urina e saliva	μLPME	20 mm ×4,6 mm 5 mm C18	HPLC-DAD	LOQ= 100-500 μg L^{-1}	2016	[57]
cetoprofeno fenbufeno ibuprofeno	urina e água	PMME Sorbente: MIL-53(Al)	25 cm ×4,6 mm C18	HPLC-PDA	LOD=0,12-0.24 μg L^{-1} LOQ= 0,40-0,85 μg L^{-1}	2015	[58]

cetoprofeno fenbufeno ibuprofeno	urina	SPME	150 mm × 4,6 mm 5 mm C18	HPLC-UV	LOD=38;18 e 28 ng mL^{-1}	2005	[59]
cetoprofeno naproxeno	urina e saliva	d−SPE Sorbente: c-TNTs	250 mm × 4,6 mm 5 µm C18	HPLC-UV	LOD_{urina}= 81,1e 110 µg L^{-1} LOD_{saliva}=40,8 e 34,1 µg L^{-1}	2014	[60]
naproxeno ibuprofeno	leite de vaca, urina humana e água	UAMD−SPME	6.4 mm × 250 mm 5.1 µm C18	HPLC-PDA	LOD=0,03 e 0,1 ng mL^{-1} LOQ=0,1 e 0,3 ng mL^{-1}	2016	[61]
cetoprofeno naproxeno diclofenato ibuprofeno	urina	SF−µLPME	20 mm × 4,6 mm 5 µm C18	HPLC-UV	LOD=0,7-8,5 µg L^{-1} LOQ=2,3-28,3 µg L^{-1}	2018	[62]
cetoprofeno naproxeno	urina	SLM	−	CE−UV-Vis	LOD=0.05-1,5 µg mL^{-1}	2017	[63]
cetoprofeno naproxeno diclofenaco ácido mefenâmico	urina e água	BAµE-µLD	150 mm × 2,1 mm 5 µm C18	HPLC-DAD	LOD=25,0-120,0 ng L^{-1} LOQ=83,0-400,0 ng L^{-1}	2017	[64]
cetoprofeno diclofenaco ibuprofeno naproxeno	urina	SDME	−	CE-UV	LOD=1,0-2,5 µg mL^{-1}	2016	[65]
ácido mefenâmico cetoprofeno diclofenaco	urina	DLLME-SFO	100 mm × 2,1 mm 3,5 µm C18	HPLC-SPD	LOD=0,0034-0,0052 µg mL^{-1} LOQ=0,0114-0,0172 µg mL^{-1}	2015	[66]

cetoprofeno diclofenaco ibuprofeno naproxeno	urina	RDSE	100 mm × 4,6 mm 5 mm C18	LC-UV	LOD=0,022-0,044 μg mL^{-1} LOQ=0,072-0,146 μg mL^{-1}	2014	[67]
cetoprofeno indometacina furbiprofeno naproxeno	urina	DLLME	150 mm × 4,6 mm C18	LC-UV	LOD= 8,3-32,0 ng mL^{-1}	2009	[68]
tolmetina cetoprofeno naproxeno fenbufeno flurbiprofeno indometacina	urina	d-LPME	150 mm × 4,6 mm C18 150 mm × 4,6 mm C8	LC-UV	LOD=38,0-70,0 ng mL^{-1} LOQ= 126,0-233,0 ng mL^{-1}	2008	[69]
cetoprofeno ibuprofeno fenbufeno	urina	LPME	–	CE-DAD	LOD=1,2-1,7 μg L^{-1} LOQ= 4,1-5,6 μg L^{-1}	2007	[70]
indometacina tolmetina cetoprofeno naproxeno fenbufeno flurbiprofeno	urina	SM−LLME	250 mm × 4,6 mm C18	HPLC-UV	LOD=12,6-30,7 μg L^{-1} LOQ= 41,2-102,4 μg L^{-1}	2012	[71]
cetoprofeno	plasma humano e de rato	HF-LPME	250 mm × 4,6 mm 5 μm C18	HPLC-PDA	LOD=6,0 ng mL^{-1} LOQ= 20 ng mL^{-1}	2013	[72]
cetoprofeno ibuprofeno fenbufeno	plasma e água	SPME	150 mm × 2,0 mm 5 μm C18	HPLC-ESI-MS	LOD_{plasma}= 2,63-4,77 ng mL^{-1} $LOD_{água}$=0,20-0,57 ng mL^{-1} LOQ_{plasma}= 6,70-15,9 ng mL^{-1} $LOQ_{água}$=0,65-1,87 ng mL^{-1}	2012	[73]

ibuprofeno naproxeno diclofenaco	plasma e urina	AALLME	30 m × 0,25 mm 0,25 μm Coluna capilar	CG-FID	LOD_{urina}= 0,06-3,3 ng mL^{-1} LOD_{plasma}=0,24-13 ng mL^{-1} LOQ_{urina}= 0,21-9,2 ng mL^{-1} LOQ_{plasma}=0,84-37 ng mL^{-1}	2016	[74]
ibuprofeno naproxeno diclofenaco	plasma e urina	AALLME	150 mm × 4,6 mm 5 μm C18	HPLC-VWD	LOD= 0,20-0,52 ng mL^{-1} LOQ=0,58-160 ng mL^{-1}	2015	[75]

Siglas e Abreviaturas Tabela 2:

ALLME: microextração líquido-líquido assistida por ar

BAμE−μLD: microextração por adsorção em barra com desorção de microlíquido dispersivo líquido-líquido

c-TNTs: nanotubos de dióxido de titânio revestidos com carbono

DLLME: extração líquido-líquido dispersiva

DLLME-SFO: microextração baseada na solidificação de gotículas orgânicas flutuantes

d−LPME: microextração em fase líquida dinâmica

HF−LPME: microextração em fase líquida com fibra oca

LLE: Extração líquido-líquido

LPME: microextração em fase líquida

PMME: microextração de polímero monolítico

RDSE: extração por sorção de disco rotativo

SDME: extração por gota única

SF−μLPME: microextração em fase líquida com fluxo duplo interrompido

SLM: membrana Líquida Suportada

SM−LLME: microextração líquido-líquido de membrana de agitação

SPE: extração em fase sólida

SBSE: extração por barra sortiva de agitação

SPME: microextração em fase sólida

MEPS: microextração por sorbente empacotado

UAMD−SPME: microextração dispersiva magnética em fase sólida assistida por ultrassom

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver, otimizar e validar um novo método analítico para quantificar fármacos anti-inflamatórios não esteroidais: ibuprofeno, cetoprofeno e fenoprofeno, em amostras biológicas de urina, por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD) utilizando a técnica de MEPS na etapa de preparo de amostra.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método analítico para quantificação dos fármacos ibuprofeno fenoprofeno e cetoprofeno;
- Avaliar diferentes fases extratoras para MEPS utilizando análise univariada;
- Otimizar as etapas de condicionamento, extração e lavagem (*clean up*) e eluição por análise multivariada;
- Desenvolver o método analítico na matriz biológica de urina;
- Validar o método analítico por parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e recuperação.

3 METODOLOGIA

3.1 MATERIAIS

Os padrões analíticos utilizados cetoprofeno, fenoprofeno e ibuprofeno foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) com 99,5% de pureza.

Os solventes utilizados foram metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) de grau HPLC da J.T.Baker (México), água ultrapura foi adquirida pelo sistema Milli-Q (Millipore). O ácido acético glacial Fmaia (Brasil). O sorbente utilizado na extração com MEPS foi a fase polimérica HLB Oasis da Waters.

Também foram utilizados balança analítica eletrônica modelo FA2104N, agitador Vortex da Nova Instruments e lavadora de ultrassom da Apax. Os cromatogramas, gráficos, para a análise e tratamento de dados foram feitos pelo OriginPro8 e Excel.

3.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES

Os padrões analíticos de cetoprofeno, fenoprofeno e ibuprofeno foram previamente pesados (10 mg de cada padrão) e dissolvidos com 10 mL de metanol, para obtenção das soluções padrões estoque na concentração de 1000 $\mu g\ mL^{-1}$.

Posteriormente, para a etapa da otimização da fase móvel utilizou-se uma solução trabalho na concentração de 5 $\mu g\ mL^{-1}$ e na etapa de preparo de amostra, foi preparada uma solução intermediaria dos NSAIDs na concentração de 100 $\mu g\ mL^{-1}$, ambas preparadas a partir da diluição das soluções padrões estoque.

3.3 MÉTODO CROMATOGRÁFICO

O método analítico foi desenvolvido utilizando o equipamento HPLC da Shimadzu, modelo Prominence 20A, com bomba quaternária LC-20AT, controladora CBM-20A, amostrador automático SIL-20AC, detector DAD SIL-20AC e forno decade II Anatec. No sistema cromatográfico utilizou-se uma coluna de fase reversa Zorbax Eclipse C18 (150 mm × 4,6 mm; 5 μm) da Agilent Technologies, temperatura do forno conservada a 35ºC, o volume de injeção de 20 μL na etapa de otimização da fase móvel e 50 μL na etapa de otimização com o MEPS e na validação analítica. A fase móvel utilizada ACN: H_2O+0,1% de ácido

acético 50:50 (v/v) (pH=3,0), no modo isocrático com vazão da fase móvel de 1 mL min^{-1} e comprimento de onda monitorado de 220 nm. Utilizou o software LC Solution (Shimadzu) para obtenção dos dados e controle dos módulos do sistema.

3.4 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

As matrizes biológicas de urina foram solicitadas ao Ambulatório do Hospital Universitário-UFMS (HU−UFMS), seguindo as diretrizes do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) sob o protocolo CAAE: 82497517.10000.0021.

Das amostras de branco de urina adquiridas foi feito um *pool*, com a finalidade de aumentar a complexidade da matriz, realizou-se um processo de filtração simples da urina com papel de filtro qualitativo de gramatura de 80 g m^{-2}, espessura de 205 µm e porosidade de 14 µm e conseguinte foram guardadas no refrigerador e mantidas a 4ºC.

3.5 DISPOSITIVO MEPS

O dispositivo para a extração por MEPS **Figura 17** constitui de uma seringa da SGE Analytical Science (Austrália) modificadas na oficina mecânica do IQSC/USP de São Carlos – SP para a inserção do cartucho de sorção.

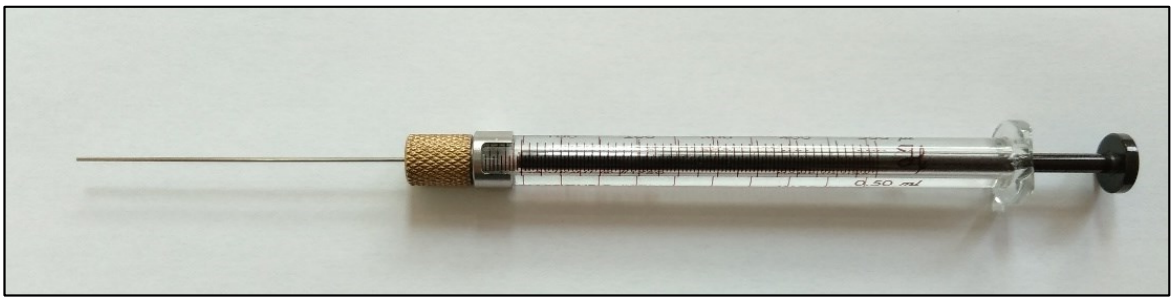


Figura 17 Dispositivo MEPS utilizado.
Fonte: Próprio autor.

3.6 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO COM O MEPS

O procedimento de extração foi otimizado utilizando-se uma microcoluna empacotada com sílica Oasis HLB, para posterior utilização na validação analítica. Assim, procedeu-se da seguinte maneira: em frascos de centrífuga (2,0 mL) foi adicionada uma alíquota de 100 µL de urina fortificada com 10 µL de uma solução intermediária com a mistura dos padrões na

concentração 100 µg mL^{-1} e adicionou-se 100 µL de água deionizada para diluição da amostra (1:1,v/v). Agitou-se durante 30 segundos em vórtex e em seguida realizou-se à extração da amostra por MEPS.

Inicialmente, realizou-se acondicionamento prévio do cartucho de extração com 3×100 µL de metanol e 3×100 µL de água deionizada, a extração com a amostra foi efetuada com 7 ciclos com a microsseringa de extração MEPS, em seguida procedeu-se à lavagem da coluna 3×100 µL de água: metanol 95:5 (v/v). Os analitos foram eluídos com 200 µL de acetonitrila, aplicando-se 7 ciclos de aspiração/dispersão com este mesmo volume, sendo no último ciclo na dispersão adicionado o volume em *insert* para posterior separação cromatográfica em HPLC-DAD, sendo o volume de injeção de 50 µL. Depois de cada extração procedeu-se à lavagem da fase estacionária com 5×100 µL de acetonitrila e 5×100 µL de metanol e recondicionamento, para evitar eventualmente o efeito de memória (*carryover)* nas demais extrações (**Figura 18**).

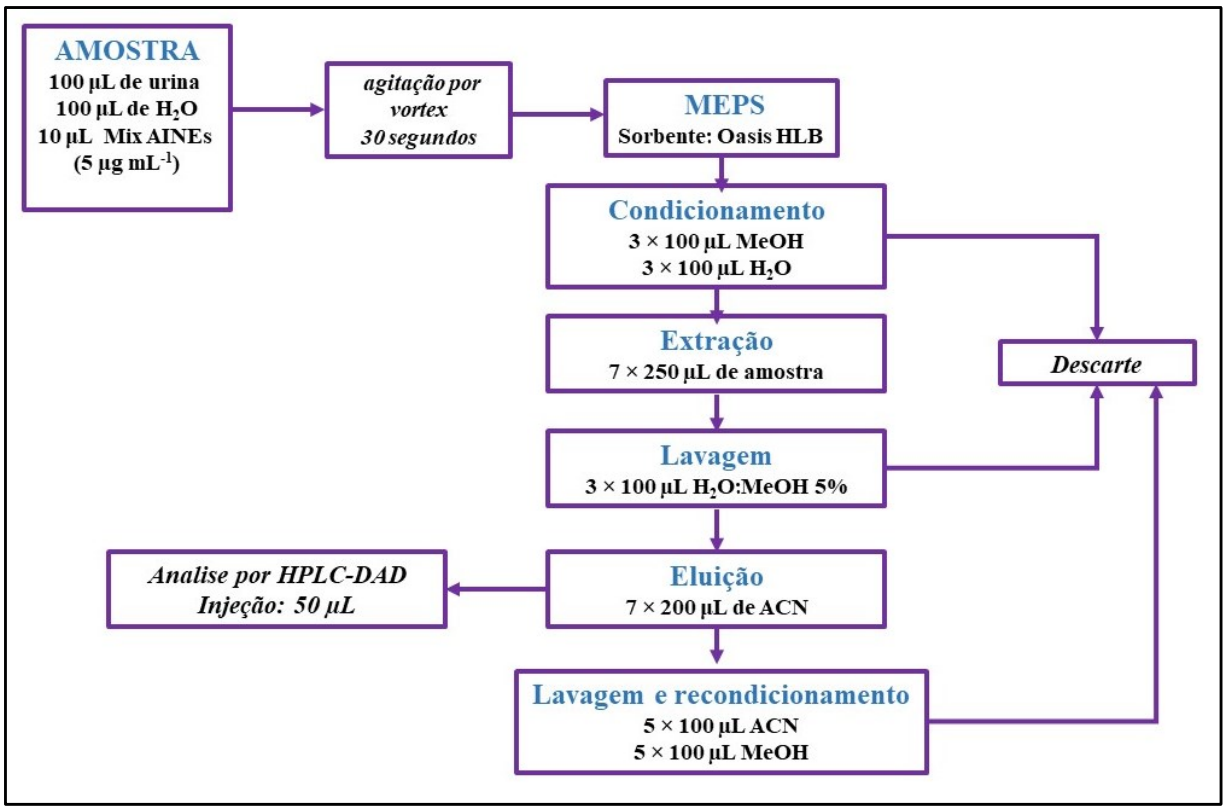


Figura 18 Fluxograma extração com o MEPS: Otimização com o sorbente Oasis HLB.
Fonte: Próprio autor.

3.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Na realização do procedimento de validação analítica foram preparadas novas soluções estoque dos fármacos: cetoprofeno, fenoprofeno e ibuprofeno em MeOH na concentração de 1000 μg mL^{-1}. A partir das soluções estoque, foram preparadas soluções intermediárias para cada fármaco nas respectivas concentrações de 30;45;60;75;90 e 105 μg mL^{-1}. Essas soluções foram usadas para fortificação das amostras de urina no processo de validação. As soluções estoque foram mantidas em *freezer*, e as soluções de trabalho mantidas sob refrigeração a 4ºC.

Para atingir as concentrações da faixa de trabalho (3,0;4,5;6,0;7,5;9,0 e 10,5 μg mL^{-1}), alíquotas de 10 μL de cada solução intermediária foram transferidas para frascos de centrífuga de 1,5 mL contendo 100 μL de urina e posteriormente diluídos com 100 μL de água. As amostras foram homogeneizadas em vórtex por 30 segundos e conseguinte submetidas a extração com MEPS em triplicata de cada nível de fortificação.

Na validação utilizou-se como base as recomendações da Resolução da diretoria colegiada─RDC nº 166 da Agencia Nacional de vigilância sanitária─ANVISA guiada para validação de métodos analíticos [76], no qual, foram avaliados os seguintes parâmetros analíticos: seletividade; linearidade; precisão e exatidão intra e inter-dias; recuperação; limite de detecção e quantificação.

Das amostras de branco de urina foi preparado um *pool* de urina o qual foi utilizado na validação da metodologia. A seletividade do método foi avaliada realizando-se a injeção da matriz urina sem adição dos fármacos.

A linearidade foi avaliada através das curvas analíticas construídas por ensaios em triplicatas para os seis níveis de concentração (3,0;4,5;6,0;7,5;9,0 e 10,5 μg mL^{-1}) totalizando um n = 18 para cada fármaco analisado.

O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram determinados pelo método calculado através das equações **I** e **II**, com o desvio padrão (DP) e o coeficiente angular da curva analítica dos fármacos.

Equação **I** $LOD = 3{,}3 \times \frac{DP}{a}$ Equação **II** $LOQ = 10 \times \frac{DP}{a}$

A precisão intra-dia foi avaliada em triplicata em três níveis diferentes: baixo (3,0 μg mL^{-1}), médio (6.0 μg mL^{-1}) e alto (10,5 μg mL^{-1}) em dois dias contínuos, e a precisão inter-

dia foi avaliada com os resultados dos dois dias de coleta dos dados. Os resultados destes ensaios foram expressos em termos de desvio padrão relativo (DPR) (Equação **III**).

Equação **III** $$DPR(\%) = \frac{DP}{Média} \times 100$$

Os ensaios de exatidão, similar aos de precisão, foi calculada a exatidão intra e inter-dia, nos mesmos níveis: baixo, médio e alto, e os resultados foram apresentados em percentagem de desvio (Equação **IV**).

Equação **IV** $$Exatidão = \frac{Xexperimental - Xteórico}{Xteórico} \times 100$$

A recuperação foi determinada a partir de análises em branco de urina fortificada com os fármacos nos três níveis de concentração (baixo, médio e alto). A recuperação absoluta foi expressa pela percentagem de quantidade extraída, calculada com os valores obtidos pela fortificação da amostra no início extração pela razão dos valores obtidos com a fortificação no final da extração (Equação **V**). A recuperação relativa foi obtida pela relação entre o a média dos valores do branco de urina fortificado com os fármacos e a concentração teórica (Equação **VI**). Além disso, almeja-se determinar ademais parâmetros analíticos como o efeito matriz e a robustez

Equação **V** $$Recuperação\ Absoluta = \frac{Amostra\ fortificada\ no\ inicio}{Amostra\ fortificada\ no\ final} \times 100$$

Equação **VI** $$Recuperação\ Relativa = \frac{média\ do\ Xexperimental}{Xteórico} \times 100$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Inicialmente para o desenvolvimento do presente trabalho foi realizado um levantamento bibliográfico. De acordo com relatos na literatura, a fase estacionária bastante utilizada, devido à polaridade dos fármacos determinados (cetoprofeno, fenoprofeno e ibuprofeno), é a fase reversa C18. Diante disso, para o procedimento de otimização da separação cromatográfica dos NSAIDs utilizou-se HPLC-DAD no modo unidimensional, o comprimento de onda monitorado foi de 220 nm, com uma coluna de fase reversa Zorbax Eclipse C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 μm), sendo a temperatura do forno conservada a 35ºC, o volume de injeção 20 μL e com fluxo da fase móvel de 1,0 mL min^{-1}.

Desta maneira, foi utilizada uma solução intermediária contendo a mistura dos padrões na concentração de 5 μg mL^{-1}, para a realização dos testes de eluição. Para otimização da separação cromatográfica foram utilizados como solventes de fase móvel acetonitrila e água acidificada com 0,1% de ácido acético glacial (pH=3) em diferentes proporções (ACN: H_2O, 80:20, 70:30; 60:40; 50:50 e 40:60 v/v), sendo todas as otimizações feitas em unicata (n = 1)

Na cromatografia liquida é comum a utilização de ácidos orgânicos como modificador químico da fase móvel, essa adição é sempre sugerida quando deseja-se separar substâncias que possuem hidrogênios ionizáveis, no presente caso a adição do ácido acético glacial 0,1% atua no deslocamento do equilíbrio químico garantindo que os analitos de interesse permanecerão na forma não ionizada, favorecendo dessa maneira a obtenção de picos mais finos e intensos e por conseguinte uma melhora na resolução e sensibilidade.

A **Figura 19** demostra os cromatogramas obtidos da separação dos NSAIDs com os eluentes testados em diferentes proporções no modo isocrático, a ordem de eluição dos analitos foi respectivamente cetoprofeno (**1**), fenoprofeno (**2**) e ibuprofeno (**3**).

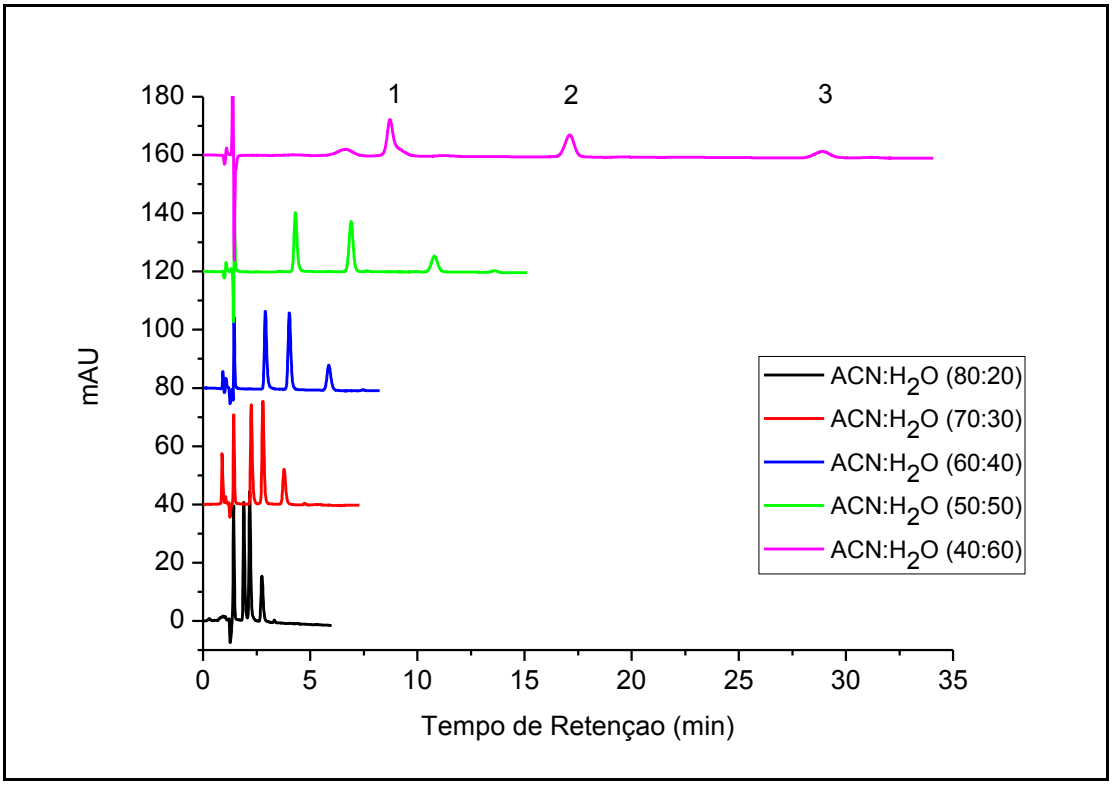


Figura 19 Cromatogramas obtidos nas diferentes proporções testadas. Ordem de eluição: cetoprofeno (**1**), fenoprofeno (**2**) e ibuprofeno (**3**), concentração: 5 µg mL^{-1}.Condições cromatográficas: comprimento de onda monitorado= 220 nm; coluna Zorbax Eclipse C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 µm); temperatura do forno= 35ºC; volume de injeção= 20 µL e fluxo da fase móvel= 1 mL min^{-1}.

Para avaliar qualitativamente a separação cromatográfica é imprescindível verificar alguns parâmetros cromatográficos para constatar se as condições estabelecidas na análise cromatográfica são capazes de gerar dados confiáveis se estão de acordo com os valores recomendados.

O fator de retenção (k) estabelece a relação entre o tempo em que um composto passa na fase estacionária e na fase móvel, pode ser calculado través da equação 1 [38]:

$$k = \frac{T_R - t_m}{t_m} \qquad \text{Equação 1}$$

Geralmente, sugere-se que em um método cromatográfico otimizado, o fator de retenção (k) dos compostos esteja na faixa de 2 – 10. Valores de k < 2 prejudicam a pureza do sinal cromatográfico devido os possíveis interferentes da matriz e a baixa interação do analito com a fase estacionária. Entretanto, valores de k > 10 promove tempo de análise longo, maior largura da base e picos menos intensos [38]. Com os dados obtidos dos cromatogramas

(**Figura 19**) pode-se realizar o cálculo dos valores de k e construir um gráfico relacionando k *versus* a proporção da fase aquosa na fase móvel (ACN:H_2O + 0,1 % ac.acético) (**Figura 20**).

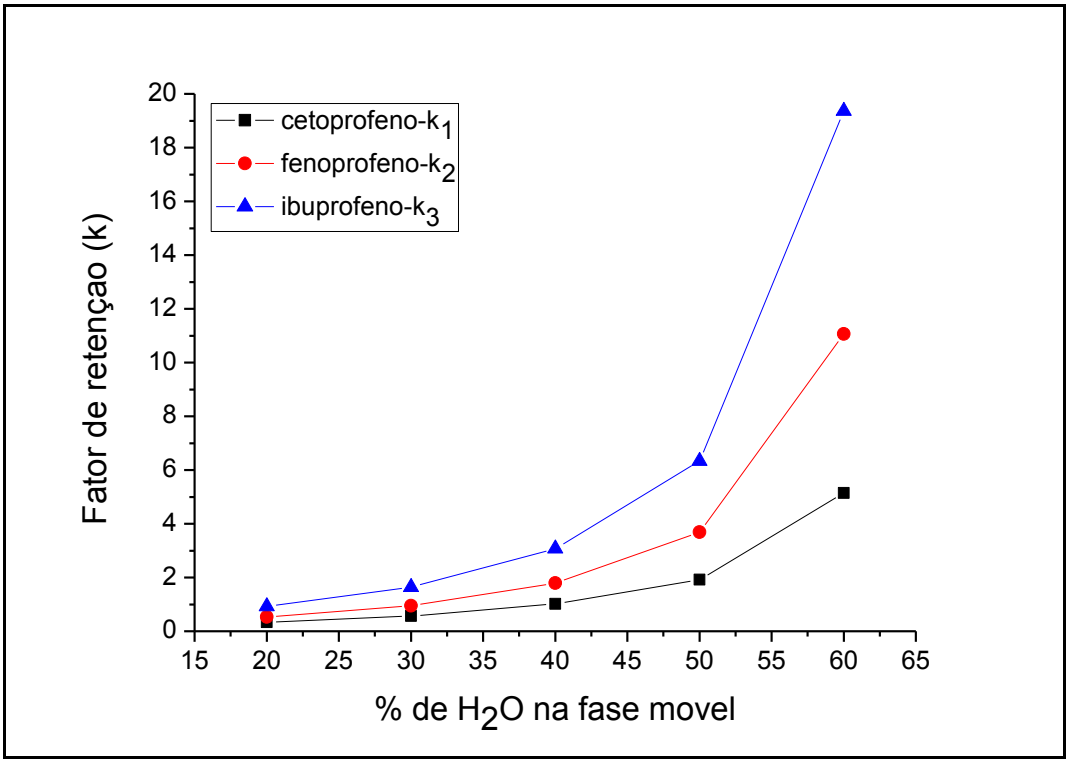


Figura 20 Gráfico do fator de retenção (k) *versus* a concentração da fase móvel.

Desta maneira, observa-se pelo gráfico (**Figura 20**) que o cromatograma que representou a melhor otimização da separação cromatográfica é o que proporcionou estimativas de k, para os três fármacos analisados, com maior proximidade da faixa dos valores recomendados, ou seja, a otimização com ACN:H_2O+ác. Acético 0,1 % na proporção de 50:50 (v/v) (**Figura 21**).

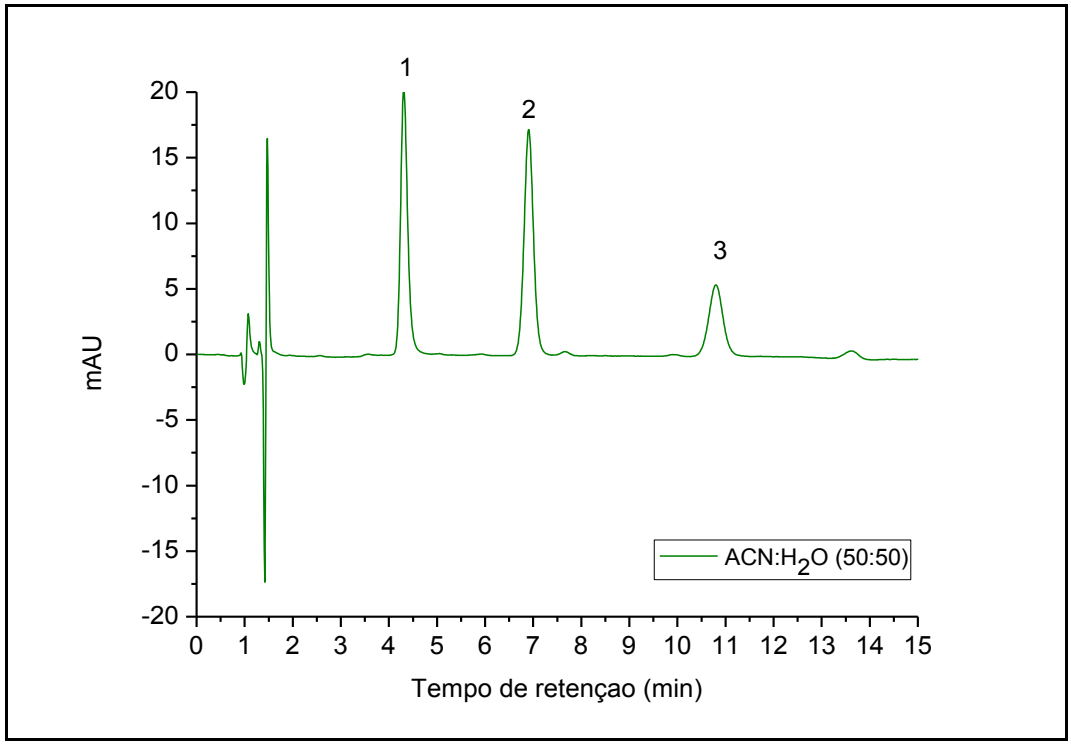


Figura 21 Otimização com ACN:H_2O + ác. Acético 0,1 % na proporção de 50:50. Ordem de eluição: cetoprofeno (**1**), fenoprofeno (**2**) e ibuprofeno (**3**). Condições cromatográficas: comprimento de onda monitorado= 220 nm; coluna Zorbax Eclipse C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 µm); temperatura do forno= 35ºC; volume de injeção= 20 µL e vazão da fase móvel=1 mL min^{-1}.

Após a escolha da melhor fase móvel através da análise dos valores de fator de renteção, foi possível a realização do cálculo dos demais parâmetros cromatográficos que são importantes na comprovação da otimização do método.

Os parâmetros para medir a eficiência da coluna cromatográfica é o número de pratos teóricos (N), altura equivalente a um prato teórico (H) e a altura reduzida do prato (h), fornecidos pelas respectivas equações (2 – 4) [38]:

$$N = \left(\frac{T_R}{Wb}\right)^2 \times 16 \qquad \text{Equação} \quad 2$$

$$H = \frac{L}{N} \qquad \text{Equação} \quad 3$$

$$h = \frac{H}{dp} \qquad \text{Equação} \quad 4$$

A resolução (Rs) de uma coluna fornece uma medida quantitativa da sua habilidade de separação entre dois analitos e o fator de separação (α) expressa o fator de separação entre os dois analitos, sendo calculados pelas equações 5 e 6 respectivamente [38]:

$$Rs = \frac{2(\Delta T_R)_{1,2}}{Wb_1 + Wb_2} \qquad \text{Equação 5}$$

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \qquad \text{Equação 6}$$

Desta maneira todos os parâmetros foram calculados através das equações apresentadas e dos dados advindos do cromatograma (**Figura 21**) como: largura da linha de base (Wb), tempo de retenção (T_R), bem como também dados da coluna utilizada como o seu comprimento (L) e diâmetro da partícula (dp), sendo o tempo morto (T_M) em 1,40 min. Os resultados obtidos foram apresentados na **Tabela 3.**

Tabela 3 Parâmetros cromatográficos.

Fármaco	Tr	k	N	N/m	H	h	TF	Rs	α
CET	4,304	1,924	3808	25384	39,4	7,88	1,278	-	-
FEN	6,901	3,688	5596	37307	26,80	5,36	1,070	8,02	1,60
IBU	10,79	6,334	5601	37342	26,70	5,36	1,035	8,41	1,72

Valores de referência: $2 < k < 10$; $N > 2000$; $TF < 2,00$; $Rs \geq 1,50$ e $\alpha > 1,00$.

Todos os fármacos apresentaram fator de separação (α) maior que 1,00 e número de pratos (N) maiores que 2000 o suficiente para promover a separação cromatográfica. Além disso, o parâmetro simetria da banda cromatográfica foi avaliado pelo fator de alargamento (TF) que para fins de quantificação, recomenda-se TF < 2,00, pois valores superiores a esse prejudicam a separação cromatográfica e a integração dos sinais devido a presença de cauda nos picos. Para picos com mesma intensidade e com valores de simetria próximos de 1,00 recomenda-se uma resolução (Rs) mínima de 1,50, ou seja, os valores obtidos foram bem superiores [38].

Tendo em vista, que houve uma menor intensidade do sinal para o fármaco ibuprofeno para a fase móvel selecionada (**Figura 21**), tentou-se realizar a otimização com sistema em gradiente na tentativa de melhora do parâmetro intensidade do sinal deste analito, bem como também uma diminuição do tempo de análise. Assim sendo, utilizou-se ACN:H_2O + ác.

Acético 0,1 % de 50:50 (v/v) no intervalo de 1-5 minutos de analise mudando-se a proporção para ACN:H_2O + ác. Acético 0,1 % 80:20 (v/v) durante 6-10 minutos do tempo de análise, de tal modo obteve-se então o cromatograma (**Figura 22**), que apresentou um padrão irregular da sua linha de base sendo descartada a sua posterior utilização, uma vez a fase móvel no modo gradiente seria difícil a utilização para fins quantitativos pelo padrão obtido.

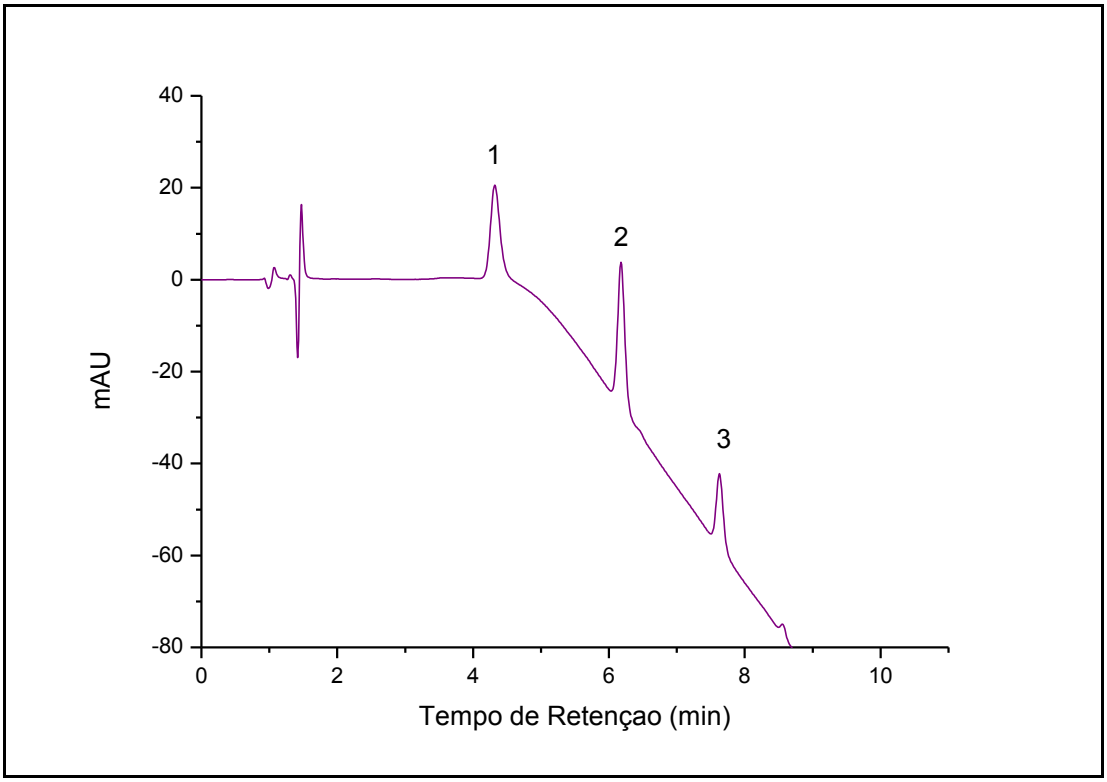


Figura 22 Otimização em modo gradiente.
Fase móvel: ACN:H_2O+ác. acético 0,1 % de 50:50 de 1-5 minutos e ACN:H_2O+ác. acético 0,1% 80:20 durante 6-10 minutos. Ordem de eluição: cetoprofeno (**1**), fenoprofeno (**2**) e ibuprofeno (**3**). concentração: 5 µg mL^{-1}. Condições cromatográficas: comprimento de onda monitorado= 220 nm; coluna Zorbax Eclipse C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 µm); temperatura do forno= 35ºC; volume de injeção= 20 µL e vazão da fase móvel= 0,2 mL min^{-1}.

4.2 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO POR MEPS

Há vários fatores susceptíveis de influenciar o processo de extração na MEPS e alguns deles foram analisados no processo de otimização com a fase extratoras utilizada, Oasis HLB, tais como: pH da amostra, número de ciclos que a amostra é aspirada pelo dispositivo de extração, solvente de lavagem, tipo de solvente de eluição, volume de solvente de eluição e número de ciclos de aspiração na eluição.

Alguns parâmetros a serem utilizados durante o procedimento de otimização da extração com a MEPS foram fixados como a quantidade de amostra de urina (100 µL), diluição da

amostra com 100 μL de água (diluição: 1:1, v/v) e a fortificação da amostra com 10 μL com uma solução contendo os três padrões na concentração de 100 μg mL^{-1}.

Para se obter uma maior eficiência no processo de extração, o material sorbente deve ser previamente acondicionado, permitindo assim uma maior interação entre os analitos de interesse com e a fase extratora. Desta maneira, estabeleceu-se que o acondicionamento da fase Oasis HLB com 3 ciclos de aspiração/dispersão inicialmente com metanol, seguido por 3 ciclos de aspiração/dispersão com água deionizada.

A influência do pH da matriz na eficiência de extração é um parâmetro muito importante a ser avaliado, uma vez que os fármacos estudados apresentam grupos ionizáveis a acidificação da amostra pode auxiliar na extração mantendo os grupos ácidos na sua forma não ionizada. Tendo em consideração que os valores de pKa dos compostos estudados (pKa 6,0-6,5) e a gama de pH suportada pelo sorbente é vasta (pH 1-14), testou-se se o efeito da acidificação da amostra em pH=3 conferia alguma melhora na extração e obtenção de melhores valores em termos de área.

A **Figura 23** trata-se das áreas dos picos em testes realizados em triplicata, utilizando-se 5 ciclos de aspiração/dispersão da amostra na etapa de extração e também se 5 ciclos de aspiração/dispersão na eluição que foi realizada com 100μL da própria fase móvel da separação cromatográfica (ACN:H_2O + ác. acético 0,1 % de 50:50 v/v), com a finalidade de visualizar o efeito da diluição da amostra com água acidificada, observa-se que houve apenas uma diferença sútil, porém, menores áreas foram obtidas com a acidificação.

Visto que que a fase extratora Oasis HLB trata-se uma fase polimérica funcionalizada o que difere no seu mecanismo de extração (*hydrophilic-lipophilic-balanced*−HLB) de uma fase comum a base de sílica, pois possui agrupamentos lipofílicos e hidrofílicos, uma vez que, os fármacos determinados possuem agrupamentos ácidos, isso contribui diretamente para um maior poder de retenção.

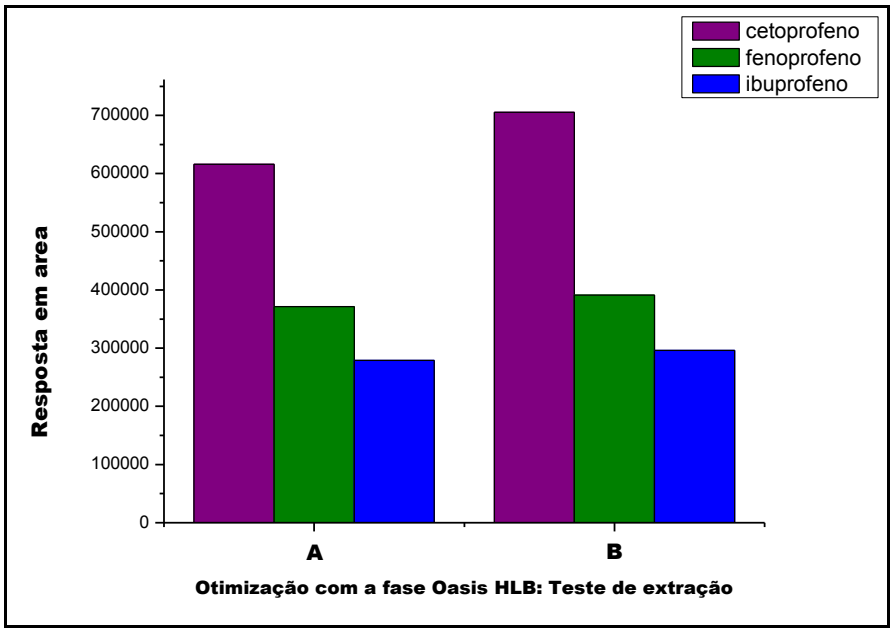


Figura 23 Extração com MEPS microcoluna com a fase extratora Oasis HLB. Teste de extração: (**A**) com acidificação e (**B**) sem acidificação da amostra.

Assim, optou-se pela não acidificação da amostra, conseguinte iniciou-se outros testes para analisar as demais variáveis que influenciam na otimização com o MEPS com o sorbente Oasis HLB como: o número de ciclos de aspiração/dispersão a ser utilizados na etapa de extração (**Figura 25**), solvente de lavagem (**Figura 26**), ciclos de aspiração/dispersão na etapa de lavagem (**Figura 27**) e ciclos de aspiração/dispersão na eluição, bem como, solvente de eluição (**Figura 28**).

Nestes testes, aumentou-se o volume de eluição de 100 µL para 200 µL (**Figura 24**) o que proporcionou maiores respostas em termos de área, ou seja, 100 µL não eram suficientes para total dessorção dos analitos de interesse, portanto 200 µL foi selecionado como o volume de solvente de eluição para os demais testes.

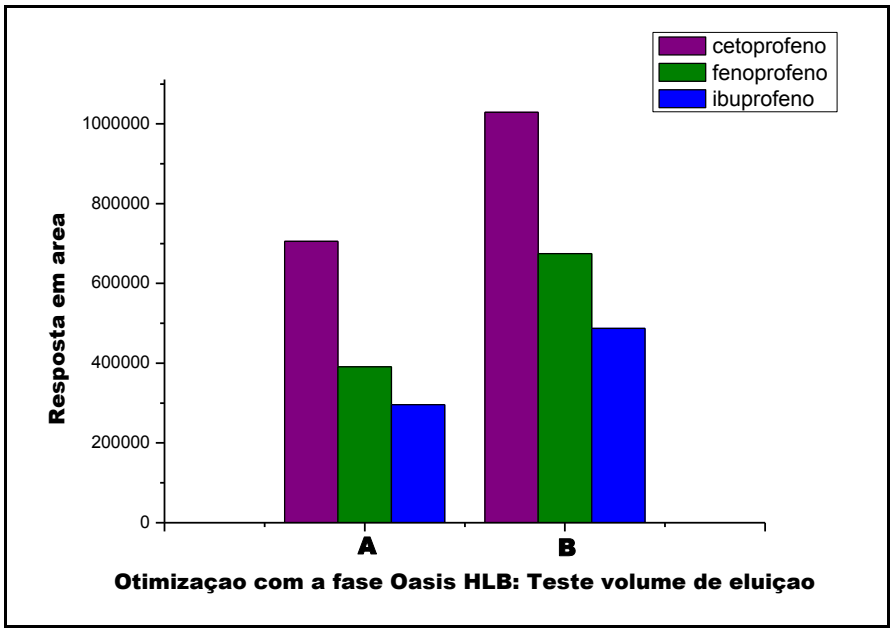


Figura 24 Extração com MEPS microcoluna com a fase extratora Oasis HLB. Teste com o volume de solvente de eluição: (**A**) 100 µL e (**B**) 200 µL com o eluente ACN:H_2O + ác. Acético 0,1 % na proporção de 50:50 v/v.

No teste do número de ciclos durante a etapa de extração (**Figura 25**), notou-se uma diminuição da resposta em área para o cetoprofeno utilizando-se 10 ciclos de aspiração/dispersão, ou seja, o aumento do número de ciclos implicou na dessorção dos analitos, deste modo, 7 ciclos aspiração/dispersão mostrou melhor resposta, sendo então selecionado.

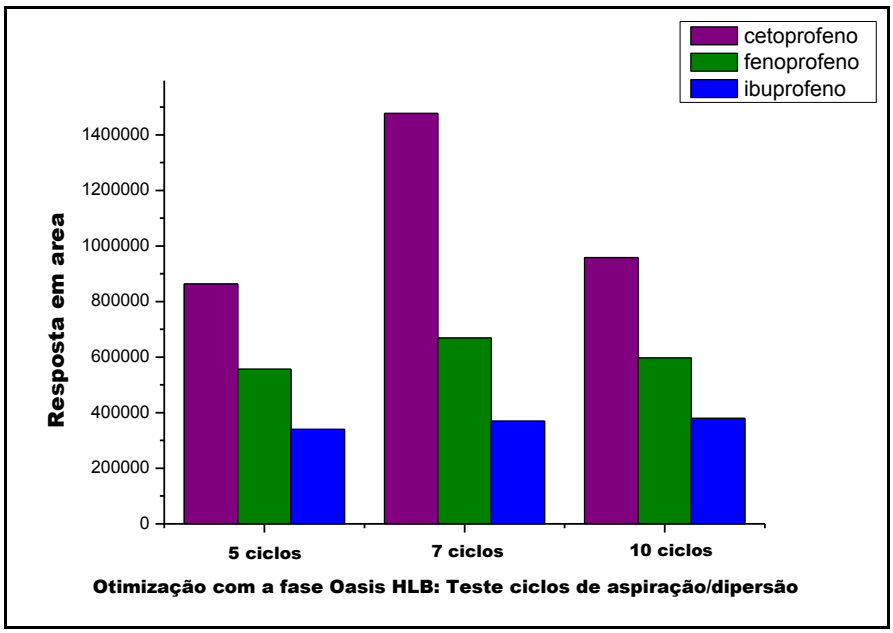


Figura 25 Extração com MEPS microcoluna com a fase extratora Oasis HLB. Teste ciclos aspiração/dispersão na etapa de extração com a amostra.

A escolha do solvente de lavagem baseou-se nas recomendações do manual da própria fase extratora Oasis HLB utilizada para SPE. Assim, foram testados com 3 ciclos de lavagem apenas com água deionizada (**Figura 26 A**) e com 3 ciclos a lavagem com de água: metanol 95:5 (v/v) (**Figura 26 B**). Entretanto, não foram realizados testes com o aumento na proporção de metanol, visto que, quando há o aumento do volume de solvente orgânico na etapa de lavagem implica na perda do analito, consequentemente, obtém-se menor resposta em termos de área, portanto a utilização de menor proporção de solvente orgânico nessa etapa é mais apropriada, sendo assim, foi selecionada a lavagem com apenas 5% de metanol, pois a mesma apresentou uma melhora na resposta em termos de área comparando-se com a lavagem apenas com água.

Conseguinte, realizou-se testes com o número de ciclos de lavagem (**Figura 27**) observou-se uma pequena perda de resposta em área utilizando com 5 ciclos, sendo então selecionados 3 ciclos demostrando-se mais adequado.

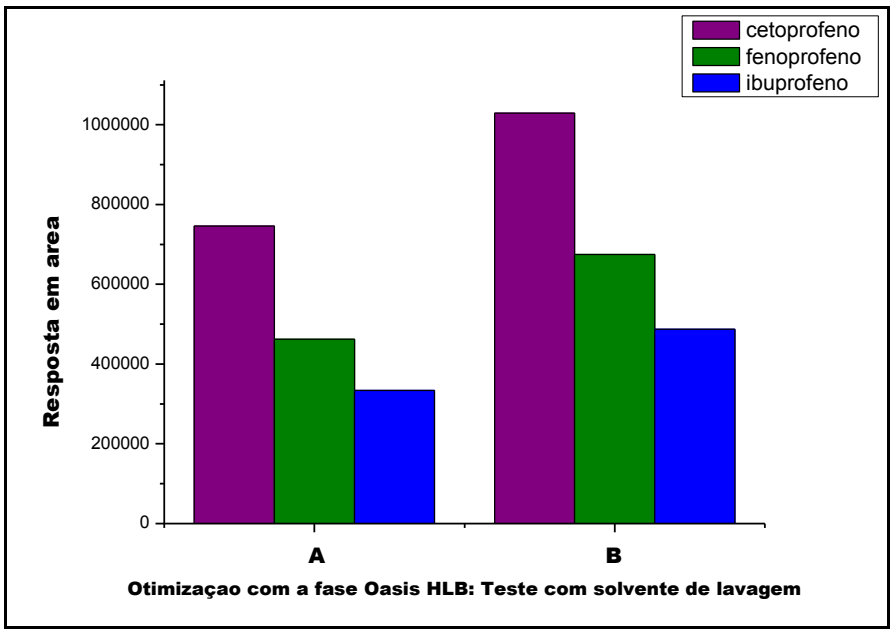


Figura 26 Extração com MEPS microcoluna com a fase extratora Oasis HLB. Teste de solvente de lavagem: (**A**) água e (**B**) água: metanol 95:5 (v/v)

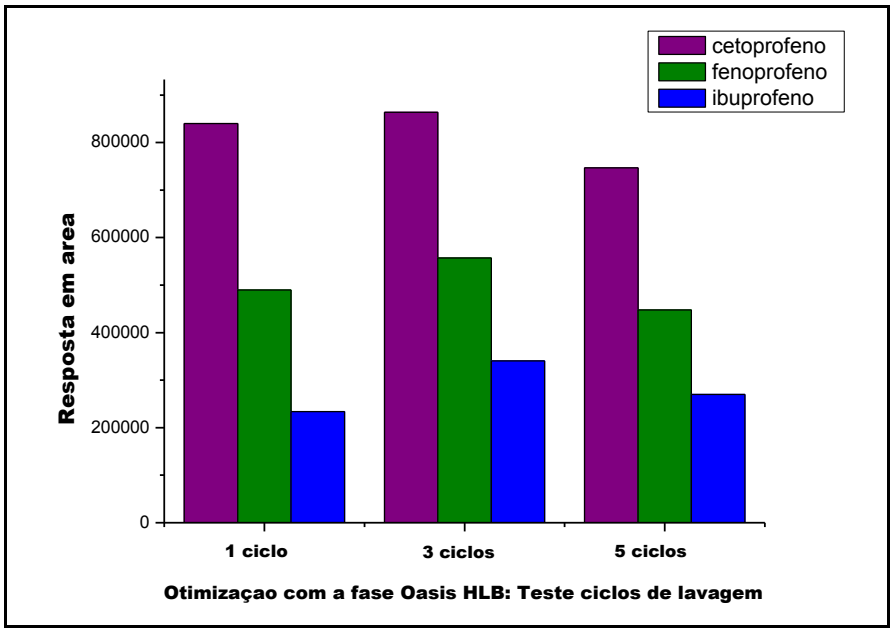


Figura 27 Extração com MEPS microcoluna com a fase extratora Oasis HLB. Teste de ciclos de aspiração/dispersão na etapa de lavagem.

Nos testes anteriores utilizou-se como solvente de eluição 200 µL da própria fase móvel ACN:H_2O + ác. Acético 0,1 % na proporção de 50:50 v/v (**Figura 28 A**) utilizada no processo de separação cromatográfica, porém, testou-se o número de ciclos de aspiração/dispersão na etapa de eluição, e também, realizou-se a troca do solvente de eluição para acetonitrila 100% (**Figura 28 B**) obtendo-se uma melhoria discrepante com a mudança do solvente, sendo que não houve diferença perceptível entre a variação do número de ciclos de eluição, deste modo foi selecionado 7 ciclos de aspiração/dispersão na etapa de eluição.

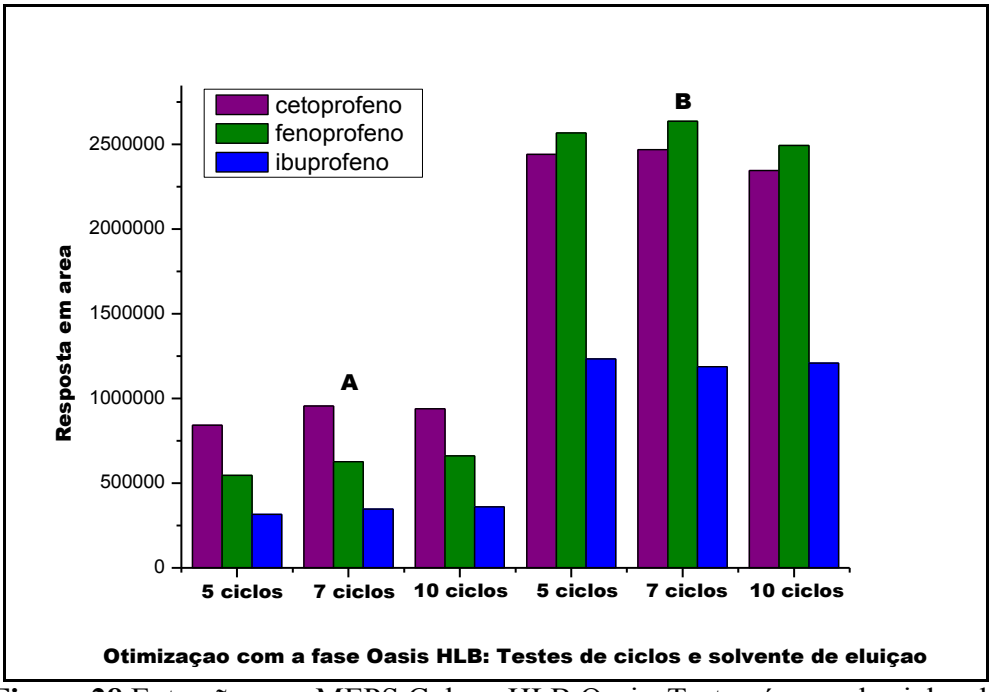


Figura 28 Extração com MEPS Coluna HLB Oasis. Teste número de ciclos de aspiração/dispersão na etapa de eluição e solvente de eluição.
(**A**) Solvente de eluição: ACN:H_2O + ác. Acético 0,1 % na proporção de 50:50 com 5 ciclos; 7 ciclos 10 ciclos, e (**B**) Solvente de eluição: ACN 100% com 5 ciclos; 7 ciclos e 10 ciclos.

Por fim, a **Figura 29** trata-se do cromatograma da extração dos três fármacos fortificados em urina humana com o dispositivo MEPS nas melhores condições obtidas com a fase extatora Oasis HLB.

Diante disso, os parâmetros selecionados como melhores condições da otimização da MEPS com a fase Oasis HLB que utilizou-se na etapa da validação são:

- Condicionamento:3×100 µL de MeOH e 3×100 µL de H_2O
- Extração: 7×Amostra (100µL de H_2O, 100 µL urina e 10 µL do mix padrões na concentração de 100 µg mL^{-1});
- Lavagem: 3×100 µL de H_2O: MeOH 95:5 v/v
- Eluição: 7×200 µL de ACN 100%;
- Limpeza: 5× 100 µL ACN e 5×100 µL de MeOH.

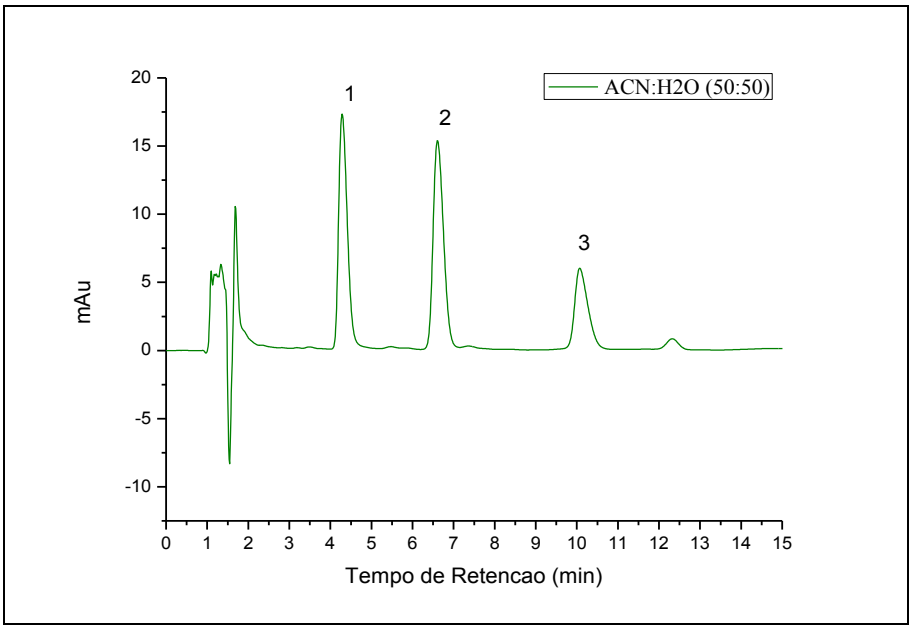


Figura 29 Cromatograma Otimização da MEPS com coluna HLB Oasis na matriz urina. Fase móvel: ACN:H2O + ác. Acético 0,1 % na proporção de 50:50. Ordem de eluição: cetoprofeno (**1**), fenoprofeno (**2**) e ibuprofeno (**3**). Concentração: 5 µg mL^{-1}. Condições cromatográficas: comprimento de onda monitorado= 220 nm; coluna Zorbax Eclipse C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 µm); temperatura do forno= 35ºC; volume de injeção= 50 µL e fluxo da fase móvel=1 mL min^{-1}.

4.3 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Após a otimização de alguns parâmetros envolvidos nas quatro etapas (condicionamento, extração, lavagem e eluição) do procedimento de extração por MEPS utilizando a fase Oasis HLB seguida pela análise cromatográfica por HPLC-DAD, o método foi validado seguindo as recomendações RDC nº 166 da ANVISA [76] avaliando-se os seguintes parâmetros analíticos: seletividade; linearidade; precisão e exatidão intra e inter-dias; recuperação; limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ).

4.3.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada através das extrações com as amostras do branco de urina humana sem a fortificação com os fármacos, verificando a ausência de interferentes com intensidades significativas no tempo de retenção do analito. O cromatograma representado pela **Figura 30** representa a extração do branco de urina e a **Figura 31** de uma extração contendo o analito demostrando que não há interferência do sinal da matriz no tempo de retenção dos analitos, sendo assim, possível a detecção e quantificação.

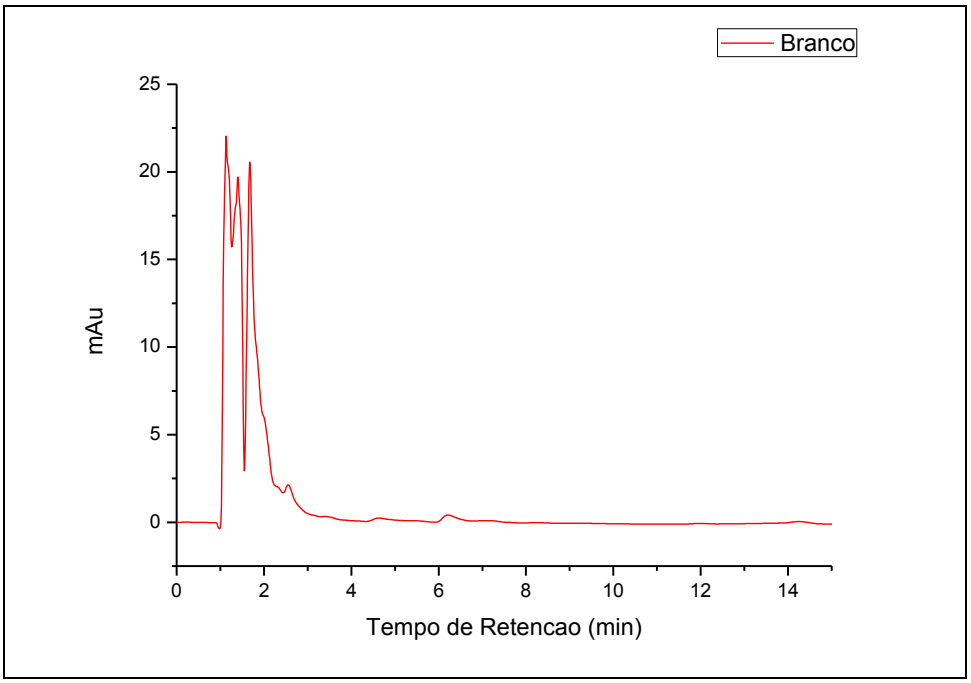


Figura 30 Cromatograma do branco de urina não fortificado. Comprimento de onda monitorado 220 nm.

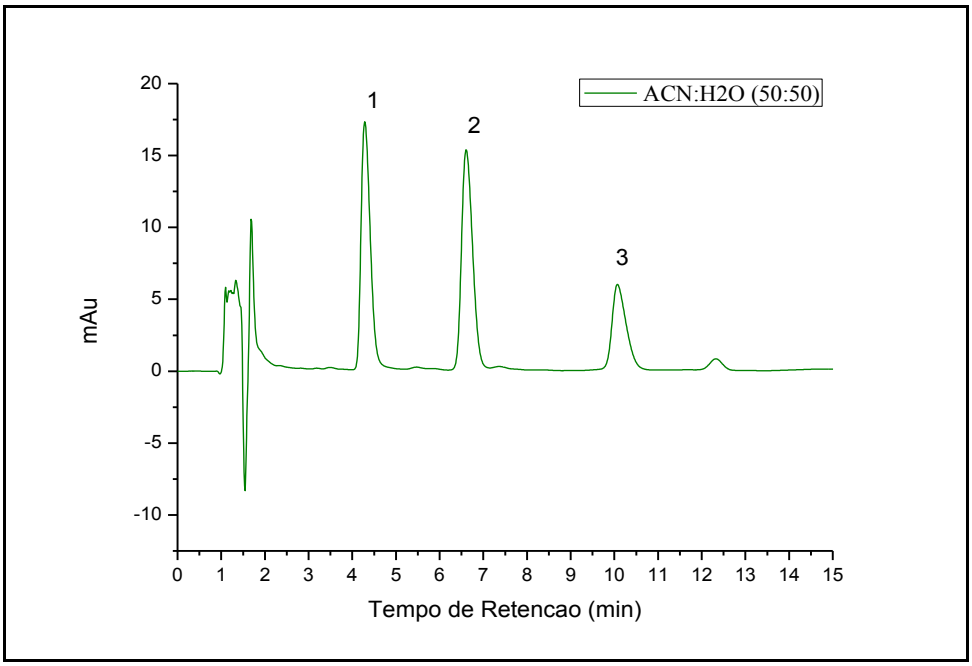


Figura 31 Cromatograma Otimização da MEPS com coluna Oasis HLB na matriz urina fortificada.

Fase móvel: ACN:H2O + ác. Acético 0,1 % na proporção de 50:50. Ordem de eluição: cetoprofeno (**1**), fenoprofeno (**2**) e ibuprofeno (**3**). concentração: 5 µg mL^{-1}. Condições cromatográficas: comprimento de onda monitorado= 220 nm; coluna Zorbax Eclipse C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 µm); temperatura do forno= 35ºC; volume de injeção= 50 µL e fluxo da fase móvel=1 mL min^{-1}.

4.3.2 Linearidade, LOD e LOQ

A linearidade foi avaliada através da curva analítica construídas em amostras de urina fortificada com os fármacos em seis níveis de concentração distintas 3,0; 4,5; 6,0; 7,5; 9,0 e 10,5 μg mL^{-1}, sendo cada nível realizado ensaios em triplicata. A **Tabela 4** apresentam os dados das curvas analíticas de cada fármaco, bem como, os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) calculados com os dados das curvas, as equações da regressão linear e coeficientes de correlação (r) para cada fármaco.

Tabela 4 Parâmetros da curva analítica para os NSAIDs.

Fármaco	Faixa Linear (μg mL^{-1})	Dados da equação (a,b)	Coeficiente correlação (r)	LOD (μg mL^{-1})	LOQ (μg mL^{-1})
Cetoprofeno	3,0−10,5	53688 48723	0,9745	0,88	2,67
Fenoprofeno	3,0−10,5	61635 21617	0,9892	1,23	3,00
Ibuprofeno	3,0−10,5	28988 -20730	0,9889	0,89	2,70

a−coeficiente angular; b−coeficiente linear; LOD=limite de quantificação; LOQ= limite de quantificação.

Para métodos bionalíticos recomenda-se um coeficiente de correlação (r) superior a 0,990, porém os três fármacos analisados não atenderam esse critério, sendo necessário a realização de tratamento estatístico para avaliar a homocedasticidade dos dados. Além dos coeficientes de correlação, uma ferramenta complementar para avaliar a homocedasticidade da curva analítica é a construção do gráfico de resíduos que avalia a dispersão dos dados no modelo matemático aplicado, aferindo se os resíduos possuem tendência significava para se realizar ajustes no modelo. Desta maneira, os gráficos de resíduos (**ANEXO I**) de cada fármaco demostraram ausência de tendência, isto é, que não houve indicio de falta de ajuste para o modelo proposto.

Outra ferramenta complementar para verificar a homocedasticidade da regressão linear é o teste de Fisher (Teste F). Dessa maneira, são utilizados os dados obtidos da curva analítica com a finalidade de comparar a média dos resultados com um valor de referência e exprimir o nível de confiança associado. O F calculado é obtido pela razão da maior variância sobre a menor variância obtida, quando o F calculado é maior que o F tabelado, as variâncias não podem ser consideradas iguais, ou seja, a matriz de dados tem um efeito significativo sobre a precisão do método na faixa de concentração em estudo, há heterocedasticidade dos dados.

Porém, se o valor de Fisher calculado for menor que o valor de Fisher tabelado, há homocedasticidade dos dados. Para os casos heterocedásticos, é necessária a aplicação de uma ponderação para ajuste dos parâmetros de regressão da curva analítica. Foram aplicadas as respectivas ponderações: $1/x$; $1/x^2$; $1/x^{1/2}$; $1/y$;$1/y^2$ e $1/y^{1/2}$ e escolheram-se as que se demostraram significativa melhora nos valores de r para a curva analítica de cada um dos fármacos [77].

A regressão linear para o **cetoprofeno** forneceu a equação y = 53688x + 48723 com coeficiente de correlação (r) igual a 0,9745 e coeficiente de determinação (r^2) igual a 0,9497. O valor de Fisher calculado obteve o valor de 59,0 e o valor de Fisher tabelado obteve o valor de 19,0 ($F_{95\%;2;2}$). Com isso, foi observado que os dados são heterocedásticos e aplicou-se uma ponderação de 1/y obtendo uma nova equação igual a y = 56127x + 29576, um coeficiente de correlação (r) igual a 0,9779, isto é, o valor de r não foi equivalente ao recomendado de 0,990 para o cetoprofeno, porém a ponderação implicou em uma melhora significativa.

Adicionalmente foi realizada a análise de variância (ANOVA) (**Tabela 5**) para verificar se há falta de ajuste para a equação y = 56127x + 29576. A regressão apresentou uma significância estatística com r^2 igual a 0,9518, ou seja, 95,18% da variância é explicada pela curva analítica do cetoprofeno. Foi realizado o Teste F para a falta de ajuste do modelo, no qual o valor de F calculado (F_{calc} = 315,65) para a regressão foi 70,23 vezes maior que o valor tabelado (F_{tab} = 4,49; $F_{95\%;1;16}$) demonstrando sua significância estatística. Observa-se também, que o valor de F calculado para a falta de ajuste do modelo (F_{calc} = 2,04) foi menor que o valor de F tabelado (F_{tab} =3,26; $F_{95\%;4;12}$) demonstrando que a falta de ajuste não é significativa e está embutida/dispersa no erro da análise.

Tabela 5 Dados da análise de variância (ANOVA) para o cetoprofeno.

ANOVA-cetoprofeno						
	SQ	**G.L**	**Média quadrática**	**Teste F**	**F_{tab}**	**F_{calc}/F_{tab}**
Regressão	$3{,}72\times10^{11}$	1	$3{,}72\times10^{11}$	315,65	4,49	70,24
Resíduo	$1{,}89\times10^{10}$	16	$1{,}18\times10^{09}$			
Falta de ajuste	$7{,}64\times10^{09}$	4	$1{,}91\times10^{09}$	2,04	3,26	0,626
Erro puro	$1{,}12\times10^{10}$	12	$9{,}36\times10^{08}$			
Total	$3{,}91\times10^{11}$		$2{,}79\times10^{10}$			

SQ-soma quadrática; G.L-graus de liberdade; F_{tab}- F tabelado e F_{calc}-F calculado.

A regressão linear para o **fenoprofeno** forneceu equação y = 61635x + 21617 com coeficiente de correlação (r) igual a 0,9892 e coeficiente de determinação (r^2) igual a 0,9786. O valor de Fisher calculado obtido foi de 19,0, igual aovalor de Fisher tabelado tabelado 19,0 ($F_{95\%;2;2}$). Com isso, foi observado que os dados são heterocedásticos e aplicou-se uma ponderação de $1/x^2$ que se mostrou mais significativa, obtendo-se uma nova equação igual a y = 62113x + 18470, um coeficiente de correlação (r) igual a 0,9934, ou seja, acima do valor recomendado de 0,990 para o fenoprofeno.

Adicionalmente foi realizada ANOVA (**Tabela 6**) para verificar se há falta de ajuste para a equação y = 62113x + 18470. A regressão apresentou uma significância estatística com r^2 igual a 0,9788, ou seja, 97,88% da variância é explicada pela curva analítica do fenoprofeno. Foi realizado o Teste F para a falta de ajuste do modelo, no qual o valor de F calculado (F_{calc} = 739,94) para a regressão foi 164,65 vezes maior que o valor tabelado (F_{tab} = 4,49; $F_{95\%;1;16}$) demonstrando sua significância estatística. Observa-se também, que o valor de F calculado para a falta de ajuste do modelo (F_{calc} = 1,63) foi menor que o valor de F tabelado (F_{tab} =3,26; $F_{95\%;4;12}$) demonstrando que a falta de ajuste não é significativa e está embutida/dispersa no erro da análise.

Tabela 6 Dados da análise de variância (ANOVA) para o fenoprofeno.

ANOVA-fenoprofeno						
	SQ	**G.L**	**Média quadrática**	**Teste F**	**F_{tab}**	**F_{calc}/F_{tab}**
Regressão	$4{,}56\times10^{11}$	1	$4{,}56\times10^{11}$	739,94	4,49	164,65
Resíduo	$9{,}85\times10^{09}$	16	$6{,}16\times10^{08}$			
Falta de ajuste	$3{,}48\times10^{09}$	4	$8{,}69\times10^{08}$	1,63	3,26	0,501
Erro puro	$6{,}38\times10^{09}$	12	$5{,}32\times10^{08}$			
Total	$4{,}66\times10^{11}$		$3{,}33\times10^{10}$			

SQ-soma quadrática; G.L-graus de liberdade; F_{tab}- F tabelado e F_{calc}-F calculado.

A regressão linear para o **ibuprofeno** forneceu equação y = 28988x−20730 com coeficiente de correlação (r) igual a 0,9889 e coeficiente de determinação (r^2) igual a 0,9779. O valor de Fisher calculado obteve o valor de 25,0 e o valor de Fisher tabelado obteve valor de tabelado 19,0 ($F_{95\%;2;2}$). Com isso, foi observado que os dados são heterocedásticos e aplicou-se uma ponderação de $1/y^{1/2}$ obtendo-se uma nova equação igual a y = 29502x−24691, um coeficiente de correlação (r) igual a 0,9910, ou seja, acima do valor recomendado de 0,99 para o ibuprofeno.

Realizou-se a ANOVA (**Tabela 7**) para verificar se há falta de ajuste para a equação y = 29502x−24691. A regressão apresentou uma significância estatística com r^2 igual a 0,9784, ou seja, 97,84% da variância é explicada pela curva analítica do ibuprofeno. Foi realizado o Teste F para a falta de ajuste do modelo, no qual o valor de F calculado (F_{calc} = 724,80) para a regressão foi 161,28 vezes maior que o valor tabelado (F_{tab} = 4,49; $F_{95\%;1;16}$) demonstrando sua significância estatística. Observa-se também, que o valor de F calculado para a falta de ajuste do modelo (F_{calc} = 3,21) foi menor que o valor de F tabelado (F_{tab} =3,26; $F_{95\%;4;12}$) comprovando que a falta de ajuste não é significativa e está embutida/dispersa no erro da análise.

Tabela 7 Dados da análise de variância (ANOVA) para o ibuprofeno.

ANOVA-ibuprofeno						
	SQ	**G.L**	**Média quadrática**	**Teste F**	**F_{tab}**	**F_{calc}/F_{tab}**
Regressão	$1{,}03\times10^{11}$	1	$1{,}03\times10^{11}$	724,80	4,49	164,28
Resíduo	$2{,}27\times10^{09}$	16	$1{,}42\times10^{08}$			
Falta de ajuste	$1{,}17\times10^{09}$	4	$2{,}93\times10^{08}$	3,21	3,26	0,985
Erro puro	$1{,}10\times10^{09}$	12	$9{,}13\times10^{07}$			
Total	$1{,}05\times10^{11}$		$7{,}51\times10^{09}$			

SQ-soma quadrática; G.L-graus de liberdade; F_{tab}- F tabelado e F_{calc}-F calculado.

Diante disso, a **Tabela 8** resume os dados obtidos da curva analítica para cada fármaco após a aplicação das ponderações supracitadas, sendo apenas o cetoprofeno mesmo com as ponderações não obteve de coeficiente de correlação (r) inferior ao valor recomentado de 0,990 para fluídos biológicos. O **ANEXO I** contém todas as curvas analíticas e gráficos de resíduos com e sem a aplicação do tratamento estatístico.

Tabela 8 Dados da curva analítica para os NSAIDs após as ponderações.

Fármaco	**Ponderação**	**Faixa Linear ($\mu g\ mL^{-1}$)**	**Dados da equação (a,b)**	**Coeficiente correlação (r)**	**Coeficiente determinação (r^2)**
Cetoprofeno	1/y	3,0−10,5	56127 29576	0,9779	0,9562
Fenoprofeno	$1/x^2$	3,0−10,5	62113 18470	0,9934	0,9868
Ibuprofeno	$1/y^{1/2}$	3,0−10,5	29502 -24691	0,9910	0,9821

4.3.3 Precisão e exatidão

Os estudos de precisão intra-dia e inter-dia foram expressos em desvio padrão relativo (DPR, %), no qual os valores aceitáveis são abaixo de 20 % para o nível baixo e 15 % para os demais níveis (**Tabela 9**). Os valores de precisão intra e inter-dias variaram entre 0,10−14,04%, sendo o maior valor obtido 14,04% no primeiro no nível baixo para o cetoprofeno, porém dentro do limite estabelecido, e os menores valores de 0,10% no inter-dia no nível médio e alto para o ibuprofeno.

Tabela 9 Precisão para o método de análise NSAIDs em urina.

Fármacos	Níveis	Precisão intra-dia 1 (DPR%) (n=3)	Precisão intra-dia 2 (DPR%) (n=3)	Precisão inter-dia (DPR%) (n=6)
Cetoprofeno	Baixo	14,04	10,43	12,16
	Médio	4,47	13,43	9,31
	Alto	5,28	9,84	7,41
Fenoprofeno	Baixo	3,24	12,00	8,43
	Médio	1,00	10,30	6,68
	Alto	4,67	10,95	7,55
Ibuprofeno	Baixo	6.56	9,42	0,14
	Médio	1,96	14,87	0,10
	Alto	4,21	14,53	0,10

Baixo=3,0 μg mL^{-1} ; médio= 6,0 μg mL^{-1} e alto=10,5 μg mL^{-1}.

Os estudos de exatidão intra-dia e inter-dia foram expressos em percentagem de desvio na qual os valores aceitáveis também são entre ±20 % para o nível baixo e entre ±15 % para os demais níveis (**Tabela 10**). Após a aplicação das ponderações houve consequentemente mudanças nos valores das exatidões intra-dia e inter-dia, no qual foram obtidos valores entre -9,14−11,78, sendo o menor valor obtido -9,14 no primeiro dia no baixo nível para o cetoprofeno e o maior valor 11,78 no segundo dia para o ibuprofeno no nível baixo, demostrando-se que estão dentro dos valores aceitáveis.

Tabela 10 Exatidões para o método de análise NSAIDs em urina após as ponderações.

Fármacos	Níveis	Exatidão intra-dia 1 (DPR%) (n=3)	Exatidão intra-dia 2 (DPR%) (n=3)	Exatidão inter-dia (DPR%) (n=6)
Cetoprofeno	Baixo	-9,14	2,00	-3,57
	Médio	2,23	6,38	4,31
	Alto	-5,45	-1,74	-3,59
Fenoprofeno	Baixo	0,82	6,21	3,51
	Médio	-2,85	-1,01	-193
	Alto	-1,89	-3,73	-2,81
Ibuprofeno	Baixo	-5,20	11,78	3,29
	Médio	3,94	0,19	2,10
	Alto	-3,32	-6,63	-4,98

Baixo=3,0 μg mL^{-1} ; médio= 6,0 μg mL^{-1} e alto=10,5 μg mL^{-1}.

4.3.4 Recuperação

A recuperação absoluta foi obtida através da relação entre a concentração obtida experimentalmente dos níveis baixos, médio e alto com razão da resposta em área da urina branco fortificada antes da extração com relação as áreas de urina branco fortificada após o preparo de amostra. Os resultados obtidos variaram entre 97,6−126,2 % para recuperação absoluta.

Foi calculado a recuperação relativa através da relação entre as concentrações encontradas e as concentrações teóricas. Como resultado, os valores de recuperação relativa variaram entre 83,10 a 103,5 %. Os dados de recuperação estão apresentados na **Tabela 11**. Os resultados das recuperações possuem uma faixa entre 70−120%, alguns valores obtidos foram acima, porém isto não representa uma problemática uma vez que a curva analítica foi construída pela fortificação do branco de urina.

Tabela 11 Recuperação para o método de análise NSAIDs em urina.

Fármacos	Níveis	Recuperação absoluta (%)	Recuperação relativa (%)
Cetoprofeno	Baixo	109,1	83,10
	Médio	125,8	100,9
	Alto	121,8	95,44
Fenoprofeno	Baixo	98,3	99,90
	Médio	97,6	97,05
	Alto	110,9	98,38
Ibuprofeno	Baixo	104,8	91,93
	Médio	126,2	103,5
	Alto	121,1	97,09

Baixo=3,0 μg mL^{-1}, médio= 6,0 μg mL^{-1} e alto=10,5 μg mL^{-1}.

4.3.5 Comparação dos dados obtidos com a literatura

A **Tabela 12** encontra-se os dados de parâmetros analíticos, coeficiente de correlação (r), limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) referentes aos NSAIDs determinados no presente método em comparação com os dados da literatura, nos quais, empregou-se a MEPS como etapa de preparo de amostra. Ressalta-se que há somente três artigos relacionados com a determinação de NSAIDs em urina humana com o emprego da MEPS, sendo dois desses artigos [1,55] referentes aos mesmos colaborados, no qual empregou-se o mesmo método adicionalmente para determinar outra classe de fármaco as fluoroquinolonas, isto é, tratam-se do mesmo método. Destaca-se que o fármaco fenoprofeno ainda não havia sido determinado em nenhuma destas publicações utilizando-se a MEPS, apenas no presente método.

O presente método apresentou o coeficiente de correlação dentro do valor estabelecido de 0,99 apenas para dois fármacos ibuprofeno (0,9934) e o fenoprofeno (0,9910), apresentado valores de r ≥0,99 similarmente ao método [1,55] , porém com relação ao método [56] utilizou-se uma técnica de separação cromatográfica que possui uma maior sensibilidade, a cromatografia líquida de alto desempenho (UHPLC−*Ultra high performance liquid chromatography*), e consequentemente obtiveram-se melhores valores de r > 0,999, do mesmo modo, menores LOD e LOQ.

Os NSAIDs possuem uma ampla faixa de dosagem que varia de 150 a 3200 mg por dia. A faixa de trabalho da curva analítica foi 3,0−10,5 μg mL^{-1} que, aplicando o fator de diluição de 50 %, corresponde à quantificação dos fármacos na urina entre 6,0 a 21 μg mL^{-1}, ou seja, o método desenvolvido pela fortificação das amostras de urina pode ser aplicado para determinar esses fármacos uma vez que eles apresentam apresenta ampla faixa terapêutica, sendo então os LOD e LOQ obtidos aceitáveis, visto que não se objetiva aferir os analitos em níveis traços.

Outro ponto interessante acerca do dispositivo MEPS empregado, como já supracitado, difere-se do análogo comercial utilizado nos demais métodos. Embora o método seja manual, a grande vantagem do dispositivo utilizado foi a possibilidade da escolha do material sorbente, devido a microcoluna e a microsseringa serem totalmente desmontáveis possibilitando a troca da fase extratora e *frits*.

Desta maneira, foi possível utilizar pequena quantidade da fase Oasis HLB (1−2 mg) retirada de um cartucho comercial de SPE, sendo possível a sua utilização durante todas as extrações no procedimento de otimização e validação analítica. Ressalta-se que até o presente

momento não foram encontrados trabalhos publicados que tenham utilizado o sorbente Oasis HLB em extração com a MEPS. Dessa forma, o emprego da fase polimérica funcionalizada (Oasis HLB), no qual possui um mecanismo duplo de extração permite a maior poder de extração para os fármacos estudados. Esse fator é importante devido a pequena quantidade de fase extratora utilizada no método desenvolvido.

Tabela 12 Comparação dos dados obtidos com os da literatura.

Fármaco	Amostra	Fase extratora	Método de separação	LOD	LOQ	r	Ano	Ref.
cetoprofeno	Plasma e	Strata-X	HPLC-PDA	0,03 μg mL^{-1}	0,1 μg mL^{-1}	≥0,9947	2016	[55]
ibuprofeno	urina		4,6 mm × 250 mm	0,03 μg mL^{-1}	0,1 μg mL^{-1}	≥0,9947		
			C18					
cetoprofeno	Plasma e	Strata-X	HPLC-PDA	0,03 μg mL^{-1}	0,1 μg mL^{-1}	≥0,9947	2014	[1]
ibuprofeno	urina		4,6 mm × 250 mm	0,03 μg mL^{-1}	0,1 μg mL^{-1}	≥0,9947		
			C18					
cetoprofeno	Urina	C18	UHPLC	0,0143 μg mL^{-1}	0,0428 μg mL^{-1}	0,9991	2013	[56]
ibuprofeno			100 mm ×3 mm	0,0034 μg mL^{-1}	0,0101 μg mL^{-1}	0,9995		
			C18					
cetoprofeno	Urina	Oasis HLB	HPLC-DAD	0,88 μg mL^{-1}	2,67 μg mL^{-1}	0,9779		
ibuprofeno			150 mm × 4,6 mm;	1,23 μg mL^{-1}	3,00 μg mL^{-1}	0,9934	Presente método	
fenoprofeno			5μm C18	0,89 μg mL^{-1}	2,70 μg mL^{-1}	0,9910		

LOD=limite de quantificação; LOQ= limite de quantificação e r =coeficiente de correlação.

5 CONCLUSÃO

Conclui-se que a fase móvel selecionada para separação cromatográfica foi efetiva pois atendeu aos valores mínimos estabelecidos para os diversos parâmetros avaliados, sendo possível a sua utilização na etapa de otimização com o MEPS e de validação analítica.

A técnica de preparo com o dispositivo MEPS modificado demostrou-se eficaz na otimização do procedimento de extração em suas nas quatro etapas (condicionamento, extração, *clean up* e eluição) com a fase extratora Oasis HLB demostrou-se promissor e assim obteve-se boas respostas em termos de área do pico cromatográfico sendo possível a sua aplicação na etapa de validação do método analítico.

Na validação analítica, alcançou-se resultados satisfatórios em todos os parâmetros determinados como seletividade, linearidade, LOD, LOQ, bem como, precisão e exatidão, dentro dos valores estabelecidos. Após aplicação das ponderações estatísticas, os coeficientes de correlação (r) teve uma melhora bastante significativa sendo apenas para o cetoprofeno inadequado. Assim, o método proposto é apropriado para monitorização terapêutica do cetoprofeno, fenoprofeno e ibuprofeno, tendo como perspectiva aplicação em amostras reais de urina humana.

Portanto, a utilização do dispositivo MEPS empregando o sorbente Oasis HLB na determinação de NSAIDs mostrou-se promissora para monitorização terapêutica desses fármacos, sendo a determinação do fenoprofeno inédita no presente método.

6 PERPECTIVAS

O método proposto é apropriado para monitorização terapêutica do fenoprofeno e ibuprofeno, tendo como perspectiva aplicação em amostras reais de urina humana em pacientes que estejam em tratamento com esses medicamentos.

Além disso, almeja-se obter novos e melhores resultados com relação ao fármaco cetoprofeno, para isso a etapa de validação será repetida com novas soluções padrões e amostras para que esse fármaco possa ser determinado em conjunto as demais na determinação em amostras reais de urina humana, e também, para que possam ser avaliados outros parâmetros analíticos como efeito matriz e a robustez.

7 REFERÊNCIAS

1. LOCATELLI, M. et al. Microextraction by packed sorbent and high performance liquid chromatography determination of seven non-steroidal anti-inflammatory drugs in human plasma and urine. **Journal of Chromatography A**, v. 1367, p. 1-8, 2014.
2. KANG, J.-S.; LEE, M.-H. Overview of therapeutic drug monitoring. **The Korean journal of internal medicine**, v. 24, n. 1, p. 1-10, 2009.
3. OGA, S.; CAMARGO, M. M. D. A.; BATISTUZZO, J. A. D. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 4. ed. São Paulo-SP: Atheneu Editora, 2014.
4. CHEN, YI; GUO, ZHENPENG; WANG, XIAOYU; QIU, CHANGGUI. Sample preparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, n. 1-2, p. 191-219, 2008.
5. QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, Campinas-SP, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.
6. ABDEL-REHIM, M. Microextraction by packed sorbent (MEPS): a tutorial. **Analytica chimica acta**, Södertälje, v. 701, p. 119-128, 2011.
7. ADBEL-REHIM, M.; ALTUN, Z. Study of the factors affecting the performance of microextraction by packed sorbent (MEPS) using liquid scintillation counter and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 630, p. 116-123, 2008.
8. MICHELLIN, A. D. F. et al. oxicidade renal de inibidores seletivos da ciclooxigenase-2: celecoxib e rofecoxib. **Revista de Ciências Médicas**, v. 15, n. 4, 2012.
9. BARTLOUNI, M. Anti-inflamatórios não esteroides: efeitos cardiovasculares, cérebro-vasculares e renais. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo-SP,Brasil, v. 94, p. 556-63, 2010.
10. HOWARD, P. A.; DELAFONTAINE, P. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cardiovascular risk. **Journal of the American College of Cardiology**, Kansas, v. 43, n. 4, p. 519-525, 18 February 2004.
11. RANG, H. P. et al. **Rang & Dale:** farmacologia. 6. ed. Rio de Janeiro-RJ: Elsevier, 2008.
12. HITAL-DANDAN, R.; BRUTON, L. L. **Manual de famacologia e terapeutica de Goodman & Gilman**. 2. ed. Porto Alegre: AMGH, 2015.
13. MURI, E. M. F.; SPOSITO, M. M. D. M.; METSAVAHT, L. Antiinflamatórios não-

esteroidais e sua farmacologia local. **Acta fisiátrica**, v. 16, n. 4, p. 186-190, 2009.

14. FENILBUTAZONACAVAL. fenilbutazonacaval. **fenilbutazonacaval**, 2011. Disponivel em: <http://fenilbutazonacaval.wixsite.com/fenilbutazona/untitled-c22uk>. Acesso em: 2018 Maio 11.
15. JONES, R. Nonsteroidal anti-inflammatory drug prescribing: past, present, and future. **The American Journal of Medicine**, v. 110, n. 1, p. S4-S7, 2001.
16. SOSTRES, C. et al. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. **Best practice & research Clinical gastroenterology**, v. 24, n. 2, p. 121-132, 2010.
17. LI, L. et al. Regulation of bone biology by prostaglandin endoperoxide H synthases (PGHS): A rose by any other name…. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 17, n. 3, p. 203-216, 2006.
18. WHELTON, A. Renal aspects of treatment with conventional nonsteroidal anti-inflammatory drugs versus cyclooxygenase-2–specific inhibitors. **The American journal of medicine**, v. 110, n. 3, p. 33-42, 2001.
19. KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): aspectos atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 4, p. 498-512, 2002.
20. ANVISA. Famacopeia Brasileira. **ANVISA**, 2010. Disponivel em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume2.pdf>. Acesso em: 20 Setembro 2016.
21. DRUGBANK. DrugBank. **https:** //www.drugbank.ca/, 2018. Disponivel em: <https://www.drugbank.ca/>. Acesso em: 10 dez. 2018.
22. FARRAR, H.; LETZIG, L.; GILL, M. Validation of a liquid chromatographic method for the determination of ibuprofen in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 780, n. 2, p. 341-348, 2002.
23. LOUDIKI, A. et al. Ibuprofen analysis in blood samples by palladium particles-impregnated sodium montmorillonite electrodes: Validation using high performance liquid chromatography. **Materials Science and Engineering**, v. 69, p. 616-624, 2016.
24. MEDICANET. Medicina Net. **Medicina Net**, 2016. Disponivel em: <http://www.medicinanet.com.br/bula/8203/ibuprofeno_gotas.htm >. Acesso em: 17 Outubro 2016.

25. LOZANO , H. R.; MARTÍNEZ,. Funciones termodinámicas relativas a la transferencia del ketoprofén desde el agua hasta algunos sistemas orgánicos. **Química Nova**, Bogotá, v. 29, n. 4, p. 704-709, 2006.

26. MELO, E. K. S. D. et al. Análise e estudo viscosimétrico de diferentes géis de cetoprofeno 2, 5%. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 95-99, 2013.

27. WOLFE, M. M.; LICHTENSTEIN, D. R.; SINGH, G. Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. **New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 24, p. 1888-1889, 1999.

28. FIGUEIREDO, C.; BORGES, ; QUEIROZ, M. E. C. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, v. 1, 2015.

29. MOEIN, M. M.; BEQQALI, A. E.; ABDEL-REHIM, M. Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies. **Journal of Chromatography B**, v. 1043, p. 3-11, 2017.

30. YU, H.-Y. E. The prescription drug abuse epidemic. **Clinics in laboratory medicine**, v. 32, n. 3, p. 361-377, 2012.

31. SPENCER, A.; DUBINSKY, M. C. Therapeutic Drug Monitoring in Inflammatory Bowel Disease: History and Future Directions. **Pediatric clinics of North America**, v. 64, n. 6, p. 1309-1326, 2017.

32. SINITOX. Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas. **SINITOX**, 2015. Disponivel em: <https://sinitox.icict.fiocruz.br/sites/sinitox.icict.fiocruz.br/files//Brasil6.pdf>. Acesso em: 07 Agosto 2018.

33. BOCHNER, R.; DE SOUZA, M. F. A. Panorama das Intoxicações e Envenenamentos Registrados no Brasil pelo Sistema Nacional de Informações (Tóxico-Farmacológicas SINITOX). **Revista Racine**, p. 1-13, 2008.

34. DASGUPTA, A. **Therapeutic drug monitoring:** Newer drugs and biomarkers. 1. ed. [S.l.]: Elsevier, 2012.

35. FLEURY. Fleury Medicina e saude. **FLEURY**, 2018. Disponivel em: <http://www.fleury.com.br/medicos/educacao-medica/manuais/manual-de-neurodiagnosticos/pages/monitorizacao-terapeutica.aspx>. Acesso em: 2018 Agosto 01.

36. BROTO, M.; GALVE, R.; MARCO, M.-P. Bioanalytical methods for cytostatic

therapeutic drug monitoring and occupational exposure assessment. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 93, p. 152-170, 2017.

37. COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas-SP: Editora da Unicamp, 2006.
38. SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. São Paulo-SP: Pioneira Thomson Learning, 2006.
39. NOVÁKOVÁ, L.; VLčKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, n. 1-2, p. 8-35, 2009.
40. MOLINER-MARTINEZ, Y. et al. Recent advances of in-tube solid-phase microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 205-213, 2015.
41. AUFARTOVÁ, J. et al. Determination of steroid hormones in biological and environmental samples using green microextraction techniques: An overview. **Analytica Chimica Acta**, v. 704, n. 1-2, p. 33-46, 2011.
42. LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)/ Fernando M. Lanças**. 1. ed. São Carlos-SP: RIMA, 2004.
43. VIDAL, L.; RIEKKOLA, M.-L.; CANALS,. Ionic liquid-modified materials for solid-phase extraction and separation: A review. **Analytica Chimica Acta**, p. 19-41, 2012.
44. JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010.
45. CALDAS, S. et al. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011.
46. HERNÁNDEZ-BORGES, J. et al. Sample treatments prior to capillary electrophoresis–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, n. 1-2, p. 214-226, 15 June 2007.
47. ABDEL-REHIM, M. New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications: I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 801, n. 2, p. 317-331, 2004.
48. MAHDI MOEIN, M.; ABDEL-REHIM, A.; ABDEL-REHIM, M. Microextraction by

packed sorbent (MEPS). **Trends in Analytical Chemistry**, v. 67, p. 34-44, 2015.

49. QUEIROZ, M. E. C. Microextração em sorvente empacotado (MEPS) para a determinação de fármacos em fluidos biológicos. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 3, p. 223-229, 2011.
50. ABDEL-REHIM, M. Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2569-2580, 2010.
51. YANG, L.; SAID, R.; ABDEL-REHIM, M. Sorbent, device, matrix and application in microextraction by packed sorbent (MEPS): A review. **Journal of Chromatography B**, v. 1043, p. 33-43, 2017.
52. RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; DE ALDA, M. J. L.; BARCELÓ, D. Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography–mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, n. 1-2, p. 97-115, 2007.
53. VEGA-MORALES, T.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRÍGUEZ, J. J. Development and optimisation of an on-line solid phase extraction coupled to ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry methodology for the simultaneous determination of endocrine disrupting compounds in wastewater samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1230, p. 66-76, 2012.
54. FONTANALS, N. et al. Mixed-mode ion-exchange polymeric sorbents: dual-phase materials that improve selectivity and capacity. **TrAC Trends in Analytical Chemistry,** v. 29, n. 7, p. 765-779, 2010.
55. D'ANGELO, V. et al. Microextraction by packed sorbent and HPLC–PDA quantification of multiple anti-inflammatory drugs and fluoroquinolones in human plasma and urine. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 31, n. sup 3, p. 110-116, 2016.
56. MAGIERA, S. et al. Application of statistical experimental design to the optimisation of microextraction by packed sorbent for the analysis of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human urine by ultra-high pressure liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1304, p. 1-9, 23 August 2013.
57. RAMOS-PAYAN, M.; MASPOCH, S.; LLOBERA, A. An effective microfluidic based liquid-phase microextraction device (mLPME) for extraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from biological and environmental samples. **Analytica Chimica**

Acta, v. 946, p. 56-63, 2016.

58. LYU, D.-Y.; YANG, C.-X.; YAN, X.-P. Fabrication of aluminum terephthalate metal-organic framework incorporated polymer monolith for the microextraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs in water and urine samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1393, p. 1-7, 2015.
59. FAN, Y. et al. In-tube solid phase microextraction using a ß-cyclodextrin coated capillary coupled to high performance liquid chromatography for determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine samples. **Talanta**, v. 65, p. 111-117, 2005.
60. GARCÍA-VALVERDE, M. T. et al. Carbon coated titanium dioxide nanotubes: synthesis, characterization and potential application as sorbents in dispersive micro solid phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 13-43, p. 26-32, 2014.
61. GHORBANI, M.; CHAMSAZ, M.; ROUNADHI, G. H. Ultrasound-assisted magnetic dispersive solid-phase microextraction: A novel approach for the rapid and efficient microextraction of naproxen and ibuprofen employing experimental design with high-performance liquid chromatography. **Journal of separation science**, v. 39, n. 6, p. 1017-1212, 2016.
62. PAYÁN, et al. A comprehensive study of a new versatile microchip device based liquid phase microextraction for stopped-flow and double-flow conditions. **Journal of Chromatography A**, v. 1556, p. 29-36, 2018.
63. PANTUCKOVÁ, P.; KUBAN, P. In-line coupling of supported liquid membrane extraction to capillary electrophoresis for simultaneous analysis of basic and acidic drugs in urine. **Journal of Chromatography A**, v. 1519, p. 137-144, 2017.
64. ALMEIDA, C.; AHMAD, M.; NOGUEIRA, J. M. F. Bar adsorptive microextraction technique - application for the determination of pharmaceuticals in real matrices. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 8, p. 2093-2106, 2017.
65. GARCÍA-VÁZQUEZ , et al. Single-drop microextraction combined in-line with capillary electrophoresis for the determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in urine samples. **Electrophoresis**, v. 37, n. 2, p. 274-281, 2016.
66. MD SHUKR, S. et al. Liquid Chromatographic Determination of NSAIDs in Urine After Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Based on Solidification of Floating Organic Droplets. **Chromatographia**, v. 28, n. 15-16, p. 984-994, 2015.
67. MANZO, V.; MIRÓ, M.; RICHTER, P. Programmable flow-based dynamic sorptive

microextraction exploiting an octadecyl chemically modified rotating disk extraction system for the determination of acidic drugs in urine. **Journal of Chromatography A**, v. 1368, p. 64-69, 2014.

68. CRUZ-VERA, V. et al. One-step in-syringe ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 37, p. 6459-6465, 2009.
69. CRUZ-VERA, M. et al. Ionic liquid-based dynamic liquid-phase microextraction: Application to the determination of anti-inflammatory drugs in urine samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1202, n. 1, p. 1-7, 2008.
70. NOZAL, et al. In-line liquid-phase microextraction for selectiveenrichment and direct electrophoretic analysis of acidic drugs. **Electrophoresis**, v. 28, n. 18, p. 3284-3289, 2007.
71. RIAÑO, S. et al. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine by the combination of stir membrane liquid–liquid–liquid microextraction and liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 403, n. 9, p. 2583-2589, 2012.
72. HATAMI, M.; FARHADI, K. Analysis of ketoprofen enantiomers in human and rat plasma by hollow-fiber-based liquid-phase microextraction and chiral mobile-phase additive HPLC. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 91, n. 12, p. 1252-1257, 2013.
73. YU, Q.-W. et al. Automated analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in human plasma and water samples by in-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry based on a poly(4-vinylpyridine-co-ethylene dimethacrylate) monolith. **Analytical Methods**, v. 1538, n. 4, p. 1538-1545, 2012.
74. FARAJZADEH, M. A. et al. Determination of widely used non-steroidal anti-inflammatory drugs in biological fluids using simultaneous derivatization and air-assisted liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–flame ionization detection. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 13, n. 2, p. 289-298, 2016.
75. FARAJZADEH, M. A. et al. Determination of unconjugated non-steroidal anti-inflammatory drugs in biological fluids using air-assisted liquid–liquid microextraction combined with back extraction followed by high performance liquid chromatography. **Analytical Methods**, v. 7, n. 4, p. 1372-1379, 2015.
76. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **ANVISA**, 01 Agosto 2018. Disponivel em: <https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>. Acesso em: 01

Agosto 2018.

77. BARROS NETO, B. **Como fazer experimentos aplicações na ciência e na indústria**. Porto Alegre: Bookman, 2011.

ANEXO I

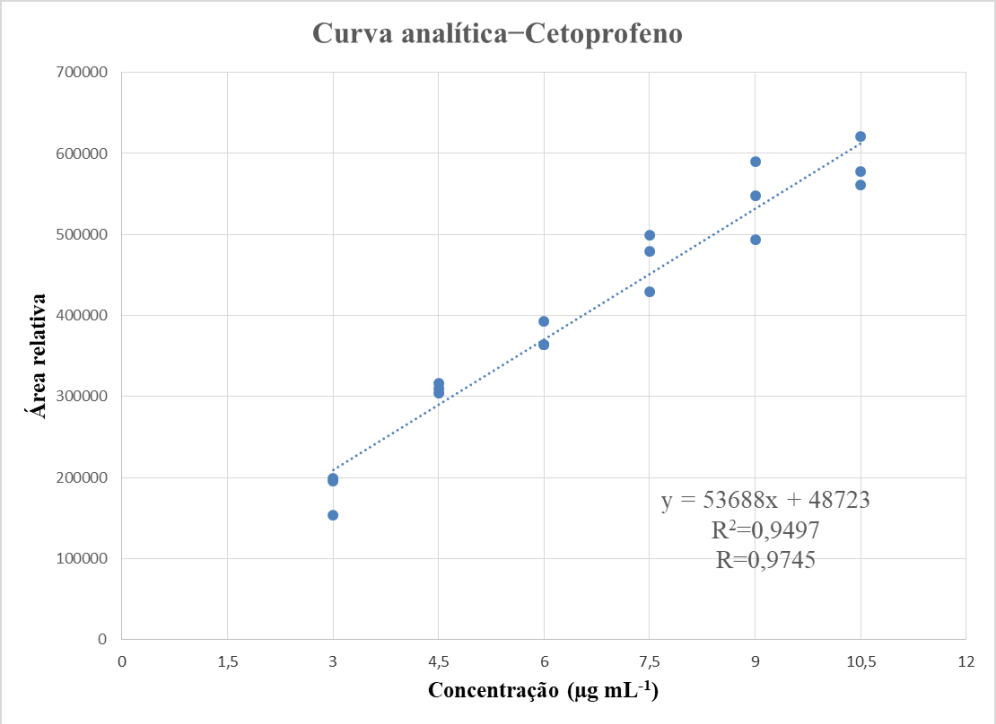


Figura 32 Curva analítica para o cetoprofeno.

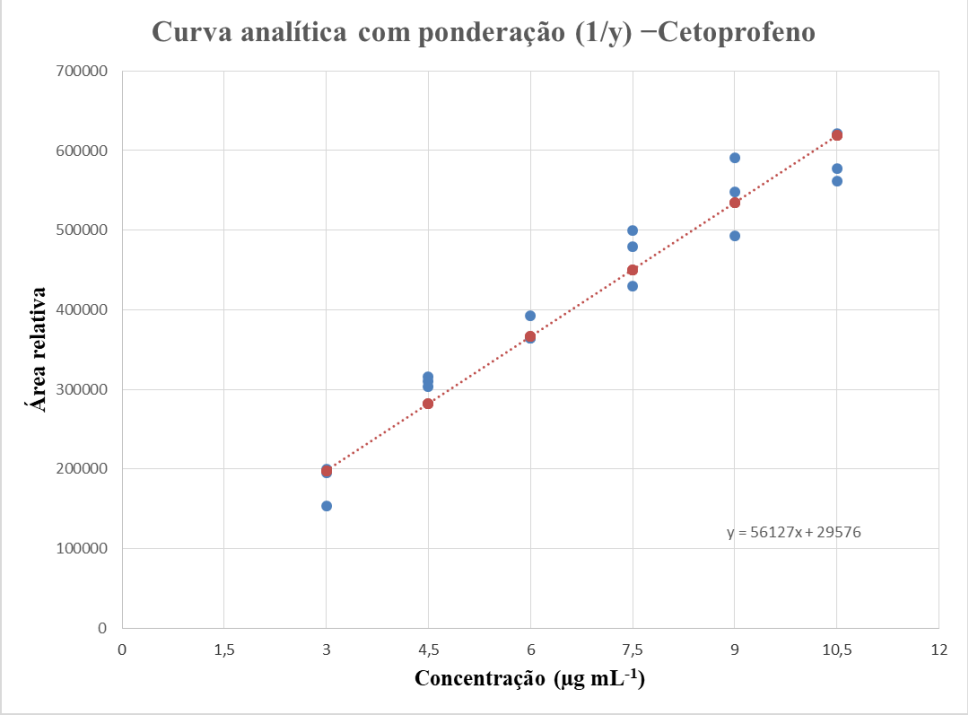


Figura 33 Curva analítica com ponderação (1/y) para o cetoprofeno.

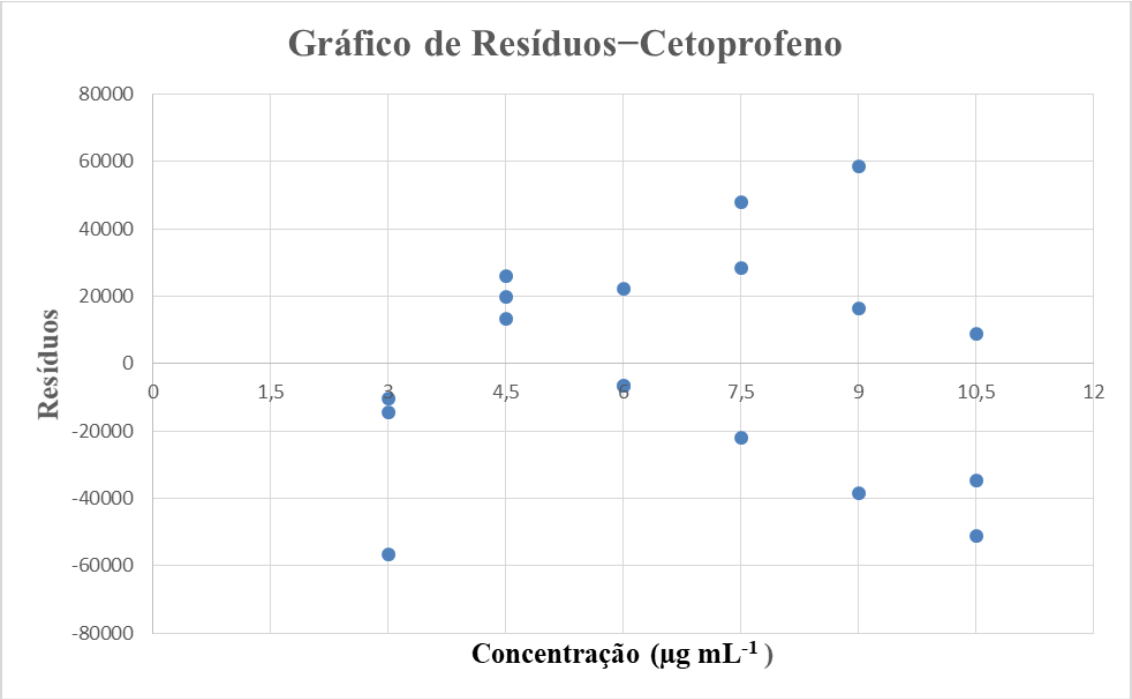


Figura 34 Gráfico de resíduos para o cetoprofeno.

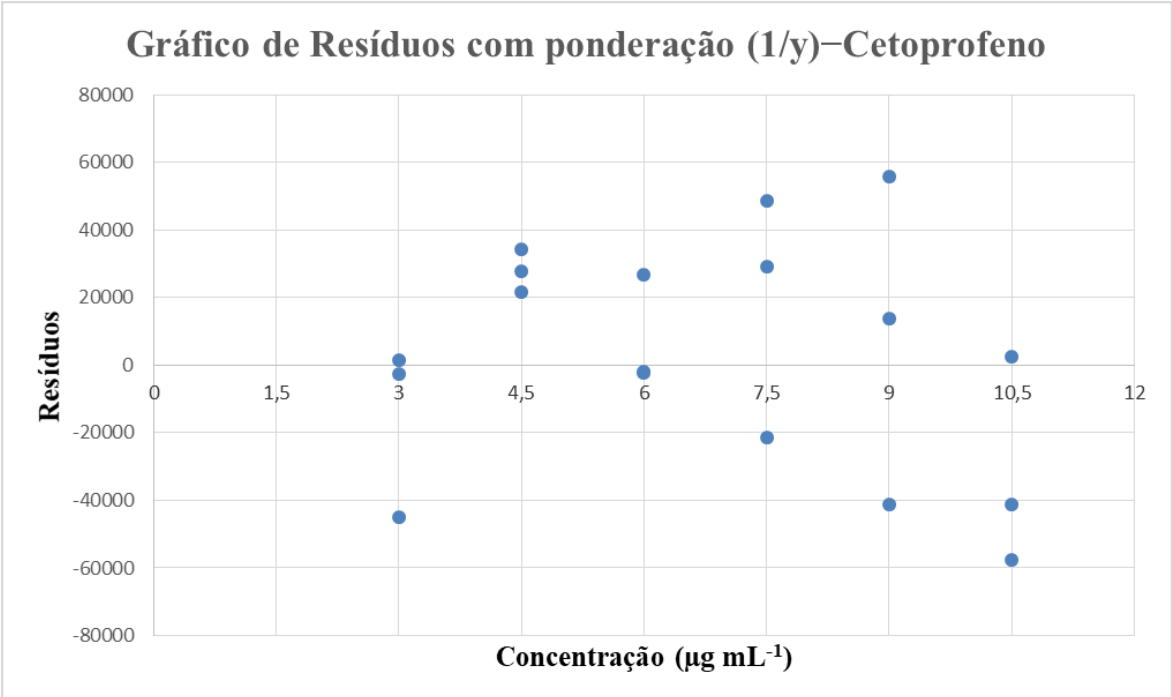


Figura 35 Gráfico de resíduos com ponderação (1/y) para o cetoprofeno.

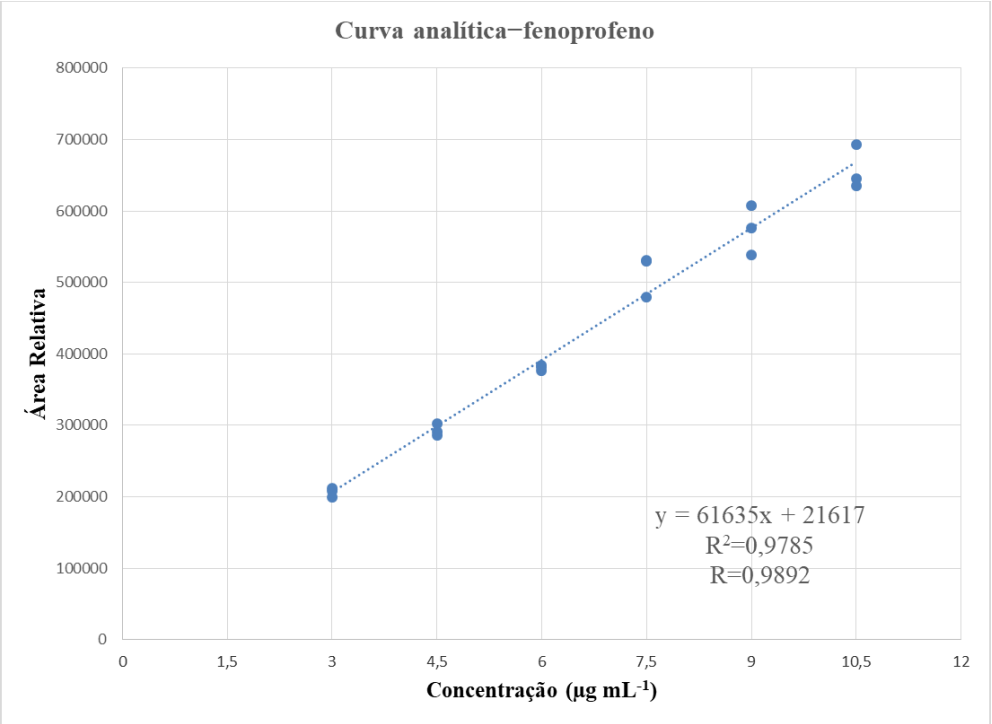


Figura 36 Curva analítica para o fenoprofeno.

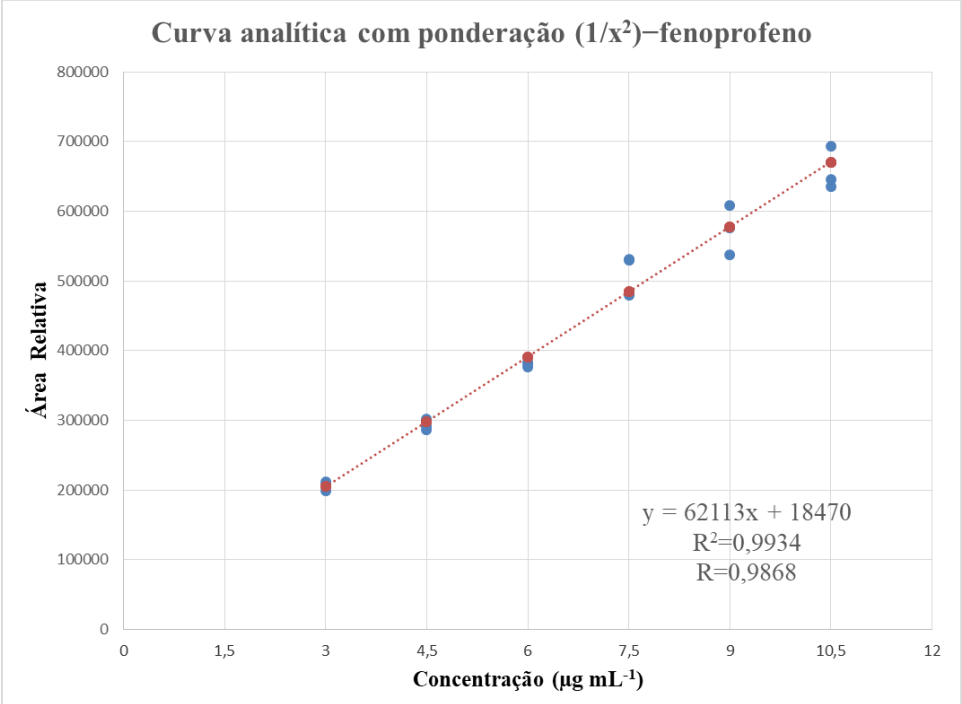


Figura 37 Curva analítica com ponderação ($1/x^2$) para o fenoprofeno.

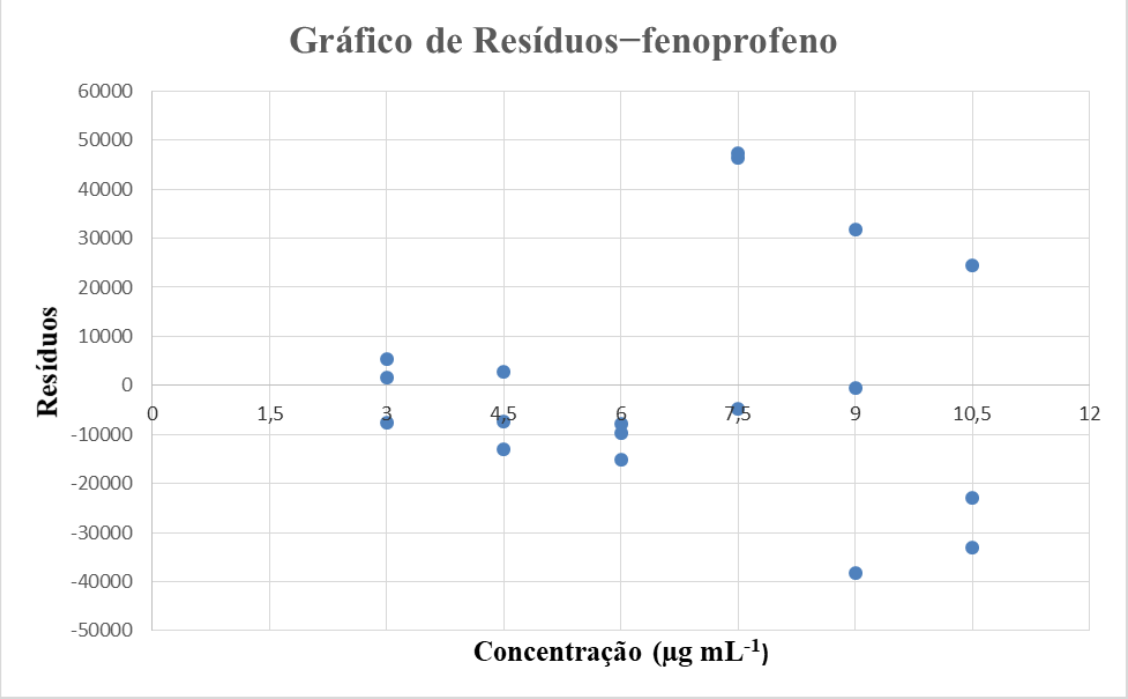


Figura 38 Gráfico de resíduos para o fenoprofeno.

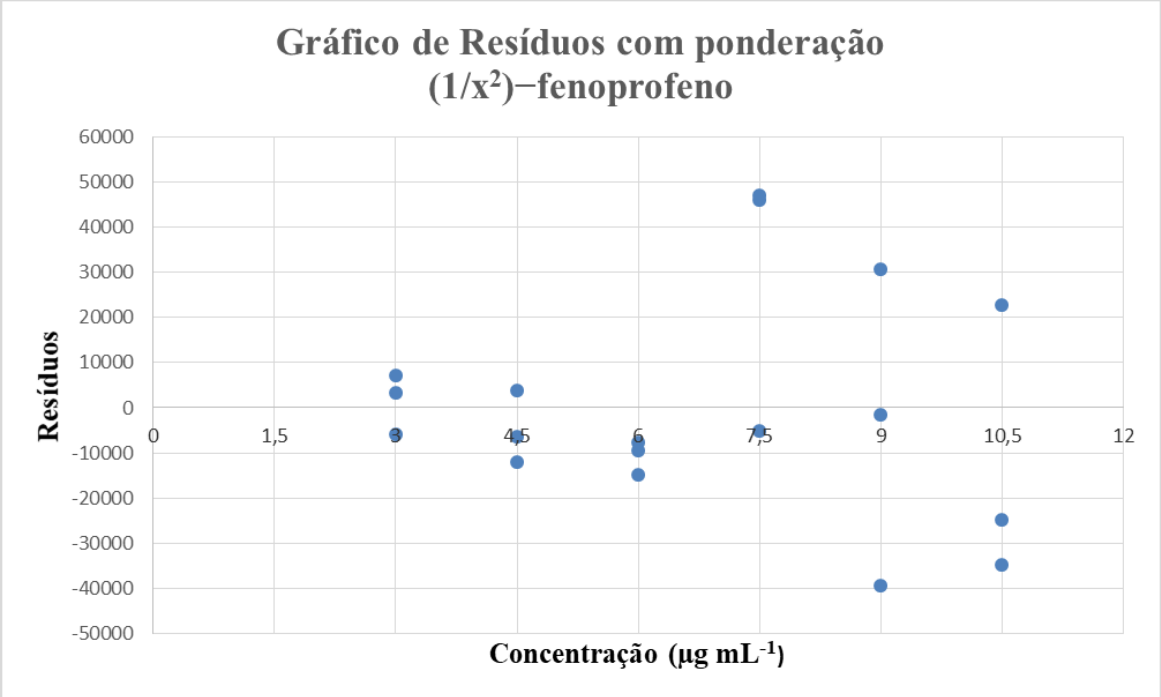


Figura 39 Gráfico de resíduos com ponderação ($1/x^2$) para o fenoprofeno.

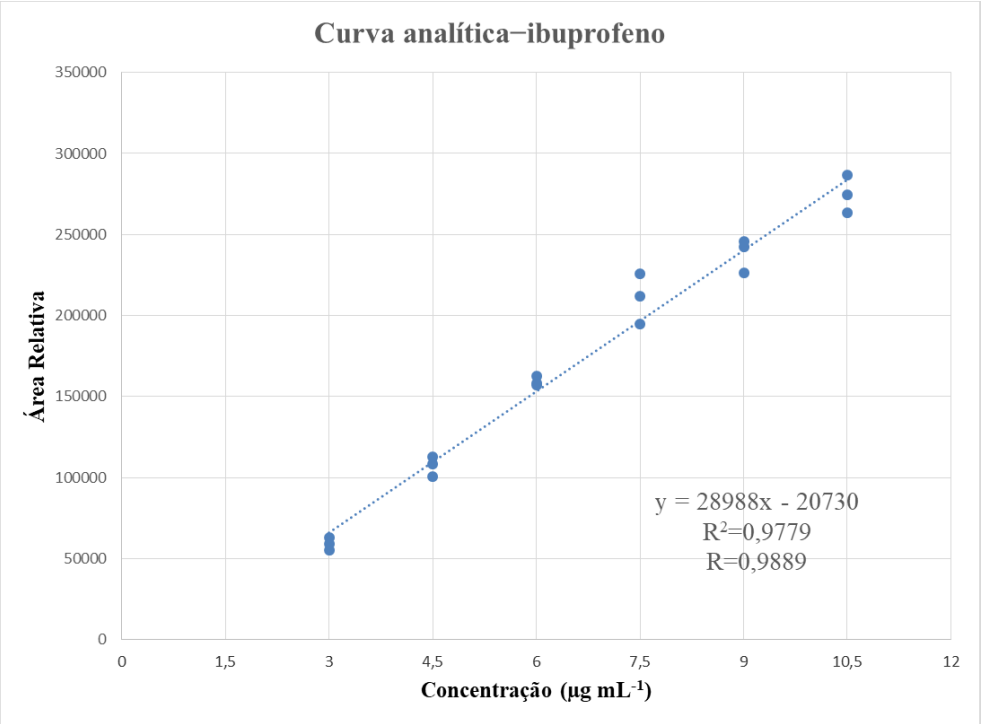


Figura 40 Curva analítica para o ibuprofeno.

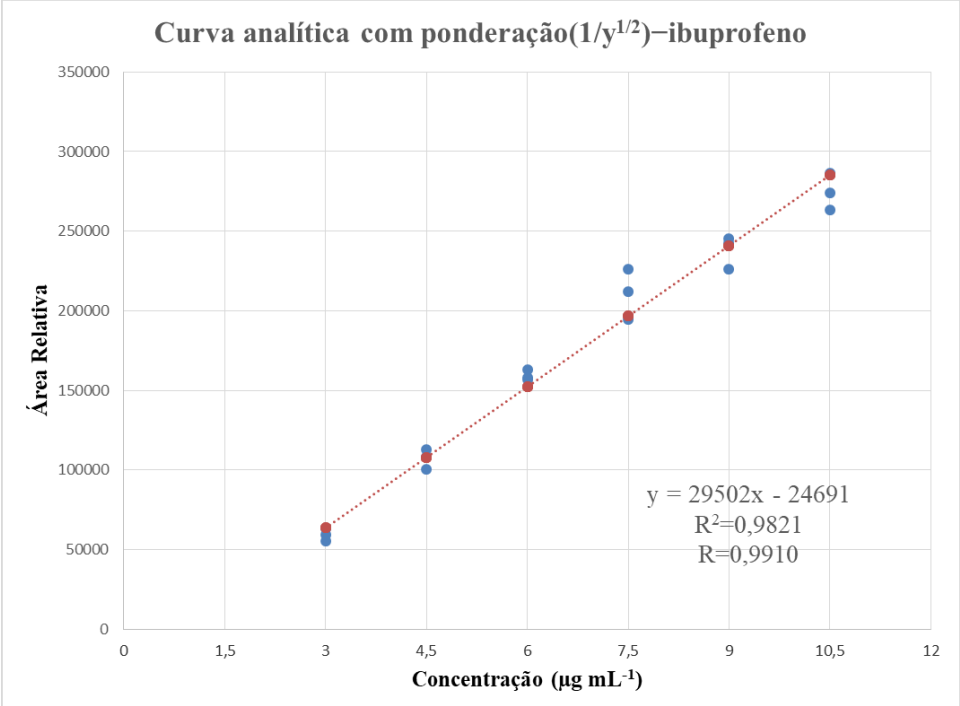


Figura 41 Curva analítica com ponderação ($1/y^{1/2}$) para o ibuprofeno.

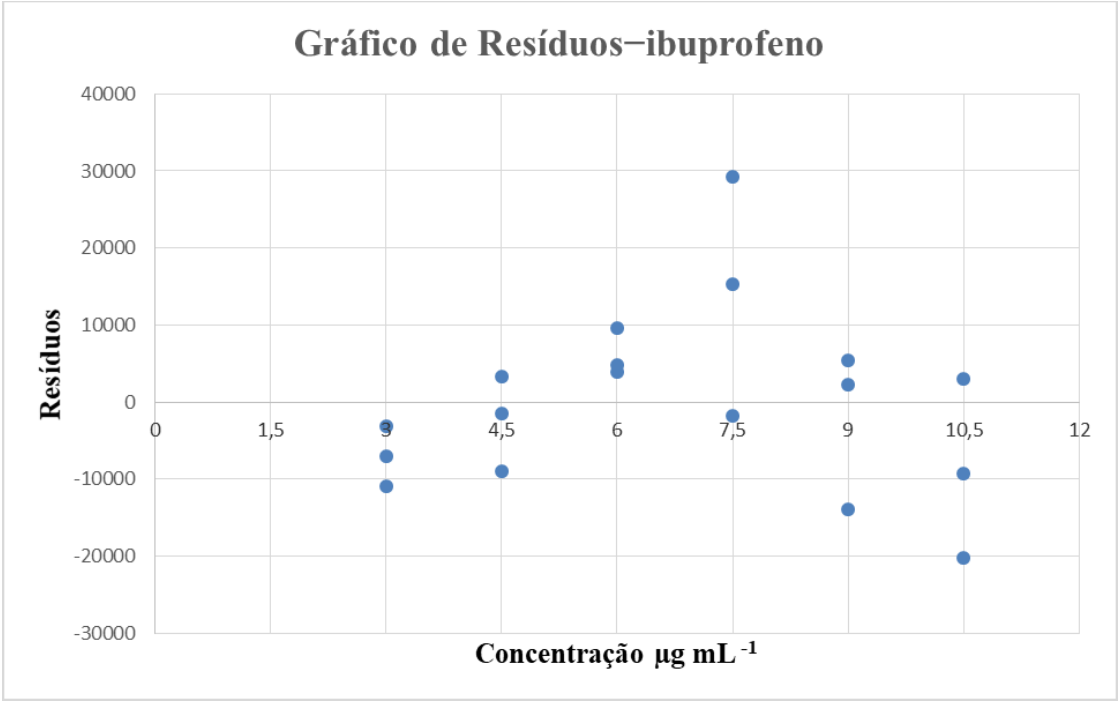


Figura 42 Gráfico de resíduos para o ibuprofeno.

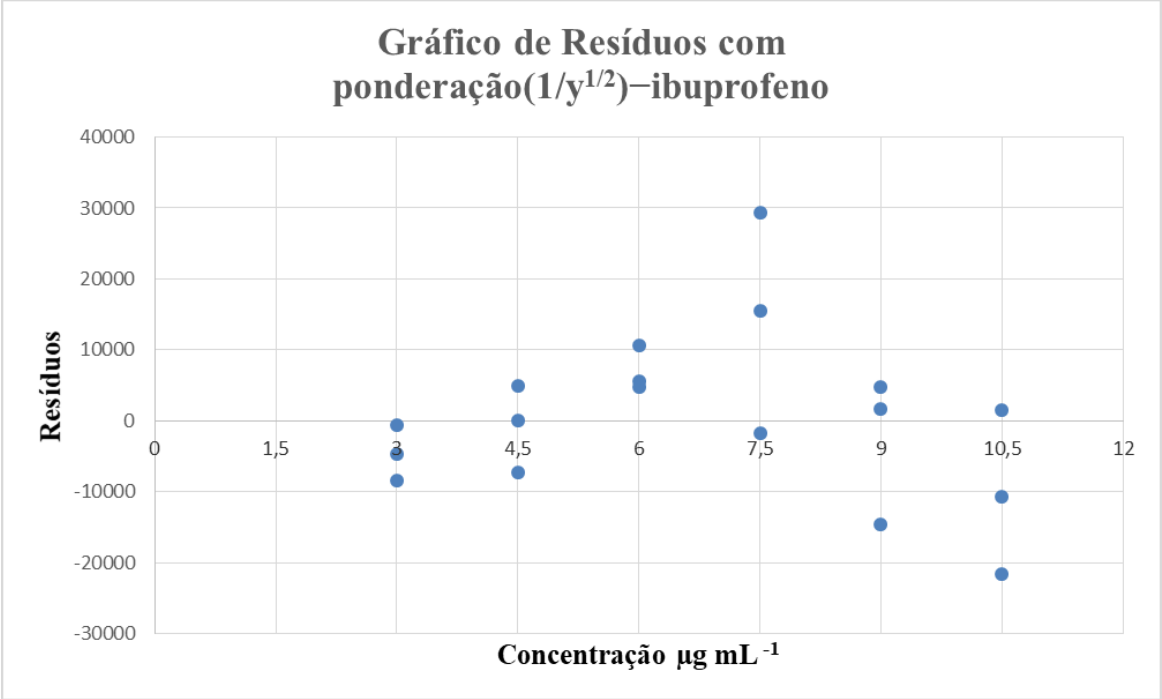


Figura 43 Gráfico de resíduos com ponderação ($1/y^{1/2}$) para o ibuprofeno.