

**Universidade Federal do Pará**  
**Programa de Pós-graduação em Química**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE  
MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE  
IBUPROFENO EM PLASMA POR UHPLC-DAD**

Belém/Pará - 2014

**Universidade Federal do Pará**  
Programa de Pós-graduação em Química

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE  
MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE  
IBUPROFENO EM PLASMA POR UHPLC-DAD**

ALUNO: Ana Carolina Maués dos Santos

Dissertação de mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em Química  
como parte dos requisitos para obtenção do  
título de **MESTRE** em Química

Belém/Pará - 2014

Universidade Federal do Pará  
Programa de Pós-graduação em Química

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE  
MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE  
IBUPROFENO EM PLASMA POR UHPLC-DAD**

---

Prof. Dr. Milton Nascimento da Silva (PPGQ-ICEN-UFPA)  
Orientador

---

Prof. Dr. Jesus Nazareno Silva de Souza (FEAL-ITC-UFPA)

---

Profa. Dra. Regina Oliveira (PPGQ-UFSCar)

---

Pesquisadora Dra. Consuelo Yumiko Yoshioka e Silva

Belém/Pará – 2014

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por que tudo que tenho e sou vem dEle. E nada faço, nem mesmo existo, sem Ele;

Ao Ministério Universidades Renovadas, em especial à Maiara, Lea, Joissy, Ádria, Marcia, Sanclayver, Gleissiane, Sabino, Bruno Barbosa, Bruno Dias, Karen, Jorgielly, Carlos Júnior, Ariadene, Paulo, Alix, Drielle, Anne, Ritielly, André Luís, Adelson Júnior e ao meu melhor amigo Paulo André Ferreira Borges da Costa.

Ao Grupo de Oração Universitário Maranató principalmente á Roseleuda, Danilo, Cássia e José Augusto;

À toda minha família principalmente a minha irmã Maria Elizabeth e a minha mães Margarida Maria, ao meu tio Heraldo e a minha madrinha Terezinha. E sempre serei grata ao meu tio Luiz que despertou em mim o sonho de ser pesquisadora;

A todos os meus amigos do Labcrol, Sônia das Graças Santa Rosa Panplona, Danila, Michelle, Aline e Neto. E “ex-labcroianos” Dalglish, Wanessa, Ana Carolina Albuquerque e Sandra Cristina.

À Dra. Consuelo Yumiko Yoshioka e Silva por todos os ensinamentos e a excelente orientação.

Ao Prof. Dr. Milton Nascimento da Silva pela oportunidade, ensinamento tanto científico quanto de vida, e toda sua paciência e persistência.

*“ Totus tuus, ó Maria!!! ”*

## LISTA DE FIGURAS

	<b>P.</b>
<b>Figura 1:</b> Estrutura molecular do ibuprofeno.....	15
<b>Figura 2:</b> Alguns Silicatos do grupo M41S.....	19
<b>Figura 3:</b> Desenho representativo das medidas relacionadas a parâmetros cromatográficos.....	24
<b>Figura 4:</b> Desenho representativo das medidas relacionadas a parâmetros cromatográficos(2).....	25
<b>Figura 5:</b> Esquema da produção do MCM-41.....	35
<b>Figura 6:</b> Cromatograma do ibuprofeno obtido por uma análise em um sistema MeOH/H <sub>2</sub> O 70% em uma coluna C18 de 15 cm sob varredura de 200 a 400 nm.....	40
<b>Figura 7:</b> Nomógrafo da seletividade em fase reversa proposto por Snyder (1997).	41
<b>Figura 8:</b> Cromatograma do ibuprofeno obtido por uma análise em um sistema MeCN/H <sub>2</sub> O 60% em uma coluna C18 de 15 cm sob 220 nm.....	41
<b>Figura 9:</b> Cromatograma do ibuprofeno obtido por uma análise em um sistema com PH 5, MeOH/H <sub>2</sub> O 70% em uma coluna C18 de 15 cm sob 220 nm.....	42
<b>Figura 10:</b> Cromatograma do ibuprofeno obtido por uma análise em um sistema com PH 2,6, MeCN/H <sub>2</sub> O 60% em uma coluna C18 de 15 cm sob 220 nm.....	43
<b>Figura 11:</b> Cromatograma da análise de ibuprofeno em plasma realizada em 60% de MeCN em H <sub>2</sub> O a pH 2,6, e em uma coluna de 10 cm contendo partículas de fase estacionária C18 com diâmetro igual a 1,7 µm.....	45
<b>Figura 12:</b> Cromatograma da análise de plasma de dois camundongo para investigar a presença de possíveis interferentes na matriz, realizada em 60% de MeCN em água a PH 2.6.....	46
<b>Figura 13:</b> Cromatogramada análise de plasma de dois ratos para investigar a presença de possíveis interferentes na matriz, realizada em 60% de MeCN em água a PH 2.6.....	46
<b>Figura 14:</b> Gráfico da curva analítica para o ibuprofeno.....	47

## LISTA DE TABELAS

	<b>p.</b>
<b>Tabela 1:</b> Exatidão e precisão de cada ponto da curva em comparação dos dados da literatura.....	48
<b>Tabela 2:</b> Valores dos Limites de quantificação e detecção (LQ e LD, respectivamente) encontrados para o ibuprofeno (n=3).....	49
<b>Tabela 3:</b> Valores de CV% encontrados para determinação de precisão intradia (n=5).....	50
<b>Tabela 4:</b> Valores de CV% encontrados para determinação de precisão interdias (n=5).....	50
<b>Tabela 5:</b> Valores de Exatidão% (n=5).....	51
<b>Tabela 6:</b> Valores de Exatidão (quanto a uniformidade) % (n=5).....	51
<b>Tabela 7:</b> Valores de recuperação encontrados para as amostras controle de qualidade (n=5).....	52

## **LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍBULOS**

AINE- Antiinflamatório não esteroide  
HDL- Hidróxido duplo lamelar  
ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
UE- União Europeia  
ICH- International Conference on Harmonization  
CL- Cromatografia Líquida  
HPLC- High Performance Liquid Chromatography  
UHPLC- Ultra High Performance Liquid Chromatography  
DAD- Detector de Arranjo de Iodo  
UV- Ultra Violeta  
FDA- Food and Drug Administration  
MCM-41- Mobil Composition of Matter N<sup>o</sup>41  
SPE- Solid Phase Extraction  
LD- Limite de Detecção  
LIQ- Limite Inferior de Quantificação  
CV- Coeficiente de Variação  
CQB- Controle de Qualidade de Baixa  
CQM- Controle de Qualidade de Média  
CQA- Controle de Qualidade de Alta  
K- Fator de retenção  
 $\alpha$ - Fator de separação  
Rs- Resolução  
N- Número de pratos  
As- Fator de assimetria  
r- coeficiente de correlação  
MeCN- Acetonitrila  
MeOH- Metanol



## **RESUMO**

O ibuprofeno é um anti-inflamatório não esteroide (AINE) empregado largamente no tratamento da dor, entretanto, ele é um medicamento de curta duração, por isso vários materiais são estudados como sistemas de liberação controlada para este fármaco como intuito principal de prolongar seu efeito. A eficácia desses materiais é avaliada de diferentes formas, em experimentos simulando condições do organismo (pH, temperatura, etc.) *in vitro* e/ou *in vivo*. O presente trabalho visa o desenvolvimento de um método por UHPLC que propicie a quantificação do ibuprofeno em plasma de camundongo. Método que deve ser posteriormente aplicado para avaliar a eficácia do silicato MCM-41 como um carreador do fármaco em estudo *in vivo*. Para tanto, foi desenvolvido primeiro o método para o pré-tratamento das amostras: a 120 µL de plasma foram adicionados 30 µL metanol e 350 µL de uma solução de ácido fórmico a 5%, a mistura foi inoculada a um cartucho de C18 previamente condicionado com 1 mL de metanol e 1 mL de água, posteriormente, a limpeza foi feita com a adição 500 µL de uma solução de ácido fórmico a 2%, o material de interesse foi coletado depois que dois volumes de 250 µL de metanol adicionados ao cartucho. O método cromatográfico se caracteriza por um volume de injeção de amostra de 10 µL, uma fase móvel com fluxo de 0,6 mL/min sendo constituída por 60% de acetonitrila em água apresentando PH em torno de 2,6, sendo a fase estacionária composta por C18 (1,8 mm, 100 x 2,1 mm), e para o monitoramento da análise foi empregado um comprimento de onda de 220 nm. Para assegurar a confiabilidade do método foram avaliados os parâmetros: linearidade, seletividade, sensibilidade, intervalo, precisão, exatidão, recuperação, “carry over” e robustez. Esta avaliação foi norteada pelas especificações de cada parâmetro descritas nas normas do ICH (R1), 2005 e pela ANVISA, 2003, dando um foco maior para o ICH (R1), 2005. O que permitiu concluir que o método é válido de acordo com ICH (R1), 2005.

## **ABSTRACT**

Ibuprofen is a nonsteroidal anti-inflammatory (NSAID) widely used in the treatment of pain, however, it is a drug of short duration, then several materials are studied as controlled release systems for this drug as main purpose to prolong its effect. The effectiveness of these materials is assessed in different ways in the experiments simulating conditions of body (pH, temperature, etc.), *vitro* and / or *in vivo*. The present work aims to develop a method for UHPLC that provides quantification of ibuprofen in mouse plasma. Method should be further applied to evaluate the efficacy of silicate MCM-41 as a drug carrier *in vivo* study. First, the pre-treatment of samples method was developed: 30  $\mu\text{L}$  of methanol were added of 120  $\mu\text{L}$  of plasma and 350  $\mu\text{L}$  of a solution of 5% formic acid, the mixture was inoculated to a C18 cartridge previously conditioned with 1 mL of methanol and 1 mL of water, subsequently, the cleaning was done by adding 500  $\mu\text{L}$  of a solution of 2% formic acid, the material of interest was collected after two volumes of 250  $\mu\text{L}$  of methanol added to the cartridge. The chromatographic method is characterized by a sample injection volume of 10  $\mu\text{L}$ , 60% acetonitrile in water having a pH around 2.6 was the mobile phase with a flow rate of 0.6 mL / min being stationary phase comprising C18 (1.8 mm, 100 x 2.1 mm) and 220 nm was employed for monitoring of analysis. The parameters, linearity, selectivity, sensitivity, range, precision, accuracy, recovery, "carry over" and robustness were evaluated to ensure the reliability of the method. This work was guided by the specifications of each parameter described in the ICH standards (R1), 2005 and ANVISA, 2003, but its focus was the ICH (R1), 2005. What led to the conclusion that the method is valid according to ICH (R1), 2005.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>1 OBJETIVOS</b> .....	14
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
2.1 IBUPROFENO.....	14
2.2 PROPRIEDADES FARMACÉUTICAS .....	15
2.3 ESTUDOS ENVOLVENDO A LIBERAÇÃO CONTROLADA DE IBUPROFENO..	16
2.4 CARREADORES DE FARMACOS.....	17
2.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO.....	20
2.5.1 Pré- validação.....	21
2.5.1.1 Conformidade do sistema.....	21
2.5.1.2 Estabilidade.....	26
2.5.2 Parâmetros de validação do método.....	26
2.5.2.1 Especificidade e Seletividade.....	26
2.5.2.2 Linearidade/Curva de calibração.....	27
2.5.2.3 Intervalo.....	28
2.5.2.4 Precisão.....	28
2.5.2.5 Exatidão.....	29
2.5.2.6 Limite de detecção (sensibilidade).....	30
2.5.2.7 Limite de quantificação.....	30
2.5.2.8 Robustez.....	31
2.5.2.9 Recuperação.....	31
2.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA ALTA EFICIÊNCIA.....	32
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	34
4.1 MCM-41.....	34
4.2 ACESSÓRIOS e CONSUMÍVEIS.....	35
4.3 EQUIPAMENTOS.....	36
4.4 METODOLOGIA.....	36
4.4.1 Obtenção do plasma.....	36
4.4.2 Preparo de amostras.....	37
4.4.3 Método cromatográfico.....	37
4.4.4 Validação do Método.....	37

<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>40</b>
5.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO.....	40
5.2 PROCOSSO DE VALIDAÇÃO.....	42
<b>CONCLUSÃO OU CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>55</b>

## INTRODUÇÃO

O ibuprofeno é um antiinflamatório não esteroidal (AINE) empregado largamente no tratamento da dor. Entretanto, é um medicamento de curta duração, já que sua meia vida varia de 1 a 2 h, por isso sistemas de liberação controlada para ibuprofeno são muito estudados, e possuem o intuito principal de prolongar os efeitos analgésicos.

Na literatura podem ser encontrados trabalhos envolvendo vários tipos de materiais que possam vir a ser usados como um carreador para o ibuprofeno. Dentre os mais estudados, muitos são de origem mineral, como zeólitas, sílica, HDL (Hidróxido Duplo Lamelar), silicatos tal qual o MCM-41, entre outros. A eficácia desses materiais é avaliada de diferentes formas, em experimentos simulando condições do organismo (pH, temperatura, etc.) em testes *in vitro* e/ou *in vivo* (Cunha, 2010).

Uma maneira de realizar um estudo *in vivo* é pela quantificação do fármaco de interesse o em plasma. Dessa forma, é possível construir a curva farmacocinética do fármaco para assim avaliar quanta influência o carreador exerceu na sua farmacocinética. Ou mesmo, verificar se, quando administrado com o carreador, após um longo período de tempo o ibuprofeno ainda é encontrado em concentração efetiva no plasma, sem necessariamente construir uma curva.

A quantificação de fármacos em fluidos biológicos é assegurada mediante o uso de métodos validados, pois a validação assegura que o método apresenta especificidade, linearidade, precisão e exatidão garantidas por normas de instituições como ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), UE (União Europeia), ICH (*International Conference on Harmonization*). Sem esta segurança o resultado analítico é considerado duvidoso, o que no estudo da eficácia de um carreador comprometeria a análise farmacocinética. Neste trabalho foram adotadas as especificações estabelecidas pela ICH para nortear o processo de validação.

A quantificação de fármacos em plasma pode ser feita com diferentes técnicas analíticas. Entre as mais utilizadas, a que encontra maior destaque é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Com relação ao ibuprofeno são vários os métodos de quantificação disponíveis na literatura empregando-se HPLC. Contudo, outra técnica que

pode ser considerada a versão aperfeiçoada da HPLC e que vem se destacando, é a Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência (UHPLC). Esta foi aplicada neste trabalho por propiciar às análises maior sensibilidade, seletividade e menor tempo se comparada à HPLC. Além da economia de solvente.

## 1 OBJETIVOS

- Geral:

Otimizar e validar um método analítico para quantificação do ibuprofeno em plasma de camundongo por UHPLC .

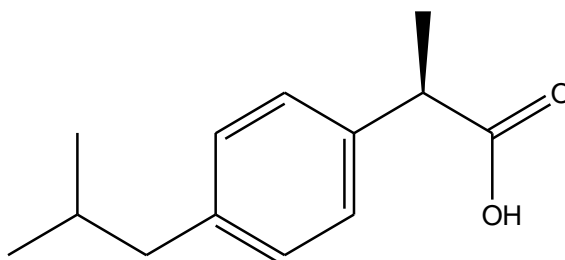
- Específicos:

- Otimizar as condições para o pré-tratamento das amostras biológicas;
- Avaliar as melhores condições analíticas para análise de ibuprofeno por cromatografia líquida;
- Validar o método analítico considerando as normativas da Agencia Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA) e International Conferenceon Harmonization (ICH).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 IBUPROFENO

O ibuprofeno, cuja estrutura pode ser observada na figura 1, é um ácido orgânico de estrutura assimétrica por apresentar um centro estereogênio. É pouco solúvel em água (menos de 1 mg/mL), mas, demonstra boa solubilidade na maioria dos solventes orgânicos e em soluções alcalinas. Também pode ser denominado como ácido 2-(4-isobutilfenil) propiônico; ácido  $\alpha$ -metil-(2-metil-propil fenil) acético e ácido 4-isobutil- $\alpha$ -metil-fenilacético (Stahly e Starrett, 1997; Higgins *et al.* 2001).



**Figura 1:** Estrutura molecular do ibuprofeno

O ibuprofeno foi sintetizado pela primeira vez em Dezembro de 1961 no Reino Unido pelo Dr. Stewart Adams e pelos seus colegas John Nicholson e Colin Burrows. Apesar da data da sua síntese, só foi comercializado em 1969 no Reino Unido para o tratamento da artrite reumatoide e em 1974 nos EUA (Cann, 2005).



## 2.2 PROPRIEDADES FARMACÊUTICAS

O ibuprofeno é geralmente administrado sob a forma de mistura racêmica, embora, segundo Lin (2004) apenas o S(-)-enantiômero tenha atividade terapêutica. Contudo, estudos anteriores realizados em seres humanos já demonstravam que o R(+)-enantiômero sofre uma inversão enantiomérica no organismo tornando, portanto, o uso da mistura racêmica viável (Vueba, 2006).

O uso do ibuprofeno é indicado para o tratamento sintomático da febre e da dor moderada, dismenorreia, cefaleia, pós-operatório, doenças reumáticas, e em dores musculares (Gilman, 1996).

Ele é rapidamente absorvido após a administração oral, liga-se extensivamente a proteína plasmática (90-99%), seu volume de distribuição é de aproximadamente 0,1 L/Kg e as concentrações máximas plasmáticas são observados após 15-30 min. De acordo com a bula para o ibuprofeno em suspensão oral (gotas), é nesse período de pico plasmático que o paciente começa a perceber os efeitos do medicamento. O tempo de meia-vida biológica do fármaco é de 1 a 3 horas, o que demonstra o problema da curta duração da ação do ibuprofeno (Lamprecht *et al.* 2004).

## 2.3 ESTUDOS ENVOLVENDO A LIBERAÇÃO CONTROLADA DO IBUPROFENO

No trabalho realizado por Francis *et al.* (2012), foi avaliado o efeito da hidrofiliabilidade na liberação controlada de ibuprofeno por Poli (N-isopropilacrilamida) Hidrogel em diferentes valais de pHs. Os estudos de liberação *in vitro* mostraram que a taxa de liberação do ibuprofeno dependia da polaridade do meio, do gel e do raio de dilatação do gel como uma rede em função do pH e da temperatura ambiente.

O trabalho desenvolvido por Zhing Xu *et al.* (2011) é um dos que investigam a ação dessas nano partículas no controle da liberação de ibuprofeno. Nesse caso foram avaliadas nano partículas glico-polipeptídeas contendo Mn dopadas com pontos quânticos de ZnS. O

estudo foi realizado *in vitro*. Segundo os autores as nano partículas exibiram um comportamento de liberação controlada para o ibuprofeno.

Outro tipo de material descrito na literatura com efeito de prolongar a liberação do ibuprofeno, são os polímeros. Por exemplo, os biodegradáveis como as microesferas de PHBV (hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) e PLA (L-lactido) estudados por Bazzo et al. (2012), demonstraram prolongar a liberação do ibuprofeno. Os autores comprovaram este efeito através do estudo *in vitro*, e *in vivo* pela quantificação do ibuprofeno em plasma de rato, com isso eles demonstraram que estes biopolímeros afetam a farmacocinética do ibuprofeno prolongando o tempo de meia vida do fármaco.

Além de polímeros, na literatura, são também encontrados trabalhos envolvendo lipídios. Um exemplo é o trabalho desenvolvido por Alf Lamprecht et al. (2004). Eles avaliaram nano cápsulas lipídicas como sistemas para liberação controlada do ibuprofeno. Este estudo foi realizado *in vitro*, quanto ao estudo *in vivo*, este foi realizado pela quantificação do ibuprofeno em plasma de rato e conseqüentemente avaliação do efeito das nano cápsulas lipídicas na farmacocinética do fármaco. Os autores concluíram que o efeito do fármaco administrado com nano cápsulas lipídicas por via oral inicia-se 30 min após a administração, e prolongou-se até 4 h. O alívio da dor após a administração intravenosa foi prolongada pelo menos 2 h. O sistema de liberação controlada do fármaco foi desenvolvido o qual exhibe propriedades de liberação sustentada por qualquer via oral ou por via intravenosa e pode ser interessante para o tratamento pós-operatório da dor.

## 2.4 CARREADORES DE FÁRMACO

Nas últimas décadas uma atenção considerável do meio científico esteve voltada para o desenvolvimento de novos sistemas de transporte de fármacos, principalmente, porque a utilização da maioria dos compostos terapêuticos é sempre limitada pela impossibilidade de aumento de dosagem. Problemas inerentes à utilização de fármacos em concentrações elevadas levaram a um grande esforço dos pesquisadores, no sentido de desenvolver sistemas capazes de transportar o fármaco até um alvo específico, diminuindo, assim, os efeitos

indesejáveis resultantes de sua ação em outros sítios não específicos (Henrique, J. S., *et al* 2006).

No sistema de liberação controlada, o fármaco está ligado a um transportador (carreador), que é o responsável por contornar as propriedades físico-químicas limitantes dos fármacos encapsulados, melhorando, desta forma, a farmacodinâmica (potencialização do efeito terapêutico), farmacocinética (controle da absorção e distribuição tecidual) e os efeitos toxicológicos (redução da toxicidade local e sistêmica) dos mesmos (Henrique, J. S., *et al* 2006).

Os sistemas de liberação controlada possuem dois objetivos principais: manter constante a concentração sanguínea de uma determinada droga, assegurando uma maior biodisponibilidade, e reduzir os efeitos colaterais, realçando, assim, a adesão do paciente ao tratamento com um menor número de dosagens requeridas (Henrique, J. S., *et al* 2006).

Os primeiros estudos realizados para a obtenção de sistemas carreadores eficazes tiveram como base o encapsulamento de moléculas. O primeiro estudo data do início do século XX, quando Paul Ehrlich propôs o seu modelo, que ficou conhecido por “Bala Mágica de Ehrlich” (*Ehrlich's Magic Bullet*) (Henrique, J. S., *et al* 2006).

Os estudos persistiram e atualmente o número de produtos farmacêuticos baseados em novos sistemas carreadores de fármacos tem aumentado significativamente com tendência de crescimento para os próximos anos (Verma e Garg, 2001). Diversos sistemas para liberação controlada de fármacos têm sido engendrados e descritos, com suas vantagens e desvantagens comparadas, podendo ser classificados em quatro grupos principais: carregadores virais, compostos catiônicos orgânicos, proteínas recombinantes e nanopartículas inorgânicas. Exemplos recentes incluem: pontos quânticos (*quantum dots*) ou nanocompósitos magnético-fluorescentes; géis poliméricos; nanotubos de carbono ou sílica funcionalizados; cápsulas multilamelares de polieletrólitos; nanopartículas de ouro e hidróxidos duplos lamelares (Cunha *et al.* 2010).

Entre muitos materiais estruturalmente estáveis investigados para liberação de fármacos, a sílica mesoporosa tem se mostrado promissora devido à sua biocompatibilidade, estrutura dos poros uniforme, tamanho ajustável, com distribuição estreita, volume de poros grandes, e facilidade de funcionalização de superfície (Hawan *et al.*, 2010). Além disso, a sílica tem sido utilizada na formulação de implantes artificiais, devido às propriedades

osteogênicas que apresenta. Para aplicações de liberação controlada, tem sido demonstrado que esta é capaz de armazenar e liberar gradualmente medicamentos terapêuticos como antibióticos, e outros. A sílica também é usada para melhorar a biocompatibilidade de liberação de fármacos de vários sistemas, tais como nanopartículas magnéticas, biopolímeros, e micelas (Slowing, 2008).

Na década de 90, foi descoberta por cientistas da Mobil uma nova família de peneiras moleculares mesoporosas silicato/aluminossilicato, a M41S, figurara 2, que possuem estrutura de poros uniformes excepcionalmente largos, apresentando um sistema de mesoporos de tamanho bem definido com arranjo espacial regular. O principal representante dessa família é o MCM-41, que significa *Mobil Composition of Matter* N<sup>o</sup>41, que apresenta um arranjo hexagonal altamente ordenado de poros unidimensionais, com uma distribuição de tamanho de poros muito estreita e com poros variando de 20 a 100 Å (Beck *et al.*, 1992) (Mohallem & Sousa 2011). Estes materiais são alvos de um número crescente de estudos visando aplicações distintas, dentre elas troca iônica, adsorção, catálise, etc. Uma de suas potenciais aplicações é como suporte na entrega de fármacos, já que neste estão presentes grupos silanóis que conferem um potencial interessante para uso como matriz na incorporação de várias de espécies químicas, tais como moléculas orgânicas, metais e polímeros (Hawang, 2010; Borges, 2006).



**Figura 2:** Alguns silicatos do grupo M41S

O MCM-41 tornou-se um exemplo nas pesquisas envolvendo liberação controlada de

fármacos, sendo este empregado em vários estudos *in vivo* que demonstram o comportamento desse mineral associada ao ibuprofeno. Estudos realizados por Charnay em 2003 mostraram que quando colocado em pH gástrico apenas 1/3 do fármaco era liberado, enquanto em um pH de 7,4, o mesmo presente no intestino, este era liberado em maior quantidade. Os experimentos realizados nos fluídos gástrico e intestinal mostraram uma liberação rápida e completa do ibuprofeno por difusão. Demonstrando que materiais de sílica constituem um transportador de fármaco potencialmente interessante para fármacos insolúveis em água.

O bioma Amazônico é rico em minerais e espécies vegetais e animais, o que nos propicia uma vasta área de pesquisa. Tendo em vista diss, têm sintetizado MCM-41, a partir de caulim - material encontrado em abundância no Nordeste do estado do Pará, região do Rio Capim (Carneiro, *et al.*, 2003), formado por um grupo de silicatos hidratados de alumínio, principalmente caulinita e haloisita, sendo a fórmula química dos minerais do grupo da caulinita  $Al_2O_3 \cdot mSiO_2 \cdot nH_2O$ , onde **m** varia de 1 a 3 e **n** de 2 a 4 (Silva, 2001).

Tendo em vista os possíveis benefícios trazidos por esta associação o presente trabalho visa analisar a atividade farmacológica de MCM-41 para a liberação controlada de ibuprofeno por um tempo prolongado em modelos de nocicepção *in vivo*.

## 2.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação analítica (Ribani *et al.* 2004).

A validação de métodos cromatográficos para a quantificação de compostos endógenos ou exógenos em matrizes biológicas tem sido tema de discussão em conferências e artigos científicos. Representantes da comunidade científica, das indústrias e agências reguladoras do Brasil Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), EUA Food and Drug Administration (FDA) e Europa (EU) definiram os parâmetros de validação, que

posteriormente foram uniformizados pela ICH (*International Conference on Harmonization*) (Cassiano *et al.* 2009).

Segundo a resolução nº 899 da ANVISA de 29 de maio de 2003: a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e exatidão, adequadas a análise.

A validação dos procedimentos analíticos: TEXTO E METODOLOGIA Q2 (R1) é um documento que apresenta uma discussão sobre as características a serem consideradas durante a validação dos procedimentos analíticos incluídos como parte dos pedidos de registro apresentados dentro da União Europeia, Japão e EUA. Este documento não necessariamente procura cobrir os testes que podem ser necessários para inscrição no, ou exportação. Contudo, este serve como um conjunto de termos, e suas definições, destinados a superar as diferenças que muitas vezes existem entre diversos compêndios e os reguladores da Comissão Européia, Japão e EUA.

O objetivo da validação de um método analítico, segundo este documento, é demonstrar que ele é adequado para a sua finalidade. Uma adição tabular das características aplicáveis a identificação, o controle das impurezas e dos procedimentos de ensaio é incluído.

Neste trabalho fez-se uso das orientações da ANVISA e do ICH para desenvolvimento do processo de validação, com o foco principal para o ICH.

### 2.5.1 Pré-validação

Em todos os tipos de métodos analíticos validados, há requerimentos de pré-validação que precisam estar em conformidade antes de se iniciar a validação do método. Alguns itens são de suma importância para assegurar uma boa validação e, conseqüentemente, a confiabilidade dos resultados. São eles: qualificação analítica do equipamento; conformidade do sistema e, estabilidade das soluções e amostras (Rizzato *et al.*, 2008).

A qualificação analítica do equipamento envolve a adequação do equipamento frente aos resultados esperados. Para tanto, o equipamento deve estar em boa manutenção e,

principalmente, calibrado. Para gerar resultados reprodutíveis e seguros as estabilidades das amostras, dos padrões, dos reagentes e das fases móveis precisam ser avaliadas antes do início da validação do método (Rizzato *et al*, 2008).

#### 2.5.1.1 Conformidade do sistema

Para o bom desenvolvimento de um procedimento de validação de um determinado método analítico é preciso assegurar que todo o sistema selecionado para o desenvolvimento do processo de análise esteja apto a fornecer resultados com precisão e exatidão aceitáveis e confiáveis. Esta é a etapa inicial a ser estabelecida, e é obtida para os métodos cromatográficos a partir de testes experimentais de conformidade do sistema (*system suitability*) que inclui avaliação dos seguintes parâmetros: fator de retenção (k), fator de separação ( $\alpha$ ), resolução (Rs), número de pratos teóricos (N) e fator de assimetria (As) (Rizzato *et al*, 2008).

Estes parâmetros são calculados levando em consideração medidas características do cromatograma como esta sendo representado na figura 3, onde  $t_M$  indica o tempo de eluição de um composto que não interage com a fase estacionária;  $t_R$  representa o tempo gasto desde a injeção do analito no sistema cromatográfico até a saída do ponto máximo do pico referente ao mesmo;  $W_b$  é a largura da base do pico cromatográfico;  $W_{50}$  é a largura do pico cromatográfico a meia altura. A partir das medidas  $t_R$  e  $t_M$ , pode-se obter o tempo de retenção relativo ( $t'R$ ) que representa o tempo em que o analito fica retido na fase estacionária (Rizzato *et al*, 2008):

$$t'R = tR - tM \quad (1)$$

Segundo EC (European Commission) o  $t'R$  mínimo aceitável para um analíto corresponde ao dobro de  $t_M$ .

- Fator de retenção (k):

Medida adimensional e fundamental da retenção em cromatografia líquida. É determinada pela razão entre o tempo de retenção de um soluto ( $t'R$ ) e o tempo de eluição de um soluto não retido ( $tM$ ). O  $k$  é um parâmetro importante, pois os valores de  $t'R$  variam conforme o tamanho da coluna, tubulação, tamanho da partícula e etc. (Equação 2):

$$k = \frac{t'R}{tM} \quad (2)$$

- Fator de separação ( $\alpha$ ):

Mede a seletividade da separação para duas bandas adjacentes em um cromatograma, e é calculado pela razão entre os fatores de retenção dos dois picos adjacentes (1 e 2) (Cass e Degani, 2001) (Equação 3):

$$\alpha = \frac{k2}{k1} \quad (3)$$

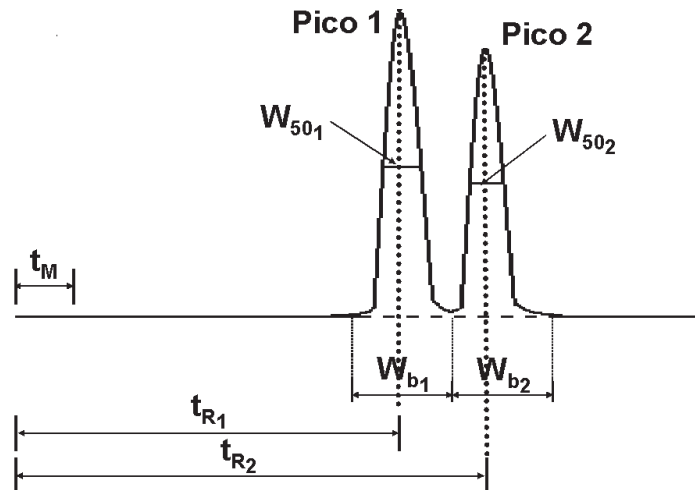
- Resolução ( $R_s$ ):

$R_s$ , também é um parâmetro de separação de dois componentes consecutivos em um cromatograma, medindo a qualidade da separação. Leva em conta a largura das bandas além dos respectivos tempos de retenção (Cass e Degani, 2001) (Equação 4):

$$R_s = 2 \frac{tR2 - tR1}{Wb1 + Wb2} \quad (4)$$

Quando  $R_s = 1$ , os dois picos são razoavelmente separados, com somente 2% de superposição se as quantidades dos dois componentes forem iguais. Maiores valores de resolução indicam melhor separação:  $R_s = 1,25$  é suficiente para fins quantitativos, e  $R_s > 1,5$  indica separação completa (Collins *et al*, 2005).





**Figura 3:** Desenho esquemático representando medidas relacionadas a parâmetros cromatográficos (Paschoal, *et al.* 2008)

- Número de pratos teóricos ( $N$ ):

Cada prato ( $N$ ) a uma etapa de equilíbrio de soluto entre as fases móvel e estacionária. O cálculo de  $N$  determina a eficiência de uma coluna, dimensionando a capacidade de interação da sua fase estacionária com cada um dos componentes de uma mistura que estejam eluindo através da mesma; é calculado para cada banda cromatográfica a partir do seu tempo de retenção e da largura do pico na linha de base ( $Wb$ ) ou à meia altura do pico ( $W50$ ) (Cass e Degani, 2001) (Equação 5):

$$N = 16 \frac{t'R^2}{Wb^2} \quad (5)$$

A eficiência pode ser afetada por vários fatores, incluindo as condições de análise, o tamanho da amostra, o tipo de soluto e, principalmente, o comprimento da coluna, fato que torna difícil uma comparação de  $N$  entre colunas diferentes. Por isso, a avaliação comparativa entre colunas é feita pela medida da altura equivalente a um prato ( $H$ ), que corresponde à razão entre o comprimento da coluna,  $L$ , e  $N$ , eliminando a influência dos diferentes comprimentos da coluna (Cass e Degani, 2001) (Equação 6):

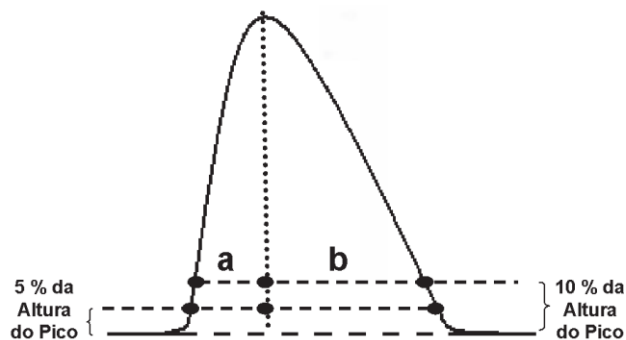
$$H = \frac{L}{N} \quad (6)$$

- Fator de assimetria ( $A_s$ ) e/ou de alargamento ( $Tf$ ):

Embora não sejam previstos teoricamente, na prática são extremamente comuns. Ambos medem a simetria e as distorções frontais ou posteriores (caudas) de uma banda cromatográfica, sendo  $A_s$  calculado a 10% da altura do mesmo (Equação 7), e  $Tf$  calculado a 5% da altura (Equação 8) (Rizzato *et al*, 2008):

$$A_s = \frac{b}{a} \quad (7)$$

$$Tf = \frac{a + b}{2a} \quad (8)$$



**Figura 4:** Desenho esquemático representando medidas relacionadas ao fator de assimetria (Paschoal, *et al.*, 2008).

## 2.5.2 PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Os parâmetros de validação de método bioanalítico descritos nas resoluções da ANVISA e do ICH são explanados a seguir.

#### 2.5.2.1 Especificidade e seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Para garantir a especificidade deve-se analisar amostras da matriz biológica (sangue, plasma, soro, urina, ou outra) obtidas de seis indivíduos, sendo quatro amostras normais, uma lipêmica e uma hemolisada, sob condições controladas referentes ao tempo, alimentação e outros fatores importantes para o estudo. Cada amostra branco deve ser testada utilizando o procedimento e as condições cromatográficas propostas. Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos com solução aquosa do analito, em concentração próxima ao LIQ. Qualquer amostra branco que apresentar interferência significativa no tempo de retenção do fármaco, metabólito ou padrão interno, deve ser rejeitada. Caso uma ou mais das amostras analisadas apresentarem tal interferência, novas amostras de outros seis indivíduos devem ser testadas. Caso uma ou mais das amostras deste grupo apresentarem interferência significativa no tempo de retenção do fármaco, o método deve ser alterado visando eliminá-la (ANVISA, 2003 e ICH,2005).

#### 2.5.2.2 Linearidade/Curva de calibração

De acordo com a ICH (International Conference Harmonization), a linearidade de um procedimento analítico é sua habilidade (dentro de um dado intervalo de concentração) de obter resultados em um procedimento que seja diretamente proporcional a concentração (quantidade) do analito na amostra. Ela deve ser demonstrada diretamente no analito ou em amostras fortificadas utilizando pelo menos cinco concentrações diferentes cobrindo o intervalo de trabalho. Testes estatísticos, tais como regressão linear, são recomendados para complementar o exame visual do sinal analítico (ICH, 1996).

A curva de calibração representa a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito. Para cada fármaco e corrida analítica deve-se gerar uma curva de calibração, a qual será usada para calcular a concentração do fármaco nas amostras, utilizando-se a mesma matriz biológica proposta para o estudo. A curva de calibração deve incluir a análise da amostra branco (matriz biológica isenta de padrão do fármaco e do padrão interno), da amostra zero (matriz biológica mais o padrão interno) e das amostras fortificadas com o fármaco e padrão interno. Para tanto, a curva deverá apresentar uma equação de regressão e coeficiente de correlação ( $r$ ) ou de determinação ( $r^2$ ) (ICH, 1996). Para a determinação da curva de calibração, deve-se analisar amostras extraídas da matriz apropriada, no mínimo 6 (seis) concentrações diferentes. Os critérios para aceitar a curva de calibração são: precisão e exatidão com desvios menores ou iguais a 20 % (vinte por cento) em relação à concentração nominal para o Limite Inferior de Quantificação (LIQ), e precisão e exatidão com desvios menores ou iguais a 15 % (quinze por cento) em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração, no mínimo quatro de seis concentrações da curva de calibração devem cumprir com os critérios anteriores, incluindo o LIQ e a maior concentração da curva de calibração e o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98 (ANVISA, 2003).

#### 2.5.2.3 Intervalo dinâmico de concentração

O intervalo de concentração é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Este parâmetro é estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequados quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo de concentração especificado (ANVISA, 2003). De acordo com o ICH (2005) o intervalo é a gama de um procedimento analítico entre a concentração superior e inferior do analito na amostra para os quais se demonstrou que o processo de análise tem um adequado nível de precisão, rigor e linearidade.

Os seguintes intervalos mínimos especificados pelo ICH devem ser considerados:

- Para o ensaio de uma substância de fármaco ou de um produto acabado (fármaco): normalmente, de 80 a 120 por cento da concentração de teste.
- Para a uniformidade de conteúdo deve haver um mínimo entre 70 e 130 por cento da concentração de teste.
- Para os ensaios de dissolução: + / -20% em relação ao intervalo especificado.

#### 2.5.2.4 Precisão

A precisão de um procedimento analítico, expressa o grau de concordância (grau de dispersão) entre uma série de medidas obtidas a partir de amostragem múltipla de uma mesma amostra homogênea de acordo com as condições prescritas. Ela pode ser considerada em três níveis: repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermediária. A precisão de um procedimento analítico é geralmente expressa como o desvio, o desvio padrão ou o coeficiente de variação de uma série de medições (ICH Q2 R1, 2005).

A precisão intra-dia ou repetibilidade do método é verificada utilizando-se, no mínimo, três concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de variação do procedimento, realizando-se, no mínimo, três determinações por concentração (ICH Q2 R1, 2005).

A extensão a que a precisão intermédia deve ser estabelecida em função das circunstâncias sob as quais o procedimento destina-se a ser usado. O candidato deverá estabelecer os efeitos de eventos aleatórios sobre a precisão do procedimento analítico. Variações típicas a serem estudadas incluem dias, analistas, equipamentos, etc, não é considerado necessário estudar esses efeitos individualmente (ICH Q2 R1, 2005).

#### 2.5.2.5 Exatidão

Segundo o ICH a exatidão de um procedimento analítico, expressa o grau de concordância entre o valor que é aceito como um valor verdadeiro convencional ou um valor de referência aceito e o valor encontrado. Isso às vezes é chamado de veracidade.

A exatidão deve ser avaliada usando um mínimo de nove determinações ao longo de um mínimo de três níveis de concentração que abranja o intervalo especificado (por exemplo, três concentrações de cada uma das três repetições do procedimento analítico total).

E deve ser avaliado como percentagem de recuperação através do ensaio da quantidade adicionada conhecida de analito na amostra, ou como a diferença entre a média e o verdadeiro valor aceito, juntamente com os intervalos de confiança.

#### 2.5.2.6 Limite de detecção

É a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do fármaco, até o menor nível detectável (ANVISA, 2003).

Para o ICH a razão sinal-ruído entre 3 ou 2 é geralmente considerada aceitável para estimar o limite de detecção recomenda-se que o LD seja de 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base. Essa determinação da relação sinal-ruído deve ser efetuada por comparação de sinais medidos a partir de amostras com baixas concentrações conhecidas de analito com aqueles das amostras em branco e que estabelece a concentração mínima para a qual a substância a analisar pode ser detectada com confiabilidade.

#### 2.5.2.7 Limite de quantificação

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Estabelecido por meio da análise de matriz biológica contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis com desvio de no máximo 20 %.

O limite de quantificação (ICH 2005) é geralmente determinado através da análise de amostras com concentrações conhecidas de analito e por determinação do nível mínimo no qual a substância a analisar pode ser quantificada com exatidão e precisão aceitáveis.

#### 2.5.2.8 Robustez

Para o ICH a avaliação de robustez deve ser considerada durante a fase de desenvolvimento do método e depende do tipo do processo em estudo. Ele deve mostrar a confiabilidade de uma análise com relação às variações deliberadas dos parâmetros do método.

Se as medições são sensíveis a variações nas condições analíticas, as condições analíticas deverão ser adequadamente controladas ou uma indicação de precaução deve ser incluída no processo. Uma consequência da avaliação de robustez, que um conjunto de parâmetros de adequação do sistema (por exemplo, resolução de ensaio) é estabelecido para assegurar que a validade do processo analítico é mantida.

#### 2.5.2.9 Recuperação

Segundo a ANVISA (2003) a recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximas a 100% são desejáveis, porém, admite-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata.

Este teste deve ser realizado comparando-se os resultados analíticos de amostras extraídas a partir de três concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de linearidade do método, com os resultados obtidos com soluções padrão não extraídas, que representam 100% de recuperação.

## 2.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA

Desde o início da cromatografia líquida (LC), em 1950, até os dias atuais, muitos avanços foram alcançados e todos eles foram impulsionados pelo desenvolvimento contínuo de novas partículas de fases estacionárias (FE) que fossem capazes de gerar colunas mais seletivas, eficientes e estáveis química e mecanicamente. Nos últimos 40 anos, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) tem sido a técnica analítica mais desenvolvida, difundida e empregada em laboratórios de análise de indústrias químicas e farmacêuticas, em áreas médicas e em muitos outros campos da ciência (Maldaner e Jardim, 2009) ela tem-se afirmado como uma técnica altamente vantajosa na quantificação de diversos compostos, em diferentes matrizes (Pereira, 2008).

O desenvolvimento da cromatografia líquida tem sido direcionada à necessidade de análises mais rápidas, porém sem o comprometimento do desempenho cromatográfico. Para isso, a redução do tamanho das partículas da fase estacionária e das colunas foi a alternativa mais atrativa (Maldaner e Jardim, 2009). Segundo Knox, partículas pequenas induzem um aumento da eficiência, da velocidade ótima da fase móvel e da transferência de massa. Entretanto, os avanços em relação ao comprimento das partículas ficaram limitados por um período por causa da elevada pressão resultante desta concomitante redução, que não é compatível com os sistemas cromatográficos convencionais (Maldaner e Jardim, 2009).

A Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência (UHPLC) é o avanço mais recente das técnicas de separação. Esta técnica baseia-se nos mesmos princípios da cromatografia



líquida de alta eficiência e é capaz de utilizar fases estacionárias com partículas menores que 2µm. O primeiro equipamento comercial capaz de operar em pressões acima de 100 MPa (15000 psi) foi desenvolvida pela Waters Corporation e denominada de *Acquity Ultra Performance Liquid Chromatography System* (UPLC) (Maldaner e Jardim, 2009).

Com o atual sistema de UHPLC, o tempo de análise pode ser nove vezes em comparação com HPLC. Assim, um tempo de ciclo de 30 minutos é reduzido para menos de quatro minutos, ao passo que mantêm equivalente a eficiência e a resolução. Isto prova que o UHPLC é útil para melhorar o processamento de grande número de amostras, para proporcionar um menor tempo de análise e agilizar o desenvolvimento de métodos analíticos. Outras vantagens de UHPLC incluem uma maior sensibilidade, devido ao perfil mais nítido do pico, e reduzido consumo de solvente devido aos tempos de ciclo mais curtos. Esta última vantagem tem aumentado em importância quando os preços globais para acetonitrila, um dos mais comuns componentes da fase móvel, dispararam. Reduções de consumo de solvente superiores a 80% são frequentemente conseguidas por UHPLC (Baughman, 2011).

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 MCM-41**

O carreador mesoporoso de silicato foi produzido com caulinita lixiviada pelo laboratório de Catálise e Oleoquímica da Universidade Federal do Pará, coordenado pelo Dr. Carlos Emmerson F. da Costa. Para a síntese do MCM-41 foi utilizado o caulim proveniente da região amazônica como fonte de silício e alumínio, a síntese foi realizada em auto-clave de teflon por 48 h a 110°C. A adsorção de ibuprofeno no material MCM-41 ocorreu por tratamento hidrotermal r com hexano ocasionando redução da área superficial específica, do volume e do diâmetro de poros, mas mantendo o mesmo parâmetro de célula unitária. Todos os experimentos realizados posteriormente foram realizados com material com adsorção de 16% em massa.

### **4.2 ACESSÓRIOS, CONSUMÍVEIS.**

- Balões volumétricos da marca SATELIT® A HS 542 de 5 e 10 mL com precisão de  $\pm 0,02$ : para preparo das soluções.
- Pipetas da marca HTL®, todas calibradas, com precisão de 0,006 para a de 10 - 100  $\mu\text{L}$ ; 0,01 para a de 20 – 200  $\mu\text{L}$  e 0,046 para a de 100 – 1000  $\mu\text{L}$ : para o preparo de soluções.
- Colunas para Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência: Waters C18 HSS (1,8  $\mu\text{m}$ , 100 x 2,1 mm).
- Cartuchos com fase estacionária C18 da Phenomenex® Strata C18-E com 50 mg de fase estacionária por 1 mL de volume: para o tratamento das amostras de plasma.
- Ibuprofeno adquirido pela Merk com grau de pureza de 98 %.

#### 4.3 EQUIPAMENTOS.

- Freezer a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do Neuroquímica Molecular e Comportamental (LNMC) – Instituto de Ciências Biológicas – UFPA: para congelamento e conservação de amostras de plasma e padrões.
- Sistema de ultra performance Acquity UPLC da empresa Waters (Milford-MA) configurado com uma bomba binária (Acquity BSMTM), auto injetor com engenharia com loop fixo (Acquity SMTM), compartimento para até 4 colunas em paralelo com aquecimento e resfriamento (Acquity CMTM) e detecção por arranjo de diodos (Acquity PDATM). Todos os dados foram coletados com o software Empower da empresa Waters (Milford-MA).
- Sistema de alta eficiência LC-10 da empresa Shimadzu configurado com uma bomba binária (LC-10AD), auto injetor com engenharia de loop fixo (Sil-

20AHT) detecção por arranjo de diodos (SPD-M20A) e controladora (CBM-20A). Todos os dados foram coletados com o software LC-Solution da empresa Shimadzu.

- Balança analítica SARTORIUS ® BP 210 S com precisão de 0,0001 g: para pesagem dos extratos e padrões.

#### 4.4 METODOLOGIA

##### 4.4.1 Obtenção do plasma

As amostras de plasma de camundongo foram cedidas pelo Laboratório de Neuroinflamação - Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Pará (Belém) sob a coordenação da Profa. Dora. Gilmara Bastos.

##### 4.4.2 Preparo das amostras

O método escolhido para o pré-tratamento das amostras biológicas foi o de extração por fase sólida (SPE). Para tanto o plasma foi descongelado a temperatura ambiente. Depois, uma alíquota de 120 µL foi retirada e a esta foram adicionados 30 µL da solução de ibuprofeno em metanol e 350 µL de uma solução de 5 % ácido fórmico em água. A mistura foi aplicada em cartucho de C18 previamente condicionado com 1 mL de metanol e 1 mL de água. Posteriormente, a limpeza foi feita com a eluição de 500 µL de uma solução de 2 % ácido fórmico em água. Por fim, o material de interesse foi coletado depois que dois volumes de 250 µL de metanol foram adicionados ao cartucho. Posteriormente o metanol foi evaporado com auxílio de um secador.

Para injeção ao UHPLC a amostra foi ressuspensa com 300 µL de uma solução de MeCN:H<sub>2</sub>O (60:40 v/v) com pH ajustado para aproximadamente 2,6 usando ácido fórmico.

## 4.4 METODOLOGIA

### 4.4.1 Obtenção do plasma

As amostras de plasmas foram cedidas pelo Laboratório de Neuroinflamação – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Pará (Belém) sob a coordenação da Pra. Dra. Gilmara Bastos.

### 4.4.2 Preparo das amostras

O método escolhido para o pré-tratamento das amostras biológicas foi de extração por fase sólida (SPE). Para tanto o plasma foi descongelado a temperatura ambiente. Depois, uma alíquota de 120 µg/mL foi retirada e a esta foram adicionados 30 µL da solução de ibuprofeno em MeOH e 350 µL de uma solução aquosa de 5 % de ácido fórmico. A mistura foi aplicada em cartucho de C18 previamente condicionado com 1 mL de MeOH e 1 mL de H<sub>2</sub>O. Posteriormente, a limpeza foi feita com eluição de 500 µL de uma solução aquosa de 2 % de ácido fórmico. Por fim, o material de interesse foi coletado depois da eluição de dois volumes de 250 µL de MeOH. Subsequentemente, o MeOH presente no material foi evaporado e a amostra seca foi ressuspenida com 300 µL de uma solução de MeCN:H<sub>2</sub>O (60:40 v/v) com pH ajustado para 2,6 com ácido fórmico.

### 4.4.3 Método Cromatográfico

O método cromatográfico foi composto por um volume de injeção de amostra de 10 µL, fase móvel sob vazão de 0,6 mL/min, sendo constituída MeCN:H<sub>2</sub>O (60:40 v/v) com pH ajustado para aproximadamente 2,6 usando ácido fórmico, e fase estacionária composta por C18 (1,8 µm, 100 x 2,1 mm) e para o monitoramento da análise foi empregado um

comprimento de onda de 220 nm.

#### 4.4.4 Validação do método

Durante o processo de validação foram utilizadas amostras/branco fortificadas com soluções de ibuprofeno em MeOH. A validação do método foi realizada conforme os parâmetros estabelecidos pela ANVISA e ICH, especificidade, linearidade, intervalo, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, estabilidade.

No que diz respeito à sensibilidade, foram determinados o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ). O LD foi estabelecido por meio da análise de plasmas acrescidos de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do fármaco, até o menor nível detectável. Seguiu-se a recomendação que o LD de a 3 vezes superior ao ruído da linha de base. O LQ foi estabelecido por meio da análise em triplicata de amostras contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis, ou seja CV no máximo de 20%.

Depois disto, foi avaliada a especificidade do método através da análise amostras de plasma obtidas de seis camundongos, sob condições controladas referentes ao tempo e alimentação. Cada amostra branco foi testada utilizando o procedimento e as condições cromatográficas propostas, com um tempo de análise de 15 min (mais que o triplo do tempo de análise do método) para verificar se algum interferente estaria retido na coluna podendo comprometer as análises subsequentes.

Para a avaliação da linearidade do método foi construída uma curva de calibração com sete níveis de concentração: 3, 6, 12, 24, 48 e 96 µg/mL. O experimento foi realizado em triplicata e a precisão e a exatidão de cada nível foram calculadas, assim como o  $r^2$  da curva.

A determinação do intervalo do método foi feita com base na análise do plasma de um indivíduo coletado 30 minutos após a administração oral do fármaco ao animal, já que de acordo com a literatura o pico plasmático em camundongos do ibuprofeno se dá 30 minutos

após a ingestão.

Para avaliar a precisão, exatidão e a recuperação do método, assim como a estabilidade do padrão em solução e nas amostras, foram estabelecidas as concentrações das soluções do controle de qualidade (CQ). Sendo que, a solução controle de qualidade de baixa concentração (CQB) pode ser menor ou igual 3 x LIQ, enquanto que a de alta concentração pode ser de 75 a 90% da maior concentração da curva de calibração, e a de média concentração (CQM): aproximadamente a média entre CQB e CQA (ANVISA, 2003). Neste trabalho as concentrações empregadas para o controle de qualidade foram 4,5, 45 e 72 µg/mL.

O teste da recuperação foi realizado comparando-se os resultados analíticos de amostras extraídas a partir de três concentrações, baixa, média e alta, com os resultados obtidos a partir de soluções padrão não extraídas, que representam 100% de recuperação. O cálculo da recuperação foi feito em função da relação entre as áreas do padrão extraído e não extraído.

A precisão e exatidão do método foram determinadas pela avaliação em quintuplicata de amostras em três níveis de concentração: 4,5, 45 e 72 µg/mL. Para a precisão e a exatidão intradia foi verificada a concordância dos resultados em um curto período, as amostras foram analisadas de manhã, à tarde e à noite. Para a precisão e a exatidão interdica foi avaliada a concordância dos resultados obtidos por análises feitas em dois dias alternados.

O estudo da estabilidade do padrão em fluido biológico começou pelo teste da estabilidade do fármaco após três ciclos de congelamento e descongelamento, utilizando cinco amostras das concentrações baixa e alta determinadas na validação do método analítico, nas seguintes condições: as amostras foram congeladas à temperatura de -20 °C por 20 horas, sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas à temperatura de -20 °C, por 18h e repetiu-se o processo. Contemplados os três ciclos, quantificou-se o ibuprofeno nas amostras após o terceiro ciclo. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém-preparadas.

Para verificação da estabilidade de curta duração utilizou-se cinco amostras das concentrações baixa e alta determinadas na validação do método analítico. Cada uma delas permaneceu à temperatura ambiente por 5 horas e foram analisadas. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém-preparadas.

Para verificação da estabilidade de longa duração utilizou-se cinco amostras das concentrações baixa (CQB) e alta (CQA) determinadas na validação do método analítico. Estas foram, assim que preparadas, analisadas e posteriormente armazenadas a -5 °C por um período de 15 dias. As concentrações de todas as amostras para avaliação da estabilidade foram comparadas com a média dos valores anteriormente calculados para as amostras do primeiro dia do teste.

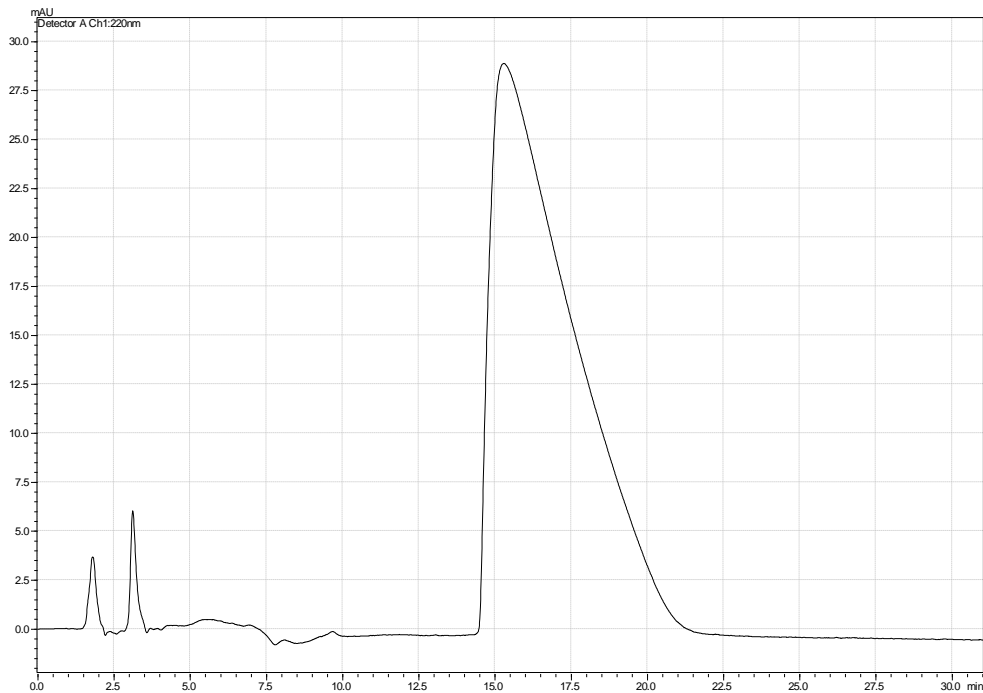
A estabilidade do ibuprofeno em solução foi avaliada comparando os resultados das análises feitas com as soluções de 1000 µg/mL e 45 µg/mL recém-preparadas com as análises das mesmas feitas após o armazenamento em -5 °C por um período de duas semanas para a solução de 1000 µg/mL, e de trinta e quatro dias para a solução de 45 µg/mL do fármaco.

## **5 RESULTADO E DISCUSSÃO**

### **5.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DO MÉTODO ANALÍTICO**

O desenvolvimento do método analítico foi iniciado com a avaliação das melhores condições cromatográficas para analisar o ibuprofeno. Para tanto, foram testados diferentes condições analisando ibuprofeno em solução MeOH a uma concentração de 100 µg/mL.

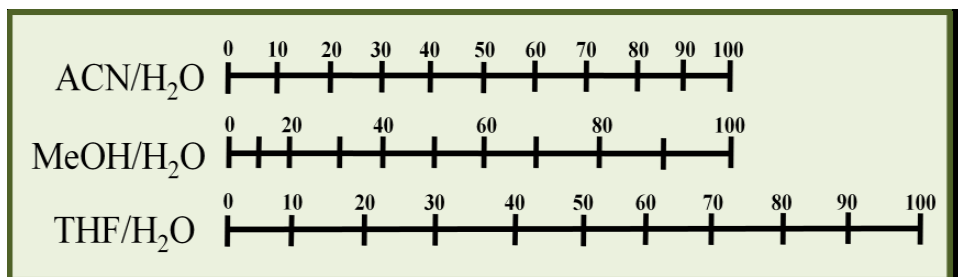
A primeira condição cromatográfica testada era composta de uma fase móvel constituída de MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30 v/v) com uma vazão de 1 mL/min, e como fase estacionária C18 (5 µm, 4,6 x 150 mm). O cromatógrafo utilizado foi Shimadzu LC-10. O monitoramento da análise ocorreu sob varredura de 200 a 400 nm. E o volume de injeção foi de 20 µL. O resultado desta análise está expresso no cromatograma abaixo (Figura 6):



**Figura 5:** Cromatograma obtido por análise de 20  $\mu\text{L}$  de 100  $\mu\text{g/mL}$  de ibuprofeno em solução de MeOH, empregando MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30 v/v) como fase móvel com uma vazão de 1 mL/min, e como fase estacionária uma coluna C18 (5  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 150 mm). Monitoramento sob varredura de 200 a 400 nm.

Esta análise possibilitou determinar o melhor comprimento de onda para analisar ibuprofeno no UV, 220 nm. Entretanto, havia nitidamente assimetria da banda cromatográfica.

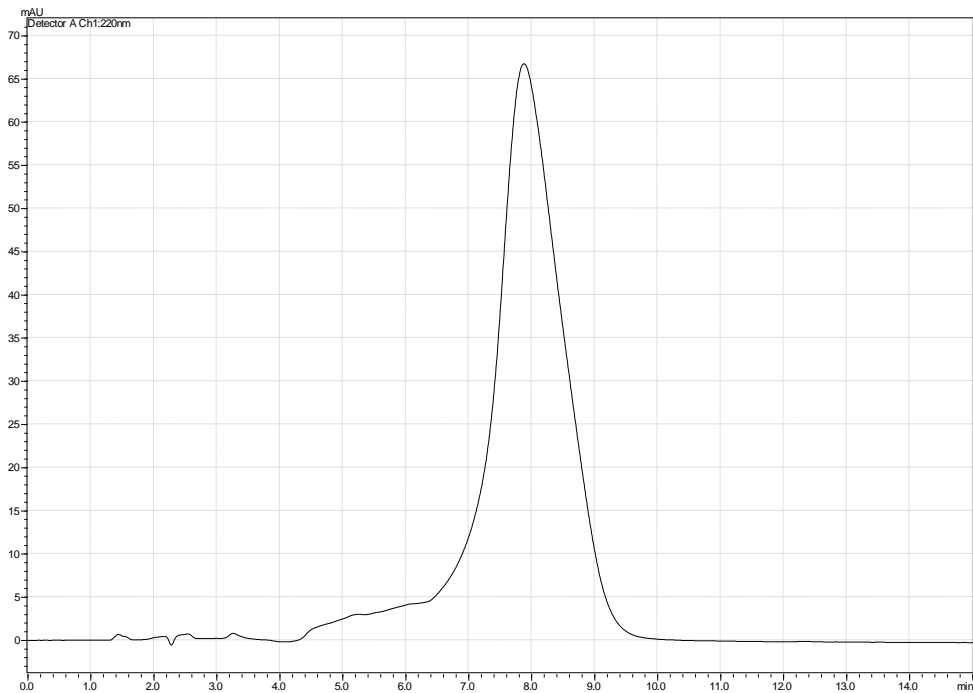
De acordo com Cass 2002 a assimetria do pico deve ser contornada quando esta é muito acentuada, pois, a mesma pode comprometer a resolução cromatográfica. Com isso, na busca de suavizar este problema a fase móvel foi substituída para MeCN:H<sub>2</sub>O (60:40 v/v) com o auxílio do nomógrafo das seletividade em fase reversa proposta por Snyder (1997) (Figura 7):



**Figura 6:** Nomógrafo da seletividade em fase reversa proposto por Snyder (1997).

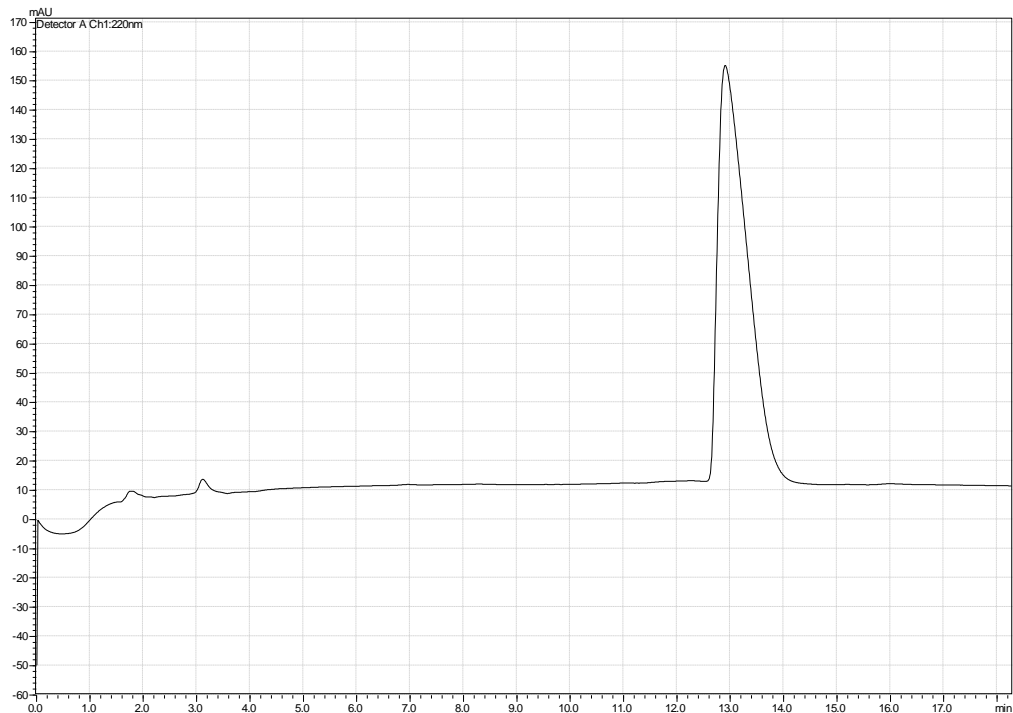


Assim obteve-se o cromatograma a seguir (figura 8):



**Figura 7:** Cromatograma obtido por análise de 20  $\mu\text{L}$  de 100  $\mu\text{g/mL}$  de ibuprofeno em solução de MeOH, empregando MeCN:H<sub>2</sub>O (60:40 v/v) como fase móvel com uma vazão de 1 mL/min, e como fase estacionária uma coluna C18 (5  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 150 mm). Monitoramento sob 220 nm.

Como a assimetria persistiu foi decidido acidificar a fase móvel MeOH/H<sub>2</sub>O 70%, pois, sendo o ibuprofeno um ácido, por mais fraco que seja, ele facilmente pode se ionizar na fase móvel, o que explicaria a assimetria, portanto como o meio ácido coibiria a ionização do ibuprofeno conseqüentemente diminuiria a assimetria do pico cromatográfico. Com isso tanto a água quanto o metanol foram acidificados ao pH 5 usando ácido fórmico. O resultado é expresso no cromatograma a seguir:



**Figura 8:** Cromatograma obtido por análise de 20  $\mu\text{L}$  de 100  $\mu\text{g/mL}$  de ibuprofeno em solução de MeOH, empregando MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30 v/v) com pH ajustado para 5 com ácido fórmico, como fase móvel com uma vazão de 1 mL/min, e como fase estacionária uma coluna C18 (5  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 150 mm). Monitoramento sob 220 nm.

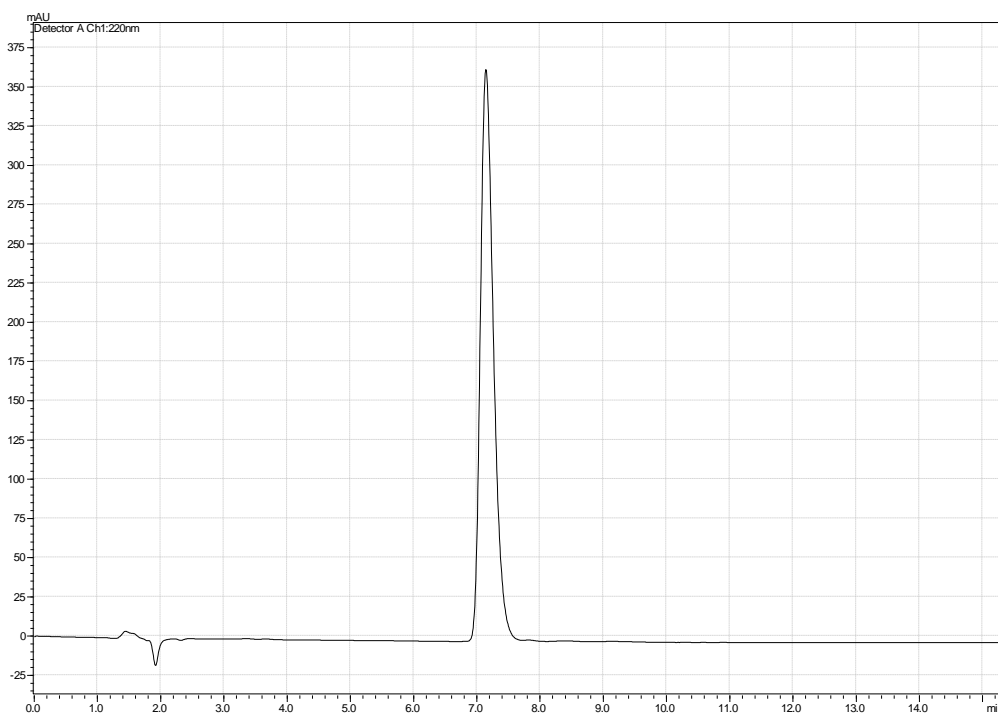
A melhora foi nítida, mas ainda se fazia necessário uma otimização, pois, a assimetria persistia como pode ser observada pelo fator de assimetria:

$$As = \frac{0,6}{0,3} = 2$$

Então, usando como base o método desenvolvido por Henry Farrar em 2002 foi testado a fase móvel MeCN:H<sub>2</sub>O (60:40 v/v), com pH ajustado para 2,6 com ácido fórmico. Nestas condições o problema de assimetria foi corrigido, como mostra o cálculo a baixo.

$$As = \frac{0,2}{0,2} = 1$$

O resultado da análise está expresso no cromatograma a seguir.



**Figura 5:** Cromatograma obtido por análise de 20  $\mu\text{L}$  de 100  $\mu\text{g/mL}$  de ibuprofeno em solução de MeOH, empregando MeCN:H<sub>2</sub>O (60:40 v/v) com pH ajustado para 2,6 com ácido fórmico, como fase móvel com uma vazão de 1 mL/min, e como fase estacionária uma coluna C18 (5  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 150 mm). Monitoramento sob 220 nm.

Para calcular o fator de retenção (k) foram injetados 20  $\mu\text{L}$  de 100  $\mu\text{g/mL}$  de ibuprofeno em solução de MeOH, empregando MeCN:H<sub>2</sub>O (60:40 v/v) com pH ajustado para 2,6 com ácido fórmico, como fase móvel com uma vazão de 1 mL/min, e como fase estacionária uma coluna C18 (5  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 150 mm). Monitoramento sob 220 nm, e assim foi encontrado o  $t_M = 1,4$  min e como o  $t_R = 7,14$  o k foi encontrado:

$$K = \frac{7,14 - 1,4}{1,4} = 4,1$$

Buscando encontrar um método com menor tempo de análise possível contendo as melhores condições cromatográficas para validação, o método desenvolvido foi transferido para o UHPLC Aquity da Waters com o auxílio do programa calculador da Waters. Resultando no método com estas especificações: volume de injeção de amostra de 10 µL, fase móvel sob vazão de 0,6 mL/min, sendo constituída por MeCN:H<sub>2</sub>O (60:40 v/v) com pH ajustado para 2,6 com ácido fórmico e fase estacionária composta por C18 (1,8 mm, 100 x 2,1 mm) coluna HSS, e para o monitoramento da análise foi empregado um comprimento de onda de 220 nm.

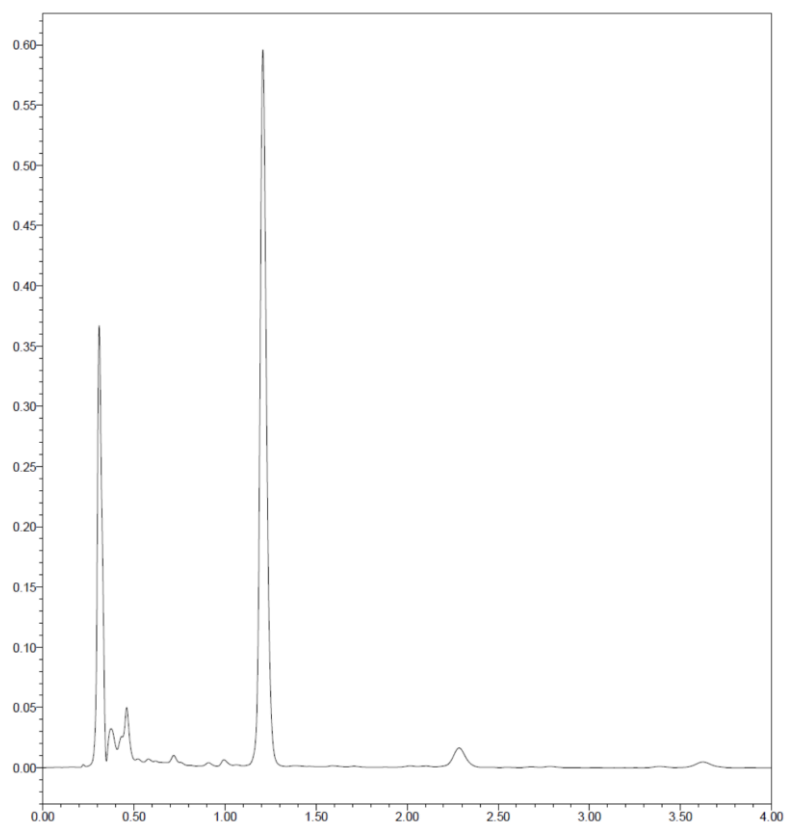
O mesmo método foi testado para amostras de ibuprofeno provenientes de plasma de camundongo, para assegurar se ele era seletivo e específico para o ibuprofeno, mesmo nas amostras de plasma de camundongo, para assegurar se ele era seletivo e específico para o ibuprofeno quando na matriz biológica. O resultado está expresso na avaliação da seletividade.

## 5.2 PROCESSO DE VALIDAÇÃO

### 5.2.1 Seletividade

O método cromatográfico desenvolvido é constituído por uma fase móvel composta por de MeCN:H<sub>2</sub>O (60:40 v/v) com pH ajustado para 2,6 com ácido fórmico, e tem como fase estacionária composta por C18 (1,8 mm, 100 x 2,1 mm) coluna HSS, e para o monitoramento da análise foi empregado um comprimento de onda de 220 nm.

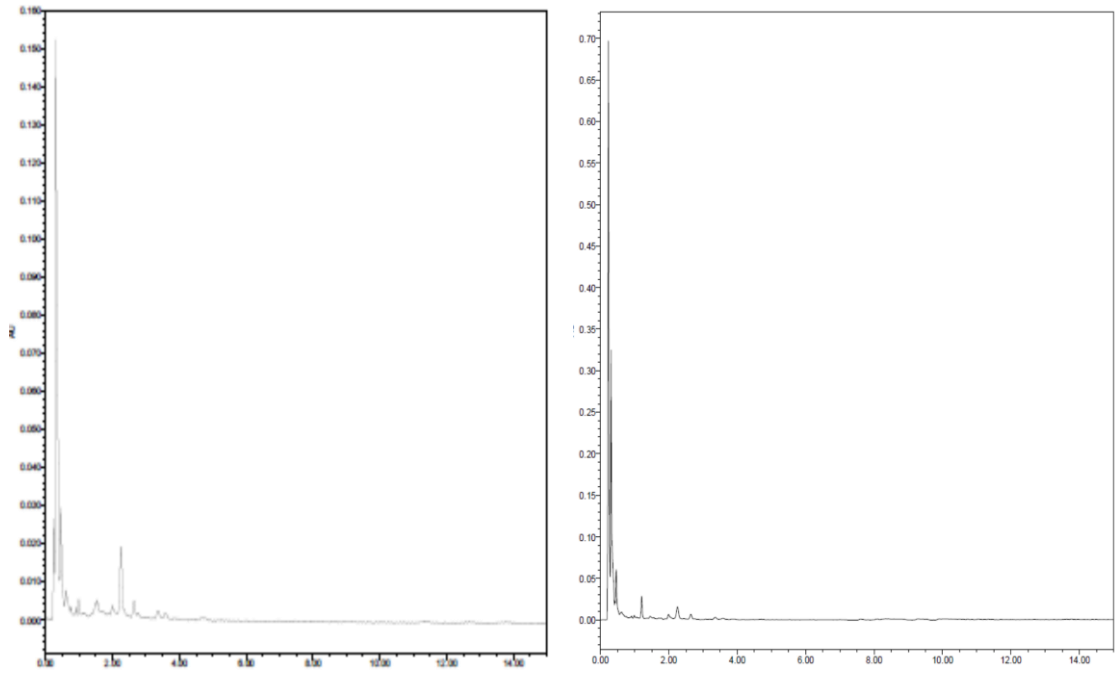
Este método demonstrou ser seletivo para o ibuprofeno como pode ser observado no cromatograma abaixo:



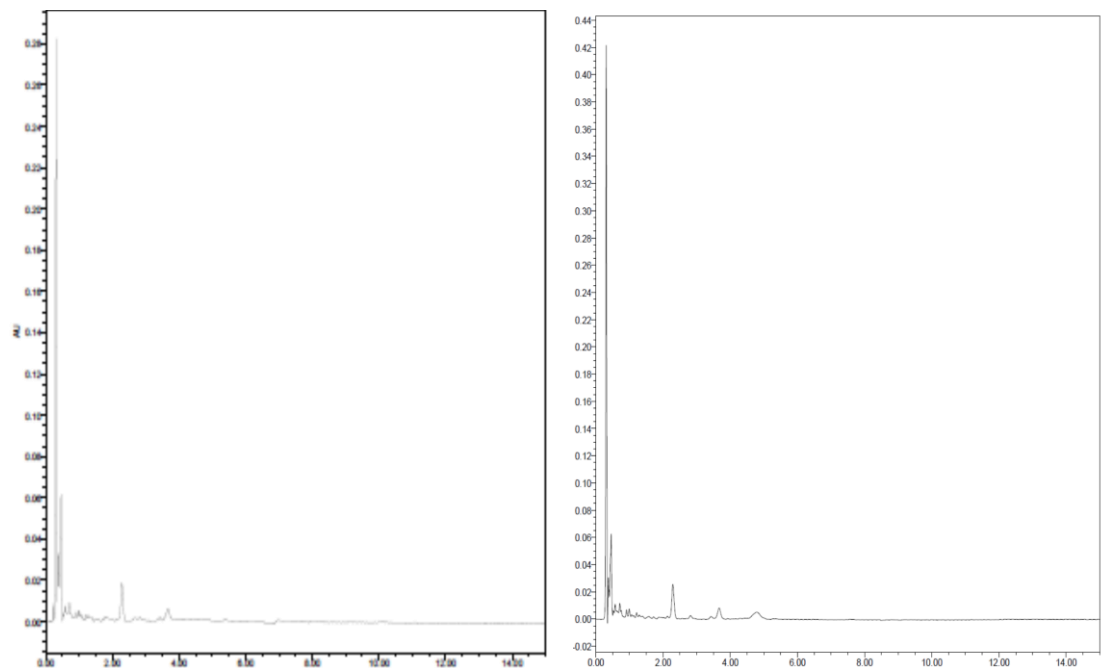
**Figura 10:** Cromatograma da análise de 10  $\mu\text{L}$  ibuprofeno obtido após pré-tratamento de amostra de plasma fortificada com ibuprofeno, fase móvel sob vazão de 0,6 mL/min, sendo constituída por MeCN:H<sub>2</sub>O (60:40 v/v) com pH ajustado para 2,6 com ácido fórmico e fase estacionária composta por C18 (1,8 mm, 100 x 2,1 mm) coluna HSS, e para o monitoramento da análise foi empregado um comprimento de onda de 220 nm.

Após o desenvolvimento do método foram validadas 6 amostras branco(plasma isento de padrão) para certificação da seletividade do método. Estas mesmas amostras foram utilizadas durante o processo de validação.

Abaixo encontram-se os cromatogramas de quatro amostras oriundas do plasma empregadas na validação do método.



**Figura 11:** Cromatogramas das análises de 10 µL ibuprofeno obtido após pré-tratamento de amostra de plasma fortificada com ibuprofeno, fase móvel sob vazão de 0,6 mL/min, sendo constituída por MeCN:H<sub>2</sub>O (60:40 v/v) com pH ajustado para 2,6 com ácido fórmico e fase estacionária composta por C18 (1,8 mm, 100 x 2,1 mm) coluna HSS, e para o monitoramento da análise foi empregado um comprimento de onda de 220 nm. Respectivamente.



**Figura 12:** Cromatogramas das análises de 10 µL ibuprofeno obtido após pré-

tratamento de amostra de plasma fortificada com ibuprofeno, fase móvel sob vazão de 0,6 mL/min, sendo constituída por MeCN:H<sub>2</sub>O (60:40 v/v) com pH ajustado para 2,6 com ácido fórmico e fase estacionária composta por C18 (1,8 mm, 100 x 2,1 mm) coluna HSS, e para o monitoramento da análise foi empregado um comprimento de onda de 220 nm. Respectivamente.

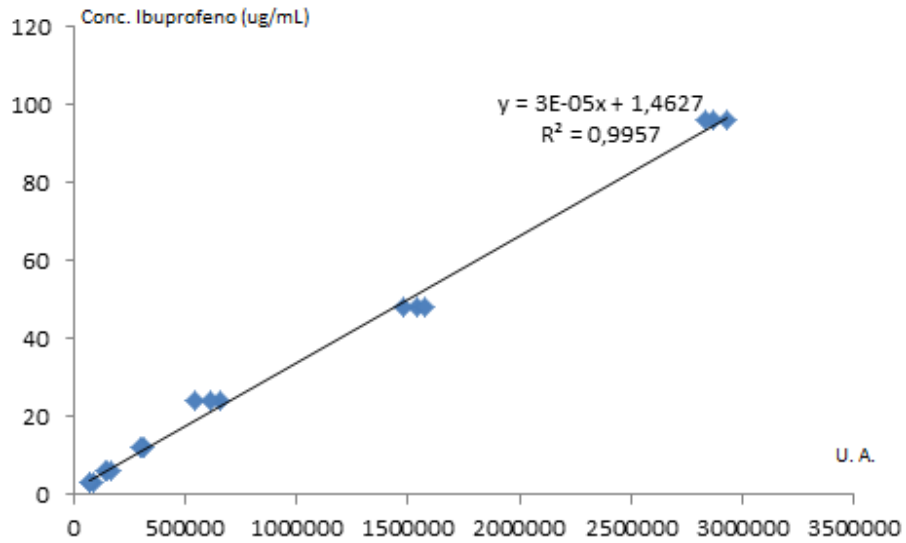
Esses cromatogramas demonstram que não há muitos interferentes, e que não existe diferença significativa dentre os plasmas de camundongo.

Dentre as seis amostras uma havia sofrido hemólise e a outra era lipídica, entretanto essas características não interferiram na matriz.

### 5.2.2 Linearidade

A curva analítica traçada para o ibuprofeno na faixa dinâmica avaliada, de 3 a 96 µg/mL, apresentou boa linearidade com coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ) igual a 0,996, atendendo o que preconiza a resolução da ANVISA RE de nº 899 ( $r^2=0,98$ ).

A equação da reta encontrada para esta curva de calibração é dada por  $y = 0,00003.X + 1,4627$ , conforme mostra a figura 6, abaixo:



**Figura 13:** Gráfico da curva analítica para o ibuprofeno

O coeficiente de variação encontrado para o LIQ (limite inferior de quantificação) foi de 9,54 %, enquanto que para os demais pontos da curva variaram entre 1,7 e 8,5%, como pode ser observado na tabela 1. A linearidade do método fica assegurada mediante o número de níveis de calibração da curva (6 pontos) e a faixa dinâmica utilizada.

Tabela 1- Exatidão e precisão de cada ponto da curva em comparação dos dados da literatura.

Pontos	CV %	Exatidão%
3	9,54	79
6	5,7	98
12	2,8	88,6
24	8,5	81,7
48	3,0	98,7
96	1,7	91,4



### 5.2.3 Sensibilidade (Limite de quantificação e Limite de detecção)

Como limite de quantificação foi estabelecido o primeiro ponto da curva (LIQ) (3µg/mL) onde o coeficiente de variação foi de 9,54% e exatidão de 79 %.

Para obtenção do limite de detecção foram adicionadas ao plasma diluições sucessivas do padrão e avaliadas pelo método desenvolvido até que a relação sinal:ruído fosse próxima de 3:1, sendo assim obteve-se um LD igual a 3µg/mL.

### 5.2.4 Precisão intradia e interdias

Para avaliar a precisão foram usadas amostras controle de qualidade em três concentrações de ibuprofeno: 4,5µg/mL (CQB), que é inferior a 3 vezes o LIQ; uma concentração média 45µg/mL (CQM) e uma concentração alta (CQA), 72µg/mL, que corresponde a aproximadamente 90% da maior concentração da curva analítica, todas preparadas por adição da solução-trabalho adequada do padrão ao plasma.

A precisão é avaliada através do valor do coeficiente de variação (CV%) que é calculado pela equação:

$$CV \% = \frac{\text{Desvio padrão} \times 100}{\text{Concentração}_{\text{média}}}$$

A precisão intradia foi avaliada injetando-se três vezes as amostras de controle de qualidade (CQB, CQM e CQA) no mesmo dia (manhã, tarde e noite) em quintuplicata, sob as mesmas condições, mesmo analista, equipamento e laboratório. A precisão interdias foi avaliada a partir de análises com as amostras de controle de qualidade (CQB, CQM e CQA),

preparadas em quintuplicata, em três lotes diferentes, em dias alternados. Os resultados da precisão intradia e precisão interdias encontram-se descritos na tabela 3 e 4, respectivamente, a seguir.

Tabela 3- Valores de CV% encontrados para determinação de precisão intradia (n=5).

<b>Concentração teórica (µg/mL)</b>	<b>Manhã (CV%)</b>	<b>Tarde (CV%)</b>	<b>Noite (CV%)</b>
<b>CQB 4,5</b>	11,3	12,8	13,3
<b>CQM 45</b>	8,1	7,2	8
<b>CQA 72</b>	5,8	7	8,3

Tabela 4- Valores de CV% encontrados para determinação de precisão interdias (n=5).

<b>Concentração teórica (µg/mL)</b>	<b>1º dia (CV%)</b>	<b>2º dia (CV%)</b>
<b>CQB 4,5</b>	11,3	6,5
<b>CQM 45</b>	8,1	5,5
<b>CQA 72</b>	5,8	2,9

### 5.2.5 Exatidão

Para determinação da exatidão do método foram utilizadas as mesmas amostras controle de qualidade CQB (4,5µg/mL), CQM (45µg/mL) e CQA (72µg/mL), também em quintuplicata.

A exatidão foi expressa através da relação percentual entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração}_{\text{experimental média}}}{\text{Concentração}_{\text{teórica}}}$$

A exatidão encontrada para as amostras controle de qualidade variaram entre 104 e 120%, conforme pode ser observado na tabela 5, sendo considerável como aceitável para métodos bioanalíticos, segundo recomendações do ICH.

Tabela 5- Valores de Exatidão% (n=5).

<i>CQ</i>	<i>CQB</i> (4,5 µg/mL)	<i>CQM</i> (45 µg/mL)	<i>CQ A</i> (72 µg/mL)	<i>N</i>	<i>N*</i>
<b>Exatidão%</b>	116,89%	94,99%	92,20%	5	≥ 3

\*Fonte: ICH Q2 (R1).

Avaliação da uniformidade do conteúdo é demonstrada na tabela abaixo. Para o ICH deve haver um mínimo entre 70 e 130 % da concentração de teste.

Tabela 6- Valores de Exatidão% (n=5).

<i>Replicatas</i>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>4,5µg/mL</b>	134,11%	117,21 %	125,13 %	101,92 %	106,58 %
<b>45µg/mL</b>	94,96 %	103,56 %	99,89 %	83,415 %	93,11 %
<b>72µg/mL</b>	82,76 %	93,959%	94,76 %	95,55 %	93,96 %

\*Fonte: ICH Q2 (R1).

### 5.2.6 Recuperação

Para o ICH a recuperação se dá em função da exatidão. Quanto a ANVISA, o teste da recuperação foi realizado comparando-se os resultados analíticos de amostras extraídas a partir de três concentrações (CQB, CQM e CQA) com os resultados obtidos com soluções padrão não extraídas, que representam 100% de recuperação. O cálculo da recuperação foi feito em função da relação de área do padrão extraído e não extraído. Os valores são demonstrados na tabela 7, a seguir

Tabela 7-Valores de recuperação para o inuprofeno em amostras de plasma de camundongo (n=5)

CQ	CQB (4,5 µg/mL)	CQM (45 µg/mL)	CQA (72 µg/mL)
	<b>78 %</b>	<b>82,22%</b>	<b>91,37%</b>

### 5.2.7 Estabilidade

A estabilidade das soluções-padrão foi avaliada por injeção da solução padrão na concentração de 45µg/mL, 8 horas após o preparo e, após estocagem por 30 dias, analisando-se seis réplicas. As soluções-padrão injetadas não mostraram sinais de degradação no período de testes.

Após preparadas, as amostras CQB e CQA foram mantidas à temperatura ambiente por 8 horas, sendo injetadas em seguida para avaliação da estabilidade de curta duração. Estas amostras também não mostraram sinal algum de degradação.

Para determinação da estabilidade de longa duração em conformidade com a ANVISA, estas amostras foram avaliadas duas semanas após o preparo. Esta análise assim como a avaliação da estabilidade de curta duração foi realizada em triplicata.

Estabilidade ciclo de congelamento/descongelamento do fármaco foi avaliada, em concordância com a ANVISA, após três ciclos de congelamento e descongelamento, utilizando-se 3 amostras das concentrações baixa e alta, nas seguintes condições: as amostras foram armazenadas à temperatura de -20 °C por 24 horas, foram então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas, as amostras foram novamente armazenadas à 20 °C, por 18 horas e, assim sucessivamente, até contemplar os três ciclos, quantificando-se o fármaco nas amostras após o terceiro ciclo. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém-preparadas e com isso constatou-se a estabilidade do fármaco.

### 5.2.8 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal.

Neste trabalho durante o desenvolvimento da metodologia, foi considerada a avaliação da robustez para constatar a susceptibilidade do método às variações nas condições analíticas, estas foram controladas e precauções foram incluídas no procedimento.

#### 5.2.9 “Efeito de memória”

Para avaliação do efeito de memória , amostras-branco de plasma foram injetadas após o último nível de calibração da curva de calibração, 96 µg/mL de ibuprofeno. Nenhuma contaminação por efeito de memória foi observado no método em estudo.

## CONCLUSÃO

- Para assegurar os resultados de um estudo farmacocinético *in vivo* é fundamental a validação de um método analítico que propicie a quantificação do fármaco de interesse..
- O método desenvolvido neste trabalho é válido de acordo com o ICH (2005), podendo ser considerado: seletivo, linear, preciso e exato.
- Adicionalmente, o ibuprofeno mostrou-se estável em solução e em amostras biológicas
- As amostras demonstraram ser estáveis após períodos de 8 horas (curta duração), e 30 dias (longa duração). E depois de ciclos de congelamento e descongelamento. Além disso, foram feitos testes quanto a estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento. Com isso o método desenvolvido foi considerado apto a ser aplicado no estudo *in vivo* da eficácia do silicato MCM-41 como carreador para o ibuprofeno.

## REFERÊNCIAS

AMBROGI, V.; FARDELLA, G.; GRANDOLINI, G.; PERIOLI, L. **Intercalation compounds of hydrotalcite-like anionic clays with anti-inflammatory agents, II: Uptake of diclofenac for a controlled release formulation.** J. Pharm. 2001, 220, 23.

BAUGHMAN, K. **HPLC (Ultra-High Pressure Liquid Chromatography) in the Analytical Chemistry Laboratory.** ©2011 Microbac Laboratories, Inc.

BAZZO, G.; MACEDO, A.; CRENCA, J.; SILVA, V.; PEREIRA, E.; ZÉTOLA, M., PEZZINI, B. **Microspheres prepared with biodegradable PHBV and PLA polymers as prolonged-release system for ibuprofen: *in vitro* drug release and *in vivo* evaluation.** Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 48, 2012.

ALGIERI, C.; DRIOLI, E.; DONATO, L. **Development of Mixed Matrix Membranes for Controlled Release of Ibuprofen.** J. Appl. Polym. Sci. 2013, DOI: 10.1002/APP.38102.

CASSIANO, N.; BARREIRO, M.; MARTINS, J. C.; OLIVEIRA, L. R. R.; CASS, Q. B. **Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas.** Quim.Nova, Vol. 32, No. 4, 1021-1030, 2009.

CUNHA, V.R.R.; FERREIRA, A. M. C.; CONSTANTINO V. R. L. **Hidróxidos duplos lamelares: nanopartículas inorgânicas para armazenamento e liberação de espécies de interesse biológico e terapêutico.** Quim.Nova, Vol. 33, No. 1, 159-171, 2010.

DONDONI, A. **Studies on the actual and potential impurities in ibuprofen.** IIFarmaco41 (1986) 237-244.

FRANCIS, R., BABY, D., KUMAR, D. **Poly(N-isopropylacrylamide) Hydrogel: Effect of Hydrophilicity on Controlled Release of Ibuprofen at Different pH.** Journal of Applied Polymer Science, Vol. 124, 5079–5088 (2012).

GOMBAR, V. K.; SILVER, I. S.; ZHAO, Z. **Role of ADME characteristics in drug discovery and their in silico evaluation: in silico screening of chemicals for their metabolic stability.** *Curr Top Med. Chem*, v. 3, n. 11, p. 1205-25, 2003.

HWANG, D.H; LEE, D; CHOE, D; LEE, S.H; LEE, K. **Functionalization of SBA-15 particles for ibuprofen. Delivery-Korean J. Chem. Eng.**, 27(4), 1087-1092 (2010) DOI: 10.1007/s11814-010-0225-4.

JULIUS, D., BASBAUM, A. **Molecular mechanisms of nociception.** *Nature*, v.413, 203-210, 2001.

KHAN, G. M. e JIABI, Z. **Studies on drug release kinetics from ibuprofen-carbomer hydrophilic matrix tablet: influence of co-excipients on the release ret of the drug.** *J. Control. Rel.* 57 (1999) 197-203.

KNOX, J. H.; SALEEM, M. **Kinetic conditions for optimum speed and resolution in column chromatography.** *J. Chromatog. Science* 1969, 7, 614 – 622.

KNOX, J.H. **Practical aspects of LC theory.** *J. Chromatog. Science* 1977, 15, 352 – 364.

LAMPRECHT, A., SAUMET, J. L., ROUX, J. e BENOIT, J. P. **Lipid nanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment.** *International Journal of Pharmaceutics* 278 (2004) 407–414.

LAMPRECHT, A., SAUMET, J. L., ROUX, J., BENOIT, J.-P. **Lipidnanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment.** *International Journal of Pharmaceutics* 278 (2004) 407–414.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. **O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência.** *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 1, 214-222, 2009.

NGUYEN, D. T. T.; GUILLARME; D.; RUDAZ; S.; VEUTHEY; J-L. **Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure.** *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 1836 – 1848.

PEREIRA, L. **Transferência de método hplc para u-hplc de maior resolução e rapidez.** *Revista Analytica* • Abril/Maio 2008 • N°34.



RIBANI, M.;BOTTOLI, C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I.; MELO, C. L. F. C. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.** Quim. Nova, Vol. 27, No. 5, 771-780, 2004.

SANCHEZ, J.; SARNAUSKAS, H.; LOPES, F. **Sistemas de Liberação controlada.** Pharmacia Brasileira - Novembro/Dezembro 2006.

Silva, S.P- Balanço Mineral Brasileiro 2001- Caulim.

SLOWING, I.I; ESCOTO, J. L.V.; WU, C.W. ; LIN, V.S.Y. **Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers.** Advanced Drug Delivery Reviews 60 (2008) 1278–1288.

Soares, C.C; Marques; T.M.;Rigolin,G.G; Neis,E; Friaça,A.M.V; Silva,A.S; Barreto,G.S; Lopes, L. **Atividade analgésica do extrato da *Pectisjangadensis* (S. Moore).** Rev.bras.farmacogn. vol.19 no.1a João Pessoa Jan./Mar. 2009.

SOUZA, K.C., MOHALLEM, N.D.S. **Nanocompósitos magnéticos: potencialidades de aplicações em biomedicina.** Quim. Nova, Vol. 34, No. 10, 1692-1703, 2011.

STAHLY, G. P. e STARRETT, R. M. - **Chirality in Industry**, A. N. Collins, ed., 1997.p: 19-38.

VERMA R. K, GARG S. **Current status of drug delivery technologies and future directions.** Pharm Technol. 2001;25(2):1-14.

XU M.J., ZOU C., CHU J.H , WU T., LIU S.J., ZHANG J., CHEN M. , LIU F. , XIONG N.N., JU W.Z., TAN H.S. **Pharmacokinetics and bioequivalence of single dose and multiple doses of immediate and extended-release formulations of dexibuprofen in healthy Chinese subjects.** International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, Vol. 49 – No. 3/2011 (237-246).

XU, Z., LI, B., TANG, W., CHEN, T., ZHANG, H. WANG, Q. **Glycopolypeptide-encapsulated Mn-doped ZnS quantum dots for drug delivery: Fabrication, characterization, and in vitro assessment.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 88 (2011) 51– 57.

ZHANG, L., FENG, Y., TIAN, H., ZHAO, M., KHAN, M., GUO, J.  
**AmphiphilicDepsipeptide-Based Block Copolymers as Nanocarriers for Controlled  
Release of Ibuprofen with Doxorubicin.** Journal of polymer science, part a: polymer  
chemistry 2013.