

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
CURSO DE FARMÁCIA

Bruna Soares Marques

**Validação de método bioanalítico para a quantificação de metabólitos séricos da
dipirona por cromatografia líquida de alta eficiência**

Florianópolis

2022

Bruna Soares Marques

**Validação de método bioanalítico para a quantificação de metabólitos séricos da
dipirona por cromatografia líquida de alta eficiência**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina TCC II do Curso de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico.

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz da Silva.

Coorientadora: Prof. Dra. Flávia Martinello

Florianópolis

2022

Ficha de identificação elaborada pela autora,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Marques, Bruna Soares

Validação de método bioanalítico para a quantificação de metabólitos séricos da dipirona por cromatografia líquida de alta eficiência / Bruna Soares Marques ; orientador, Edson Luiz da Silva, coorientador, Flávia Martinello, 2022.

56 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Metabólitos dipirona. 3. CLAE. 4. Validação bioanalítica. 5. Interferência analítica. I. Silva, Edson Luiz da. II. Martinello, Flávia. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. IV. Título.

Bruna Soares Marques

**Validação de método bioanalítico para a quantificação de metabólitos séricos da
dipirona por cromatografia líquida de alta eficiência**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do grau de Farmacêutico, e aprovado em sua forma final pelo Curso de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 04 de agosto de 2022.

Prof. Dra. Liliete Canes Souza.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Edson Luiz da Silva
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dra. Flávia Martinello
Co-orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dra. Miriam Falkenberg (Membro titular)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dra. Beatriz Garcia Mendes Borba (Membro titular)
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo apoio, especialmente aos meus amados pais, por não medirem esforços para me ver feliz, que me incentivaram em todos os momentos até aqui. À minha mãe, Alessandra, por estar sempre ao meu lado com todo seu amor, cuidado e paciência. Ao meu pai, Alexandro, por todo suporte, conselhos e puxões de orelha.

Aos professores com quem tive o prazer de conviver e me inspirar nestes anos de graduação. Em especial ao meu professor orientador Edson L. da Silva, por toda dedicação e todos os ensinamentos, e à professora Flávia Martinello, minha co-orientadora, por contribuir de forma significativa para este trabalho. Aos meus chefes queridos, Sra. Luiza Sartorato e Sr. Pedro Sartorato, por todo carinho e confiança, que foram fundamentais para meu crescimento profissional.

Às minhas amigas que tornaram estes anos mais leves e memoráveis. À Vitória, carinhosamente tratada como “Vi”, minha “*roomie*” e dupla de vida, por todos os momentos compartilhados felizes ou difíceis. E àqueles que sempre se fizeram presentes, Duda, Hanna, Jaque, João, Kelly, Maria, Robson, Thais, Victória, Virgínia e Yasmim.

À Universidade Federal de Santa Catarina por me acolher e me proporcionar estrutura e ensino de qualidade. E, por fim, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização desse sonho, meu muito obrigada!

RESUMO

Introdução - No Brasil, a dipirona é um dos medicamentos mais usados para o alívio da dor e da febre, devido ao fácil acesso e baixo custo. A dipirona é considerada um pró-fármaco, visto que logo após a sua ingestão ela é hidrolisada no trato gastrointestinal e dá origem a diferentes metabólitos ativos, sendo os principais a 4-metil-amino-antipirina (4-MAA), a 4-amino-antipirina (4-AA), a 4-acetil-amino-antipirina (4-AAA) e a 4-formil-amino-antipirina (4-FAA). Além dos efeitos farmacológicos esperados, os metabólitos da dipirona também interferem em vários ensaios analíticos de parâmetros bioquímicos séricos *in vitro*. Para apoiar o estudo de interferência dos metabólitos da dipirona em exames laboratoriais de nosso grupo, é necessário um método bioanalítico capaz de medir os metabólitos no soro e, assim, estabelecer eventuais associações entre a interferência *in vitro* e a concentração dos metabólitos encontrada *in vivo*, após a ingestão de dipirona. **Objetivos** - Validar um método descrito na literatura, com algumas modificações, para a identificação e quantificação dos metabólitos da dipirona em soro humano por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Métodos** - Amostras de soro adicionadas dos metabólitos foram extraídas com clorofórmio e hidróxido de sódio. As condições de análise foram: coluna C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm) ODS-Tosoh (Japão); fase móvel acetato de sódio 50 mM (pH = 6,2): acetonitrila (86:14 v/v) em modo isocrático; fluxo de 1,25 mL/min; e detecção em 257 nm. Os parâmetros de validação avaliados foram seletividade, linearidade, efeito matriz, precisão, exatidão, limites de detecção e de quantificação e estabilidade. **Resultados** - O método escolhido se mostrou seletivo e com linearidade adequada ($r > 0,99$) para todos os metabólitos. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) atenderam às necessidades, de acordo com as concentrações encontradas após a ingestão de 1 g de dipirona na literatura científica, exceto para o metabólito 4-AA. A matriz soro não interferiu na quantificação dos metabólitos 4-AAA e 4-FAA, entretanto, para os metabólitos 4-AA e 4-MAA houve efeito matriz. O método foi exato para todos os metabólitos. Todavia, precisão adequada foi encontrada apenas para os metabólitos 4-AAA e 4-FAA. Para a quantificação dos metabólitos 4-AA e 4-MAA no soro, deverá ser usado o método de padrão interno. As amostras de soro não se mostraram estáveis para análise em dias subsequentes à coleta de sangue, sendo necessária, assim, a sua imediata quantificação. **Conclusão** - O método bioanalítico se mostrou válido para quantificar os metabólitos da dipirona em soro humano. No entanto, alguns ajustes são necessários para um melhor desempenho, particularmente em relação à imprecisão e estabilidade.

Palavras-chaves: dipirona, metabólitos, validação bioanalítica, CLAE, interferência analítica.

ABSTRACT

Introduction - In Brazil, dipyrone is one of the most used drugs for pain and fever, due to its easy access and low cost. Dipyrone is considered a prodrug, since after its ingestion it is hydrolyzed in the gastrointestinal tract and gives rise to different plasma active metabolites. The most important are 4-methyl-amino-antipyrine (4-MAA), 4-amino-antipyrine (4-AA), 4-acetyl-amino-antipyrine (4-AAA) and 4-formyl-amino-antipyrine (4-FAA). In addition to the expected pharmacological effects, dipyrone metabolites also interfere in various analytical assays of *in vitro* serum biochemical parameters. To support the investigation of the interference of dipyrone metabolites in laboratory tests performed by our group, a bioanalytical method capable of measuring metabolites in serum is needed to establish eventual associations between *in vitro* interferences and *in vivo* serum metabolites concentration after dipyrone intake. **Objective** - To validate a published method for identifying and quantifying metabolites in human serum by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** - Serum samples spiked with metabolites were extracted with chloroform and sodium hydroxide. The analysis conditions were: column C18 (250 x 4.6 mm; 5 μ m) ODS-Tosoh (Japan); mobile phase 50 mM sodium acetate (pH = 6.2): acetonitrile (86:14 v/v) in isocratic mode; flow rate of 1.25 mL/min; and detection at 257 nm. The validation parameters herein evaluated were selectivity, linearity, matrix effect, precision and accuracy, limits of detection and quantification, and stability. **Results** - The chosen method proved to be selective and with adequate linearity ($r > 0.99$) for all metabolites. Limits of detection (LD) and quantification (LQ) were coherent to published concentrations found after ingestion of 1g dipyrone, except for the metabolite 4-AA. The serum matrix did not interfere in the quantification of 4-AAA and 4-FAA metabolites, however, for 4-AA and 4-MAA metabolites there was effect of serum matrix. Accuracy was found for all metabolites. However, only quantification of 4-AAA and 4-FAA metabolites was precise, for the quantification of 4-AAA and 4-FAA metabolites in serum, the internal standard method must be used. Serum samples were not stable for analysis in the days following blood collection, requiring, therefore, immediate measurement of metabolites. **Conclusion** - The bioanalytical method was validated to quantify dipyrone metabolites in human serum; however, some modifications are necessary for a better performance, particularly regarding imprecision and stability.

Keywords: dipyrone, metabolites, bioanalytical validation, HPLC, analytical interference.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Via metabólica da dipirona em seres humanos | 14 |
| Figura 2 – Processo de uma validação analítica | 18 |
| Figura 3 – Etapas da metodologia de análise. | 22 |
| Figura 4 – Cromatograma representativo dos metabólitos da dipirona em soro..... | 31 |
| Figura 5 – Cromatogramas obtidos pela injeção de: (A) branco, (B) metabólitos (50 µg/mL) e PI (20 µg/mL) em solvente e (C) metabólitos (50 µg/mL) e PI (20 µg/mL) em soro | 32 |
| Figura 6 – Espectros de Absorção UV-Vis dos metabólitos da dipirona na amostra de soro (linha preta) e em água (linha rosa) em CLAE..... | 33 |
| Figura 7 – Linearidade das curvas-padrão dos metabólitos da dipirona em soro, suas respectivas equações lineares e coeficientes de correlação (r) | 34 |
| Figura 8 – Análise dos resíduos obtidos a partir das curvas de regressão linear..... | 36 |
| Figura 9 – Curvas-padrão preparadas com os metabólitos em soro (coloridas) e em água (cinzas)..... | 38 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1 – Principais estudos da interferência da dipirona e seus metabólitos em testes bioquímicos | 17 |
| Quadro 2 – Métodos de CLAE usados para quantificação dos metabólitos da dipirona | 29 |
| Quadro 3 – Resumo dos resultados para a validação do método | 47 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Tempo para alcançar a concentração plasmática máxima (t_{max}) de cada metabólito após a ingestão de diferentes doses de dipirona | 15 |
| Tabela 2 – Equações da reta em soro obtidas para os metabólitos da dipirona..... | 35 |
| Tabela 3 – Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do método para quantificação dos metabólitos da dipirona em soro | 37 |
| Tabela 4 – Teste F e teste t de Student para análise do efeito matriz com base no coeficiente angular | 39 |
| Tabela 5 – Coeficientes angulares das curvas-padrão preparadas em água e em soro..... | 39 |
| Tabela 6 – Precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão (recuperação) do método para a quantificação dos metabólitos da dipirona..... | 42 |
| Tabela 7 – Estabilidade dos metabólitos da dipirona em soro após 15 e 30 dias de armazenamento em diferentes temperaturas..... | 43 |
| Tabela 8 – Estabilidade dos metabólitos da dipirona em soro em 5 dias de armazenamento em diferentes temperaturas..... | 45 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------------|--|
| 4-AA | 4-Amino-antipirina |
| 4-AAA | 4-Acetil-amino-antipirina |
| 4-FAA | 4-Formil-amino-antipirina |
| 4-MAA | 4-Metil-amino-antipirina |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| C_{max} | Concentração máxima |
| CEPSH | Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos |
| CLAE | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| CV | Coefficiente de variação |
| DPR | Desvio padrão relativo |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| ICTQ | Instituto de Ciência Tecnologia e Qualidade |
| PI | Padrão interno |
| RDC | Resolução da Diretoria Colegiada |
| SQR | Substância química de referência |
| TCLE | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido |
| T_{max} | Tempo para alcançar a concentração plasmática máxima |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 1. | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2. | OBJETIVOS | 20 |
| 2.1 | OBJETIVOS GERAL | 20 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 20 |
| 2. | MATERIAIS E MÉTODOS | 21 |
| 3.1 | BUSCA NA LITERATURA | 21 |
| 3.2 | REAGENTES | 21 |
| 3.3 | EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS | 21 |
| 3.4 | AMOSTRAS | 21 |
| 3.5 | METODOLOGIA | 22 |
| 3.6 | VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA BIOANALÍTICA | 23 |
| 3.6.1 | Seletividade | 23 |
| 3.6.2 | Linearidade na matriz soro | 23 |
| 3.6.3 | Limite de Detecção e de Quantificação | 24 |
| 3.6.4 | Efeito matriz | 25 |
| 3.6.5 | Precisão | 25 |
| 3.6.6 | Exatidão | 26 |
| 3.6.7 | Estabilidade dos metabólitos na amostra | 26 |
| 3.7 | ASPECTOS ÉTICOS DO ESTUDO..... | 27 |
| 4. | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 28 |
| 4.1 | ESCOLHA DO MÉTODO BIOANALÍTICO | 28 |
| 4.2 | VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA BIOANALÍTICA | 31 |
| 4.2.1 | Seletividade | 31 |
| 4.2.2 | Linearidade na matriz soro | 34 |
| 4.2.3 | Limite de Detecção e de Quantificação | 36 |
| 4.2.4 | Efeito matriz | 37 |
| 4.2.5 | Precisão e Exatidão | 40 |
| 4.2.6 | Estabilidade dos metabólitos na amostra | 43 |
| 5. | LIMITAÇÕES E PONTOS FORTES | 46 |
| 6. | CONCLUSÃO | 47 |
| | REFERÊNCIAS | 49 |
| | APÊNDICE 1 | 53 |

1. INTRODUÇÃO

A dipirona é um dos medicamentos amplamente usados para o tratamento da dor e da febre (JASIECKA; MASLANKA; JAROSZEWSKI, 2014; GUIMARÃES *et al.*, 2021). No Brasil, isso ocorre tanto na forma de prescrições por profissionais clínicos/de saúde, como também - e, talvez, principalmente - por meio da automedicação.

A automedicação é o uso de medicamentos sem prescrição realizada por um profissional capacitado no início ou no decorrer do tratamento (BVS, 2012). Essa prática vem crescendo com o passar dos anos e tornou-se comum na sociedade, devido principalmente às propagandas de medicamentos isentos de prescrição e à facilidade de acesso aos mesmos (SILVA *et al.*, 2013; SILVA, SANTOS, MARQUES, 2020).

O Instituto de Ciência Tecnologia e Qualidade (ICTQ) realizou uma pesquisa sobre automedicação no Brasil em 2018, envolvendo 2.090 pessoas de todas as regiões do país em 120 municípios. Constatou-se que 79% dos indivíduos admitiam tomar medicamentos sem prescrição, sendo essa porcentagem maior que nos anos anteriores. Os medicamentos mais consumidos por conta própria foram analgésicos, anti-inflamatórios, relaxantes musculares e antitérmicos (ICTQ, 2018).

No estudo realizado por Pizzol *et al.* (2019), que buscava estimar a prevalência do uso de analgésicos no Brasil, os autores observaram que um em cada cinco brasileiros usou algum analgésico, especialmente analgésicos não opioides, para gerenciar problemas agudos de saúde, como condições dolorosas. Os medicamentos mais utilizados foram dipirona (37,8%), paracetamol (25,3%) e diclofenaco (10,7%) (PIZZOL *et al.*, 2019).

A dipirona (ou metamizol – Denominação Comum Internacional, DCI) é classificada como um analgésico não opioide com propriedades antipiréticas e espasmolíticas adicionais (BACHMANN, 2021). Seu mecanismo de ação parece estar baseado na inibição enzimática da ciclooxigenase (COX), predominantemente do tipo 2 (COX-2), e na inibição da síntese das prostaglandinas E1 e E2. No entanto, o mecanismo exato não está claramente descrito e alguns estudos têm relatado resultados controversos (COLLARES; TRONCON, 2019).

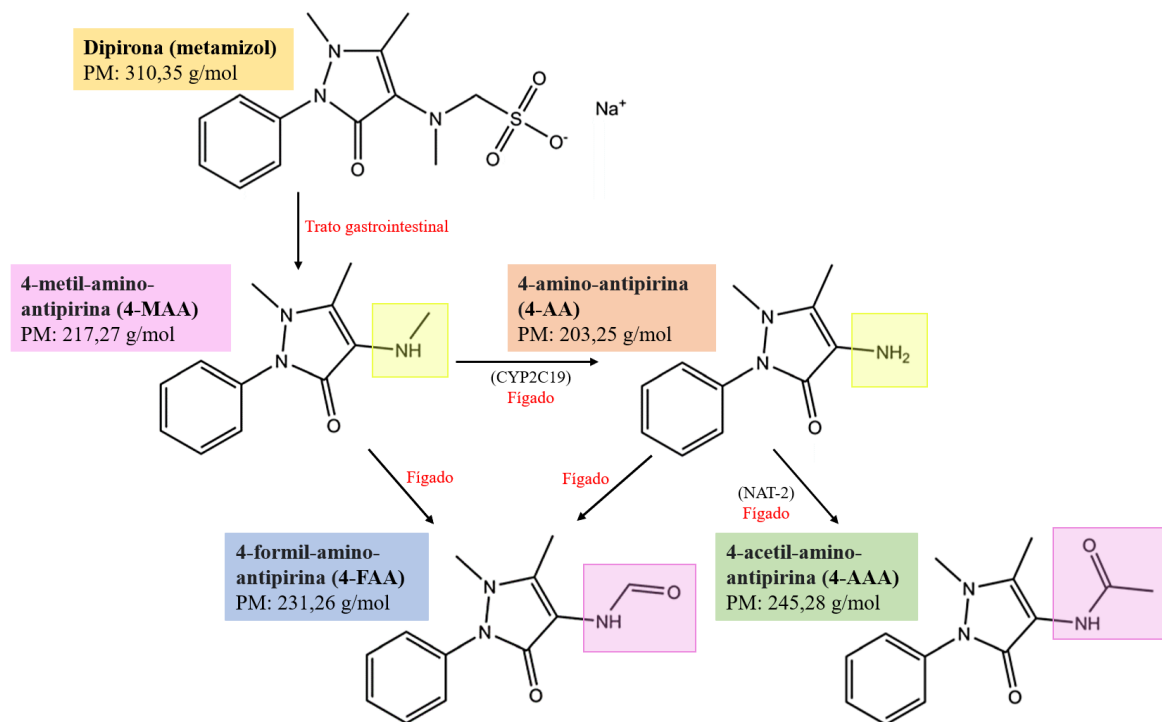
Em comparação com outros analgésicos não opioides, a dipirona possui um perfil de segurança favorável em relação aos efeitos adversos gastrointestinais, hepáticos e renais (LAPORTE *et al.*, 2004; ZAPATER *et al.*, 2015). Embora seja amplamente utilizada terapêuticamente em alguns países, o seu uso foi proibido ou restrito em outros países devido

às suas possíveis, porém raras, reações indesejáveis e perigosas, como a agranulocitose (HAMERSCHLAK *et al.*, 2005; STAMMSCHULTE *et al.*, 2015).

A literatura acerca dessa temática polêmica possui estudos controversos e metodologias enviesadas, tendo em vista os conflitos de interesse da época em que foram realizados (GUIMARÃES *et al.*, 2021). Além disto, alguns fatores genéticos têm sido incluídos na predisposição a alterações hematológicas por dipirona (HAMERSCHLAK *et al.*, 2005; FERREIRA, 2010).

Após administração oral, a dipirona é espontaneamente hidrolisada no trato gastrointestinal em 4-metil-amino-antipirina (4-MAA) e, dessa forma, é considerada um pró-fármaco (BACHMANN, 2021). O metabólito 4-MAA é rapidamente e quase completamente absorvido, sendo sua biodisponibilidade de 85% quando ingerido na forma de comprimido (MILJKOVIC *et al.*, 2018). No fígado, a maior parte do metabólito biologicamente ativo (4-MAA) é oxidado em 4-formil-amino-antipirina (4-FAA) ou desmetilado em 4-amino-antipirina (4-AA), que depois é acetilado em 4-acetil-aminoantipirina (4-AAA) (Figura 1).

Figura 1 – Via metabólica da dipirona em seres humanos.



Fonte: Adaptado de ZIESENITZ *et al.*, 2019.

Abreviaturas: CYP2C19: citocromo P450 (CYP) 2C19; NAT-2: N-acetiltransferase 2.

Outros metabólitos foram igualmente descritos, mas esses quatro metabólitos principais refletem cerca de 70% da dose administrada. Os dois metabólitos 4-MAA e 4-AA

exibem efeitos analgésico e antitérmico, enquanto os metabólitos finais 4-AAA e 4-FAA são considerados inativos (VLAHOV *et al.*, 1990; ZIESENITZ *et al.*, 2019; BACHMANN, 2021). Quando comparados estruturalmente é possível observar que os metabólitos ativos possuem a função orgânica amina destacado na Figura 1 em amarelo, enquanto 4-AAA e 4-FAA possuem a função amida destacado em rosa.

De acordo com Nikolova *et al.* (2012), a dipirona enquanto composto original não é detectável no soro, sendo possível quantificar apenas os seus metabólitos. Com base nos resultados de diferentes estudos, a dose do medicamento administrada alterou a concentração máxima (C_{max}) dos metabólitos no plasma (LEVY *et al.*, 1984; VLAHOV *et al.*, 1990). Levy *et al.* (1984) avaliaram a ingestão de 1000 mg, enquanto Vlahov *et al.* (1990) estudaram as doses de 750, 1500 e 3000 mg de dipirona nos parâmetros farmacocinéticos dos quatro principais metabólitos. O metabólito 4-MAA foi o primeiro a alcançar a C_{max} no plasma, seguido pelo 4-AA, 4-FAA e 4-AAA, como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Tempo para alcançar a concentração plasmática máxima (t_{max}) de cada metabólito após a ingestão de diferentes doses de dipirona.

| Dose de dipirona | 750 mg | 1000 mg | 1500 mg | 3000 mg |
|------------------|-------------------|---------|---------|---------|
| Metabólito | t_{max} (horas) | | | |
| 4-MAA | 1,37 | 1,4 | 1,73 | 2,00 |
| 4-AA | 3,43 | 5,0 | 4,60 | 6,87 |
| 4-FAA | 6,53 | 7,2 | 8,00 | 8,93 |
| 4-AAA | 11,1 | 13,2 | 13,1 | 17,9 |

Fonte: Adaptado de Levy *et al.* (1984) e Vlahov *et al.* (1990).

Abreviaturas: 4-MAA: 4-metil-amino-antipirina; 4-AA: 4-amino-antipirina; 4-FAA: 4-formil-amino-antipirina; 4-AAA: 4-acetil-amino-antipirina.

A maior parte da dose administrada de dipirona foi excretada pelos rins na forma dos metabólitos 4-AAA (aprox. 50%), 4-FAA (aprox. 25%), 4-AA (aprox. 15%) e 4-MAA (aprox. 10%) (NIKOLOVA *et al.*, 2012).

Os efeitos benéficos da dipirona, por meio dos seus metabólitos ativos, são amplamente confirmados pela comunidade científica para o tratamento da dor aguda e crônica (CHAPARRO *et al.*, 2012; JASIECKA; MASLANKA; JAROSZEWSKI, 2014; REIST *et al.*, 2018). Entretanto, os metabólitos da dipirona também provocam reações indesejáveis como

interferentes analíticos nas reações para as medidas laboratoriais de parâmetros bioquímicos séricos, os quais são utilizados no diagnóstico e monitoramento de inúmeras doenças.

Primeiramente, com base nos resultados de estudos *in vitro* (adição do fármaco em amostras de plasma) a dipirona interferiu nas reações dos parâmetros bioquímicos séricos ácido láctico, ácido úrico, transaminases, colesterol, creatina quinase, ureia, creatinina, lactato desidrogenase, triglicerídeos e sódio (GASCÓN et al, 1993; JUNIOR; SCHUTZ, 2008; LUNA-ZÁIZAR et al, 2015). Além disto, dentre os quatro principais metabólitos da dipirona, somente a 4-metil-amino-antipirina (4-MAA) interferiu na determinação da creatinina sérica (BAGNOUD, REYMOND, 1993) (Quadro 1).

Recentemente, um estudo do nosso grupo avaliou a interferência *in vitro* dos metabólitos da dipirona 4-MAA, 4-AA, 4-FAA e 4-AAA em determinações de uma série de parâmetros bioquímicos séricos. Para isso, *pools* de soro foram preparados na ausência e na presença de concentrações terapêuticas, subterapêuticas e supraterapêuticas dos metabólitos da dipirona e, em seguida, os parâmetros bioquímicos foram analisados. O metabólito 4-MAA interferiu negativa e significativamente nos testes de ácido úrico, glicose, colesterol total e triglicerídeos, enquanto aumentou a concentração de cálcio (falso positivo ou interferência positiva) (ANDRIOLI, 2021). Dessa forma, para estabelecer se há correlação entre a interferência nos ensaios bioquímicos observada *in vitro* e a concentração dos metabólitos *in vivo*, há necessidade da quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos metabólitos nas amostras de soro.

Para tanto, existem inúmeras metodologias descritas na literatura para a medida por CLAE de metabólitos plasmáticos da dipirona (ZYLBER-KATZ *et al.*, 1984; DAMM, 1989; CARRETERO; VADILLO; LASERNA, 1995; AGUNDEZ; BENÍTEZ, 1996; ERGUN; FRATARELLI; ARANDA, 2004; HINZ *et al.*, 2007; OJHA; RATHOD; PADH, 2009; DOMÍNGUES-RAMÍREZ *et al.*, 2012; AGUIAR *et al.*, 2013; GIORGI *et al.*, 2015; BACHMANN *et al.*, 2020; YILMAZ *et al.*, 2021). Contudo, antes do uso, o método analítico eleito deve ser padronizado e validado no laboratório, o que, eventualmente, pode envolver modificações na metodologia.

A validação de uma metodologia é um conjunto de técnicas realizadas para assegurar a confiabilidade e credibilidade do método empregado. Entende-se como método bioanalítico aquele que utiliza matriz biológica. No Brasil, a validação bioanalítica é normatizada pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166 de 2017, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos

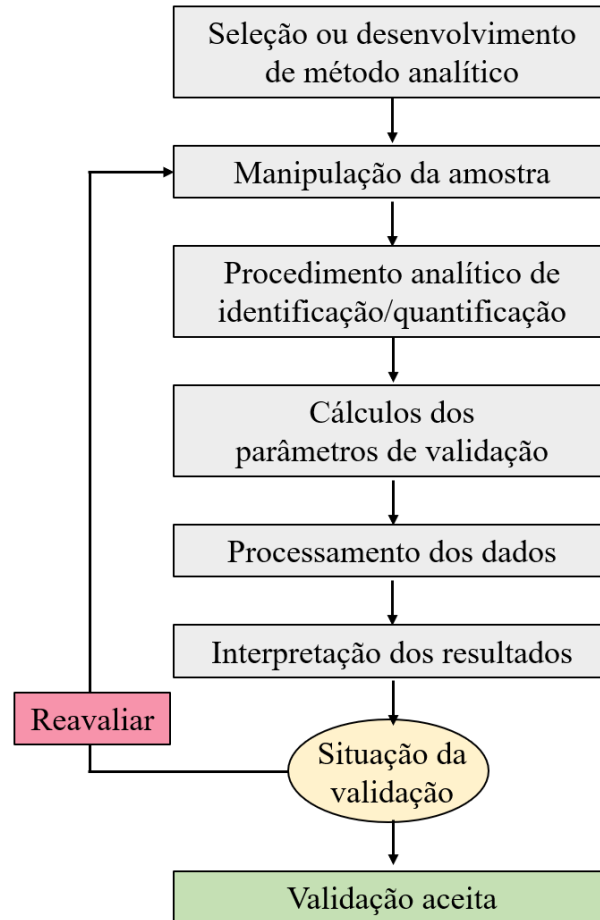
Quadro 1 – Principais estudos da interferência da dipirona e seus metabólitos em testes bioquímicos.

| Publicação | Objetivo | Tipo de estudo | Interferente de interesse | Principais resultados |
|----------------------------------|---|-----------------|--|--|
| GASCÓN <i>et al.</i> (1993) | Estudar o efeito <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> da dipirona na determinação de vários testes bioquímicos. | <i>In vitro</i> | Dipirona | Observou-se interferência negativa significativa da dipirona para a creatinina, ácido úrico, triglicerídeos, colesterol, creatina quinase, transaminases, ureia e lactato desidrogenase. |
| | | <i>In vivo</i> | Dipirona | Encontrou-se diferenças significativas entre os percentuais de concentração no tempo 0 e após a administração do medicamento (diferentes tempos) para creatina quinase, creatinina, ácido úrico, desidrogenase láctica, triglicerídeos e colesterol. Além disso, foi vista uma correlação negativa entre as concentrações de dipirona no sangue e as porcentagens das concentrações do analito, com diferentes níveis de significância. |
| BAGNOUD; REYMOND (1993) | Investigar o efeito dos principais metabólitos da dipirona em dois métodos enzimáticos para quantificar a creatinina. | <i>In vivo</i> | Dipirona e seus principais metabólitos (MAA, FAA, AAA e AA). | O metabólito metil-amino-antipirina causou interferência negativa e significativa na determinação enzimática de creatinina em amostras de soro pelo sistema de química seca Kodak Ektachem. A interferência foi clinicamente relevante nas faixas de concentração de normal e baixa de creatinina, sendo que o verdadeiro valor foi subestimado em 25% a 75%. |
| LUNA-ZÁIZAR <i>et al.</i> (2015) | Investigar os efeitos <i>in vitro</i> de três fármacos (paracetamol, ácido acetilsalicílico e dipirona) em medições séricas de glicose, ureia e creatinina. | <i>In vitro</i> | Dipirona | Observou-se uma interferência positiva da dipirona (em todas as doses) na determinação da creatinina pelo método de Jaffé, e também uma interferência negativa em doses terapêuticas e tóxicas de dipirona ao usar um sistema de química seca enzimática/DT60-II. |
| ANDRIOLI (2021) | Avaliar a interferência <i>in vitro</i> dos metabólitos da dipirona MAA, FAA, AAA e AA nas determinações de alguns dos parâmetros bioquímicos séricos. | <i>In vitro</i> | Metabólitos da dipirona (MAA, FAA, AAA e AA) | Observou-se interferência <i>in vitro</i> do metabólito MAA em concentração semelhante àquela obtida por ingestão de dose terapêutica de dipirona nos ensaios analíticos ácido úrico, cálcio, triglicerídeos e glicose, enquanto interferência no colesterol total foi verificada apenas em concentrações supraterapêuticas. Nos parâmetros determinados pela metodologia de Trinder, a interferência negativa correlacionou-se com a concentração de MAA. |

bioanalíticos (BRASIL, 2017). O processo de uma validação analítica compreende algumas etapas (Figura 2).

Em geral, os parâmetros que devem ser avaliados na validação bioanalítica são: seletividade, linearidade, precisão, efeito matriz, exatidão, estabilidade, limites de detecção e de quantificação (CASSIANO *et al.*, 2009; BRASIL, 2017).

Figura 2 – Processo de uma validação analítica.



Fonte: Adaptado de JBM ANALÍTICA. Qual a importância da Validação de um Método Analítico? 2020. Disponível em: < <https://br.linkedin.com/in/jbm-analitica>>. Acesso em: 13 jun. 2022.

A seletividade avalia se o método permite identificar um analito entre um número restrito de interferentes numa mistura complexa (BRASIL, 2017). Linearidade é a capacidade que um método tem em obter resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito. A precisão avalia a dispersão dos resultados obtidos em ensaios independentes repetidos com a mesma amostra e pode ser avaliada de três formas: repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermediária (BRASIL, 2012). A precisão intermediária, expressa em porcentagem, também é conhecida por coeficiente de variação (CV).

A reprodutibilidade é aplicável em estudos colaborativos ou na padronização de métodos analíticos para inclusão desses em compêndios oficiais, mediante testes estatísticos adequados (BRASIL, 2017). Visto que a reprodutibilidade é verificada por uma análise interlaboratorial, essa não foi abordada neste estudo.

O limite de detecção (LD) corresponde à menor concentração do analito que é diferenciada do zero ou do ruído de fundo, enquanto o limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser avaliada/medida, com uma determinada precisão e exatidão (MARTINS, 2016).

A exatidão é a semelhança dos resultados obtidos pelo método em estudo comparando com o valor original, usando um processo experimental para uma única amostra por várias vezes. Efeito matriz ocorre quando substâncias presentes na matriz biológica interferem na quantificação do analito (CASSIANO *et al.*, 2009).

Na literatura científica, os parâmetros de validação citados são descritos em diferentes estudos que usam metodologias de análise dos metabólitos da dipirona por CLAE (ZYLBERKATZ *et al.*, 1984; CARRETERO; VADILLO; LASERNA, 1995; AGUNDEZ; BENÍTEZ, 1996; OJHA; RATHOD; PADH, 2009; DOMINGUEZ-RAMIREZ *et al.*, 2012; AGUIAR *et al.*, 2013; BACHMANN *et al.*, 2020; YILMAZ *et al.*, 2021).

Nesse contexto, para investigar a interferência analítica da dipirona e seus metabólitos em exames laboratoriais é necessário, primeiramente, eleger, padronizar e validar um método bioanalítico para identificar e quantificar os metabólitos da dipirona no soro de seres humanos. Assim, o método validado poderá auxiliar em estudos futuros de interferência do medicamento nas medidas de parâmetros bioquímicos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Selecionar e validar um método analítico para a determinação dos metabólitos da dipirona sódica monoidratada em soro através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Pesquisar os métodos publicados na literatura, eleger ou adaptar um método analítico para a determinação sérica dos metabólitos da dipirona e selecionar um para validação;

b) Padronizar o método de extração e de análise dos metabólitos no soro;

c) Validar a metodologia eleita, por meio da avaliação da seletividade, da linearidade, do efeito matriz, da precisão, da exatidão, do limite de detecção, do limite de quantificação e da estabilidade.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 BUSCA NA LITERATURA

Foram avaliados os artigos disponíveis na base de dados PubMed e Google Scholar até março de 2022, utilizando as seguintes palavras-chaves, separadamente ou em combinação: “dipirona” (metamizol), “metabólitos dipirona”, “CLAE” e “validação analítica” e as correspondentes em inglês. As listas de referências de todas as publicações identificadas foram examinadas para encontrar artigos relevantes.

3.2 REAGENTES

Os padrões analíticos certificados usados, 4-MAA (95,0% pureza), 4-AA (97,0% pureza), 4-AAA (98,5% pureza) e 4-FAA (99,0% pureza), e a antipirina como padrão interno (PI) foram adquiridos da Sigma-Aldrich®. Os reagentes usados foram: acetonitrila (grau CLAE), acetato de sódio, clorofórmio (grau CLAE) e hidróxido de sódio.

3.3 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

As análises por CLAE foram realizadas em equipamento com injetor manual, conectado ao degaseificador DGU 20A5 com integrador CBM 20A, detector ultravioleta-visível (UV-Vis) e arranjo de diodos (DAD) SPDM-20A, bomba LC-20AD, controlado pelo software LC Solution 1.2 (Schimadzu, Kyoto, Japão).

3.4 AMOSTRAS

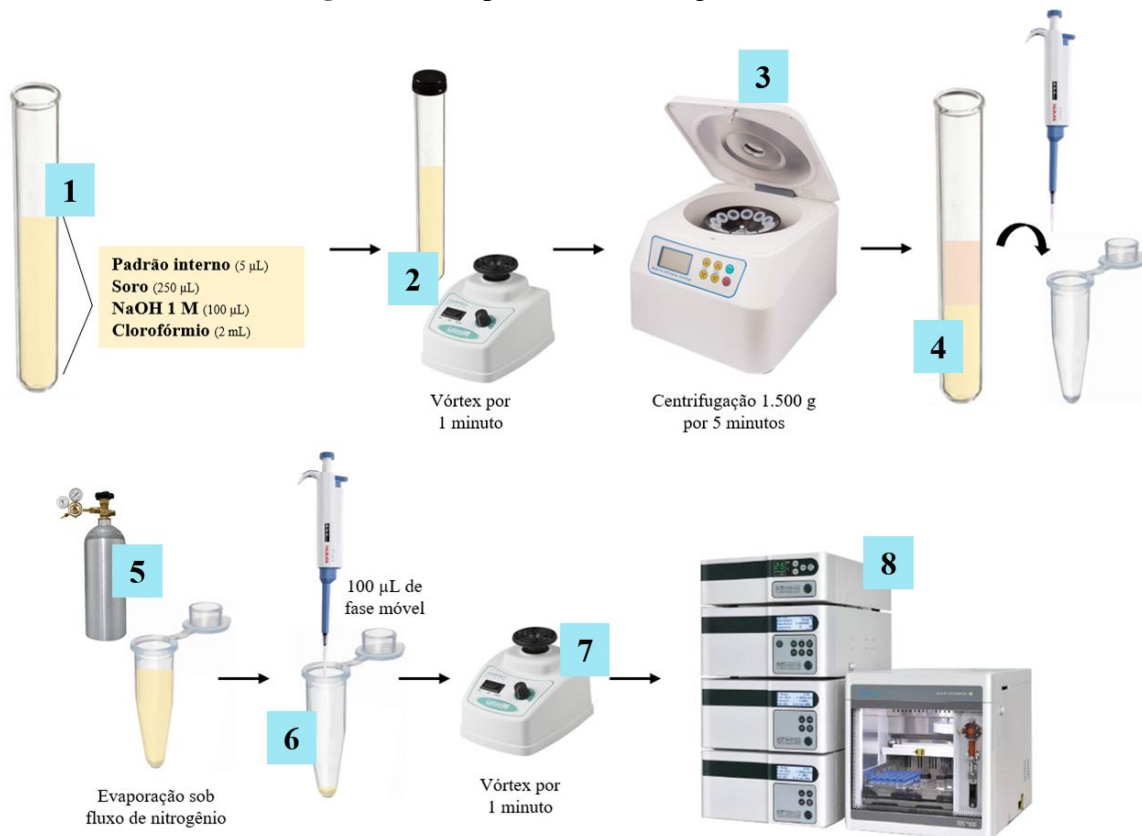
Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Apêndice 1), o sangue foi coletado de oito indivíduos (seis mulheres), com idade entre 20 e 26 anos, não tabagistas, sem ingestão de qualquer medicamento e sem nenhuma desordem ou doença aparente e/ou diagnosticada. O soro foi obtido de cada indivíduo após centrifugação do sangue e, em seguida, os soros foram misturados para a formação do *pool*.

3.5 METODOLOGIA

A análise dos metabólitos da dipirona em soro foi realizada através da detecção por CLAE, após extração dos metabólitos no soro por meio da adição de hidróxido de sódio e clorofórmio conforme descrito por Hinz *et al.* (2007) (Figura 3). Alíquotas de 250 μL de soro foram misturadas com 5 μL de PI (antipirina 1 mg/mL), 100 μL de hidróxido de sódio 1 M e 2 mL de clorofórmio. A mistura foi homogeneizada em agitador tipo vórtex por 1 min e posterior centrifugação (1.500 g por 5 min, temperatura ambiente).

Após a separação das fases, 1 mL da fase orgânica (inferior) foi transferido para microtubo e evaporada sob fluxo suave de nitrogênio à temperatura ambiente. Por fim, o resíduo foi dissolvido em 100 μL de fase móvel, homogeneizado no vórtex e uma alíquota foi injetada na coluna cromatográfica de fase reversa TSK-gel ODS-80Ts (Tosoh) (C18, L \times LD. 15 cm \times 4.6 mm, 5 μm tamanho de partícula) e detector com feixe de diodo UV-Vis. A fase móvel utilizada foi acetato de sódio 50 mM (pH 6,2):acetonitrila (86:14, v/v) com fluxo de 1,25 mL/min e a detecção ocorreu na região UV em 257 nm (HINZ *et al.*, 2007). As modificações na metodologia estão descritas na seção Resultados e Discussão.

Figura 3 – Etapas da metodologia de análise.



Fonte: Elaborado pela autora.

3.6 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA BIOANALÍTICA

Os parâmetros analíticos das etapas de validação da identificação e quantificação dos metabólitos da dipirona foram realizados conforme descrito pela *Food and Drug Administration* em *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry* (FDA, 2018), e na Resolução nº 166/2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que abordam a validação de métodos analíticos.

3.6.1 Seletividade

A verificação da seletividade do procedimento analítico foi realizada a partir da comparação entre os sinais (resposta instrumental) advindos do processamento da matriz (BRASIL, 2017), ou seja, da diferença do sinal cromatográfico obtido após a adição dos quatro metabólitos da dipirona, 4-MAA, 4-AA, 4-FAA e 4-AAA, em soro isento de metabólitos e dos metabólitos puros em água. Para tanto, 100 µL de cada metabólito (1 mg/mL) da dipirona foi adicionado em soro a fim de obter concentração final de 50 µg/mL. Concentração igual dos metabólitos em água foi injetada na coluna cromatográfica.

A seletividade do método foi avaliada por meio da identificação dos metabólitos na amostra por comparação entre os tempos de retenção e espectro de absorção ultravioleta (190 a 800 nm) dos picos obtidos no soro e dos picos dos metabólitos em água. A ausência de picos interferentes nos tempos de retenção dos metabólitos foi parâmetro de aceitação da seletividade.

3.6.2 Linearidade do método na matriz soro

Três curvas analíticas de calibração, dos quatro metabólitos da dipirona em soro, foram preparadas com diferentes concentrações adicionadas de PI (conc. final 20 µg/mL). De acordo com a FDA, devem-se utilizar, no mínimo, seis concentrações diferentes da substância química de referência (SQR) (FDA, 2018). Assim, foi usada uma mistura de soro isento de metabólitos da dipirona (checado previamente pela análise em CLAE, conforme descrição acima) e 1 mg de cada metabólito em pó foi adicionado em quatro alíquotas de 1,0 mL de soro (conc. final 1 mg/mL de cada metabólito). Essas alíquotas de soro foram diluídas 1:10 e a partir daí diluições seriadas foram feitas usando o *pool* de soro isento de metabólitos como

diluyente, para a obtenção de curvas com as seguintes concentrações: 3,125, 6,25, 12,5, 25,0, 50,0 e 100,0 µg/mL. Em seguida, alíquotas de cada mistura de soro contendo os metabólitos com as concentrações descritas acima foram usadas para a extração e quantificação por CLAE. Cada curva de calibração foi preparada de maneira independente e em triplicata, visando avaliar os erros intrínsecos à preparação das amostras e ao cromatógrafo.

Conforme a RDC 166/17, para avaliação da linearidade foram apresentados os seguintes dados:

- I. Representação gráfica das respostas em função da concentração;
- II. Gráfico de dispersão dos resíduos, equação da reta de regressão linear, estimada pelo método dos mínimos quadrados;
- III. Avaliação da associação linear por meio do coeficiente de correlação (r) e de determinação (r²); e
- IV. Avaliação da significância estatística do coeficiente angular, onde foi considerado o nível de significância de 95% (p < 0,05).

3.6.3 Limites de Detecção e de Quantificação

Para cada metabólito, o limite de detecção (LD) foi verificado pela análise de sete determinações (ou medidas) do branco da amostra (soro isento de metabólitos da dipirona) e calculado pela fórmula (BRASIL, 2017):

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{IC}$$

Onde σ é o desvio padrão das medidas do branco de sete amostras de soro diferentes (sem metabólitos) e IC é a inclinação da curva de calibração de cada metabólito.

O limite de quantificação (LQ) foi estabelecido pelo sinal 10 vezes maior que o desvio padrão do sinal da linha de base obtido para cada concentração dos quatro metabólitos da dipirona em soro, sendo calculado pela seguinte fórmula (ICH, 2005):

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{IC}$$

3.6.4 Efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas separadamente com os quatro metabólitos (padrões) da dipirona em água e metabólitos adicionados em soro, conforme descrição acima (BRASIL, 2017).

Inicialmente, o teste F foi aplicado para verificar a homogeneidade das variâncias de cada curva de regressão linear, usando as inclinações das curvas de calibração (coeficiente angular) (BRASIL, 2015). A igualdade das variâncias ocorre quando o valor de F calculado for inferior ao F crítico e a diferença quando o F calculado for superior. Em ambos os casos, o efeito matriz deve ser verificado através do teste *t* de Student, que avalia a igualdade das médias dos coeficientes angulares das curvas de regressão. No caso de variâncias iguais, o teste *t* foi aplicado considerando-se as variâncias combinadas dos parâmetros das curvas obtidas dos metabólitos em água e em soro. Por outro lado, em caso de variâncias diferentes, o teste *t* foi empregado utilizando as variâncias de cada curva separadamente (BRASIL, 2015). Assim, médias iguais dos coeficientes angulares das curvas indicam que a matriz não teve efeito na precisão do método. Entretanto, quando os parâmetros são estatisticamente diferentes, a matriz pode ter efeito na precisão do método. Foi adotado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). As diferenças entre os coeficientes angulares das curvas-padrão preparadas em solvente e em soro, em percentagem, foram definidas como tamanho do efeito matriz.

3.6.5 Precisão

Para a avaliação da precisão do método, foram realizadas as medidas de concentração de cada metabólito nas amostras de soro sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação.

A precisão, foi avaliada pela repetibilidade (variação intra-dia, $n = 3$). Assim, foram utilizadas três concentrações distintas de cada um dos quatro metabólitos da dipirona avaliados (12,5, 25,0 e 50,0 $\mu\text{g/mL}$), com três réplicas em cada nível de concentração, totalizando nove determinações. Além disto, foi determinada a precisão intermediária (inter-dias, $n = 5$), por meio da injeção na coluna cromatográfica das mesmas três amostras de soro em pelo menos cinco dias distintos. Para as medidas de concentração, foram usadas curvas-padrão dos metabólitos preparadas em soro isento de metabólitos.

A precisão foi demonstrada pela dispersão dos resultados, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR, ou coeficiente de variação (CV) da série de medições, conforme a fórmula abaixo, em que DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada.

$$DPR = \left(\frac{DP}{CMD} \right) X 100$$

De acordo com a FDA (2018), no mínimo, 67% dos resultados das replicatas de todos os níveis de concentração devem estar dentro do intervalo de variação de 15% do valor nominal.

3.6.6 Exatidão

Para a avaliação da exatidão, a porcentagem de recuperação dos analitos de interesse, metabólitos 4-MAA, 4-AA, 4-AAA e 4-FAA, foi avaliada após a adição de concentrações conhecidas nas amostras de soro isento de metabólitos. A exatidão do método foi avaliada em três concentrações e em triplicata, totalizando nove determinações, como no ensaio da precisão descrito acima (BRASIL, 2017). Em seguida, as concentrações foram medidas usando-se a curva padrão de cada metabólito preparada em soro.

A exatidão do método foi definida pela razão percentual da “concentração quantificada pela concentração teórica (ou nominal)”, correspondente à porcentagem de recuperação de cada metabólito da dipirona, conforme fórmula abaixo. Idealmente, a recuperação deveria corresponder a 100%, porém, segundo a FDA (2018), os limites de aceitação para a recuperação são de $\pm 20\%$ do valor nominal (80-120%).

$$Recuperação = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} X 100$$

3.6.7 Estabilidade dos metabólitos em amostra de soro

Os metabólitos 4-MAA, 4-AA, 4-AAA e 4-FAA dissolvidos em soro (1 mg/mL) foram adicionados a três amostras de soros obtidas de três indivíduos saudáveis em volumes suficientes para produzir concentrações nominais de 12,5, 25,0 e 50,0 $\mu\text{g/mL}$. A concentração dos metabólitos foi imediatamente quantificada e os resultados foram considerados 100%. Em

seguida, alíquotas dos soros foram armazenadas nas temperaturas de -20 °C e -80 °C, e a concentração foi novamente verificada após 15 e 30 dias. Os ensaios foram realizados em triplicata e as amostras foram consideradas estáveis quando não se observou desvio superior a 15% do valor obtido nas amostras recém-preparadas (FDA, 2018).

3.7 ASPECTOS ÉTICOS DO ESTUDO

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH – UFSC), sob o número CAAE: 33933120.8.0000.0121 e parecer: 4.141.744 (Apêndice 1). O estudo seguiu as diretrizes propostas na resolução N° 466, de 12 de dezembro de 2012. Os doadores de sangue voluntários participaram do estudo somente após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESCOLHA DO MÉTODO BIOANALÍTICO

Com base na pesquisa bibliográfica realizada, 12 métodos foram encontrados na literatura para a identificação dos metabólitos da dipirona. A escolha do método bioanalítico para a identificação e quantificação dos metabólitos foi realizada considerando-se os seguintes fatores: disponibilidade ou facilidade de compra dos reagentes no mercado brasileiro e facilidade de adaptação das condições experimentais necessárias para a execução do método no laboratório. Dessa forma, o método de Hinz *et al.* (2007) foi o escolhido e algumas modificações foram incorporadas (Quadro 2).

Visando à otimização do método de Hinz *et al.* (2007), verificou-se a necessidade de diminuir o tempo de corrida da análise, que era de até 30 min. Para isso, o fluxo da fase móvel de 1,0 mL/min foi aumentado para 1,25 mL/min. Além disto, o pH de 5,6 foi aumentado para 6,2. A concentração da fase móvel usada por Hinz *et al.* (2007), de acetato de sódio 30 mM (pH = 5,6) e acetonitrila (87:13, v/v), foi modificada para acetato de sódio 50 mM (pH = 6,2) e acetonitrila (86:14, v/v) conforme descrito por Ergun *et al.* (2004). Assim, foram obtidas análises mais rápidas, com tempo final de corrida em torno de 20 min e sem perda da eficiência de separação dos metabólitos. Os tempos de retenção obtidos foram de 4,3; 4,9; 10,0; 11,2 e 15,5 min para os compostos 4-AAA, 4-FAA, PI, 4-AA e 4-MAA, respectivamente. Por fim, Hinz *et al.* (2007) usaram coluna cromatográfica de fase reversa Nucleodur® C18 Pyramid (12,5 cm x 4,0 mm x 3 µm; Macherey-Nagel, Düren, Alemanha), enquanto a coluna de fase reversa TSK-gel ODS-Ts C18 (15 cm x 4,6 mm x 5 µm, Tosoh, Tóquio, Japão) foi usada nesse estudo.

Como pode ser observado no Quadro 2, a maioria dos métodos de preparo de amostras descritos na literatura, em que houve a identificação dos metabólitos da dipirona a partir de matrizes complexas, utilizaram técnicas de extração para recuperação do analito, principalmente líquido-líquido (ZYLBER-KATZ *et al.*, 1984; DAMM, 1989; AGUNDEZ; BENÍTEZ, 1996; HINZ *et al.*, 2007; OJHA; RATHOD; PADH, 2009; AGUIAR *et al.*, 2013; GIORGI *et al.*, 2015; BACHMANN *et al.*, 2020). Assim, optou-se pela extração com hidróxido de sódio e clorofórmio (ZYLBER-KATZ *et al.*, 1984; AGUNDEZ; BENITEZ, 1996; HINZ *et al.*, 2007). Em geral, o método adotado no presente estudo mostrou ser simples, rápido, de baixo custo, menor volume de solventes e menor investimento com equipamentos.

Quadro 2 – Métodos de CLAE usados para quantificação dos metabólitos da dipirona.

| Publicação | Método de extração | Matriz | Padrão interno | Fase móvel | Fluxo | Deteção | Fez validação? Quais parâmetros avaliou? |
|------------------------------------|--|-----------------------------|---------------------------|--|------------|-------------------------|--|
| ZYLBER-KATZ <i>et al.</i> (1984) | Extração líquido-líquido (clorofórmio e hidróxido de sódio), fase orgânica evaporada e reconstituída em metanol | Plasma humano | 4-propil-aminoantipirina | 8% metanol em acetato de sódio 0,01M, pH 3,0 | 1,6 mL/min | 257 nm | Sim Seletividade, linearidade, precisão e exatidão. |
| DAMM (1989) | Extração líquido-líquido, fase orgânica evaporada e reconstituída em fase móvel | Plasma humano, urina humana | Isopropil-aminoantipirina | — | — | 265 nm | |
| CARRETERO; VADILLO; LASERNA (1995) | Extração de fase sólida (água e metanol), fase orgânica evaporada e reconstituída em fase móvel | Plasma humano | Furosemda | SDS 0,1 M contendo 2,5% pentanol | 1,0 mL/min | 262 nm | Sim Linearidade, precisão, exatidão e limite de deteção |
| AGUNDEZ; BENÍTEZ (1996) | Extração líquido-líquido (clorofórmio e hidróxido de sódio), fase orgânica evaporada e reconstituída em fase móvel | Urina | Isopropil-aminoantipirina | Água-metanol-trietilamina-ácido acético (70,9:27,7:0,9:0,5, v/v/v/v) | 1,0 mL/min | 254 nm | Sim Seletividade, linearidade, sensibilidade e precisão |
| ERGUN; FRATTARELLI; ARANDA (2004) | Análise em matriz não biológica, por isso não tem a etapa de extração. | Solução de dipirona sódica | 4-metil-aminoantipirina | Acetato de sódio 50 mM (pH 6,2) e acetonitrila (86:14, v/v) | 1,0 mL/min | 265 nm | Não |
| HINZ <i>et al.</i> (2007) | Extração líquido-líquido (clorofórmio e hidróxido de sódio), fase orgânica evaporada e reconstituída em fase móvel | Plasma humano | Antipirina | Acetato de sódio 30 mM (pH 5,6) e acetonitrila (87:13, v/v) | 1,0 mL/min | 257 nm | Não |
| OJHA; RATHOD; PADH (2009) | Extração líquido-líquido (hidróxido de amônio e acetato de etila), fase orgânica evaporada e reconstituída em fase móvel | Plasma humano | Isopropil-antipirina | Acetonitrila e formato de amônio 2 mM (pH 3,7) (90:10, v/v) | 0,3 mL/min | Espectrômetro de massas | Sim Linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e estabilidade |

(continua)

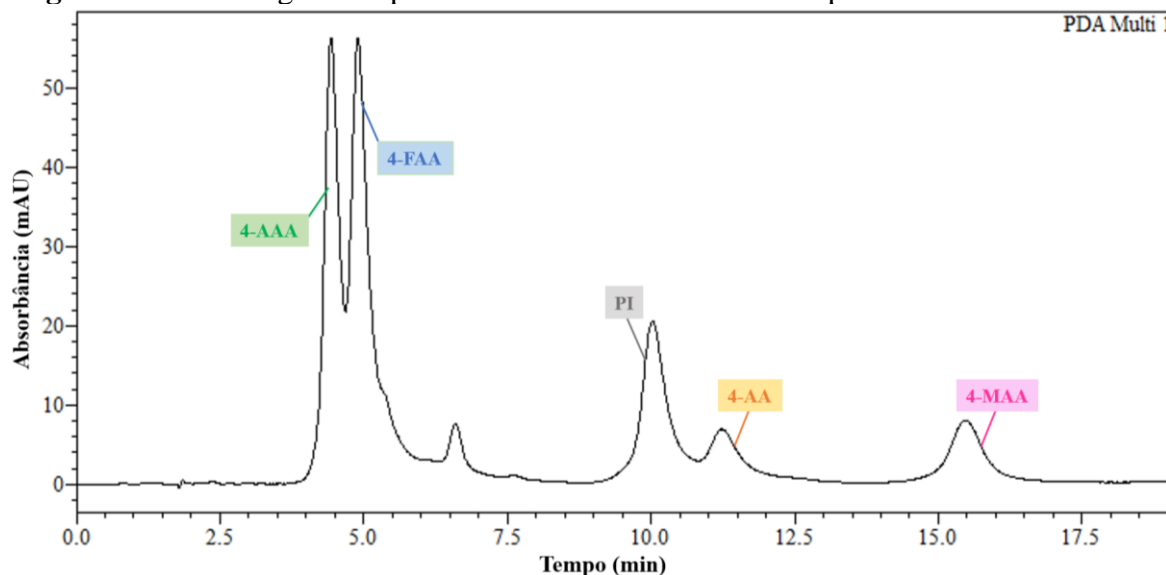
Quadro 2 Cont. – Métodos de CLAE usados para quantificação dos metabólitos da dipirona.

| Publicação | Método de extração | Matriz | Padrão interno | Fase móvel | Fluxo | Deteção | Fez validação? Quais parâmetros avaliou? |
|--|--|---|---|--|--|-------------------------|--|
| DOMÍNGUES-RAMÍREZ <i>et al.</i> (2012) | Extração fase sólida (metanol), fase orgânica evaporada e reconstituída em fase móvel | Plasma de rato | Furosemida | Água-metanol-trietilamina-ácido acético (70,9:27,7:0,9:0,5, v/v/v/v) | 1,0 mL/min | 254 nm | Sim Seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e estabilidade |
| AGUIAR <i>et al.</i> (2013) | Extração líquido-líquido (hidróxido de sódio e diclorometano), fase orgânica evaporada e reconstituída em fase móvel | Hipotálamo, fluido cerebrospinal e plasma de rato | Moclobemida | Água e metanol (70:30, v/v) contendo 0,5% de ácido acético glacial | 0,5 mL/min | Espectrômetro de massas | Sim Linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação efeito matriz e estabilidade |
| GIORGI <i>et al.</i> (2015) | Extração líquido-líquido (hidróxido de sódio, acetato de etila e diclorometano), fase orgânica evaporada e reconstituída em fase móvel | Plasma de ovelha | Metoclopramida | Acetonitrila e acetato de amônio 20 mM, pH 5,0 (20:80, v/v) | 1,0 mL/min | 254 nm | Não |
| BACHMANN <i>et al.</i> (2020) | Extração líquido-líquido (metanol) | Plasma humano | Padrões internos deuterados (ISTD) 4-MAA-d3, 4-AA-d3 e 4-AAA-d3 | Água (fases A e C), metanol (fase B) metanol e ácido fórmico a 1% (fase D) | De acordo com a fase móvel varia o fluxo | Espectrômetro de massas | Sim Seletividade, precisão, linearidade, exatidão, efeito matriz e estabilidade |
| YILMAZ <i>et al.</i> (2021) | Extração fase sólida (hidróxido de sódio e metanol), fase orgânica evaporada e reconstituída em fase móvel | Plasma de cavalo | Metoclopramida | Acetonitrila e acetato de amônio 75 mM, pH 5,0 (28:72, v/v) | 1,0 mL/min | 254 nm | Sim Linearidade, precisão, exatidão, limite de deteção e de quantificação |

Fonte: Elaborado pela autora.

A Figura 4 apresenta o cromatograma representativo da identificação por CLAE dos metabólitos da dipirona após adição dos padrões em amostra de soro, pelo método em padronização.

Figura 4 – Cromatograma representativo dos metabólitos da dipirona adicionados em soro.



Abreviaturas: 4-AAA, 4-acetil-amino-antipirina (4,3 min); 4-FAA, 4-formil-amino-antipirina (4,9 min); PI, padrão interno, antipirina (10,0 min); 4-AA, 4-amino-antipirina (11,2 min); 4-AAA: 4-FAA, 4-AA e 4-MAA, 4-metil-amino-antipirina (15,9 min).

4.2 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA BIOANALÍTICA

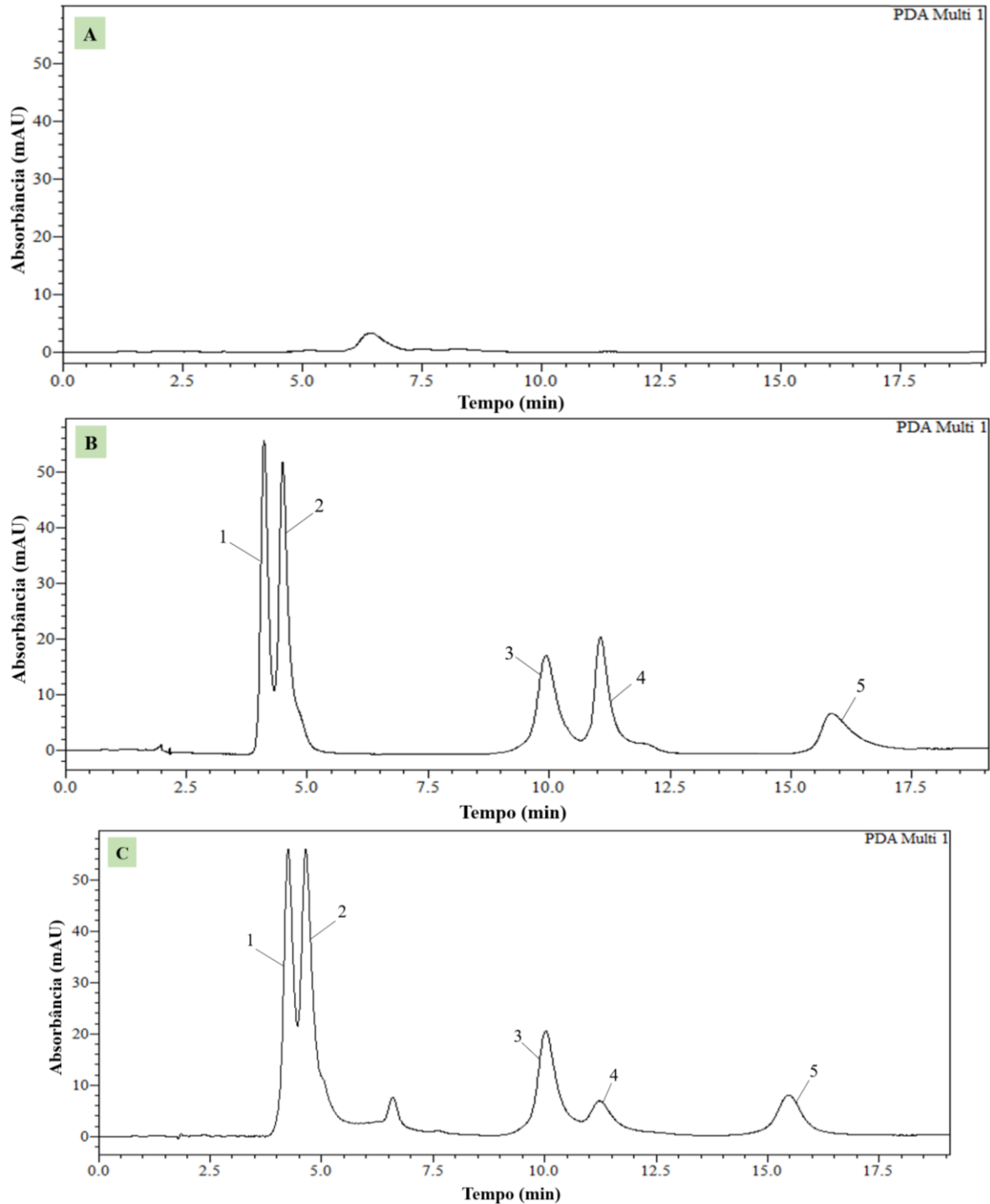
4.2.1 Seletividade

Para avaliação da seletividade, os cromatogramas obtidos na análise do branco (soro sem metabólitos) e dos metabólitos em solvente e em soro estão representados abaixo (Figura 5). Foi possível observar a presença de apenas um interferente na matriz pela comparação dos cromatogramas dos padrões e do PI na amostra de soro e em água. Foi verificado, também, que a eluição do interferente ocorreu em tempo de retenção diferentes dos metabólitos e do PI, o que comprova a seletividade do método.

Além disto, foi verificada a similaridade das bandas de absorção pela sobreposição dos espectros de absorção dos respectivos metabólitos no soro e em água (Figura 6). O espectro de absorção é um gráfico, da absorbância *versus* o comprimento de onda, que caracteriza a presença do composto. O próprio software LC Solution 1.2 usado para fazer essa comparação calculou o fator de similaridade entre os espectros: 1,000, 1,000, 0,997 e 0,994 para 4-AAA, 4-FAA, 4-AA e 4-MAA, respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados em

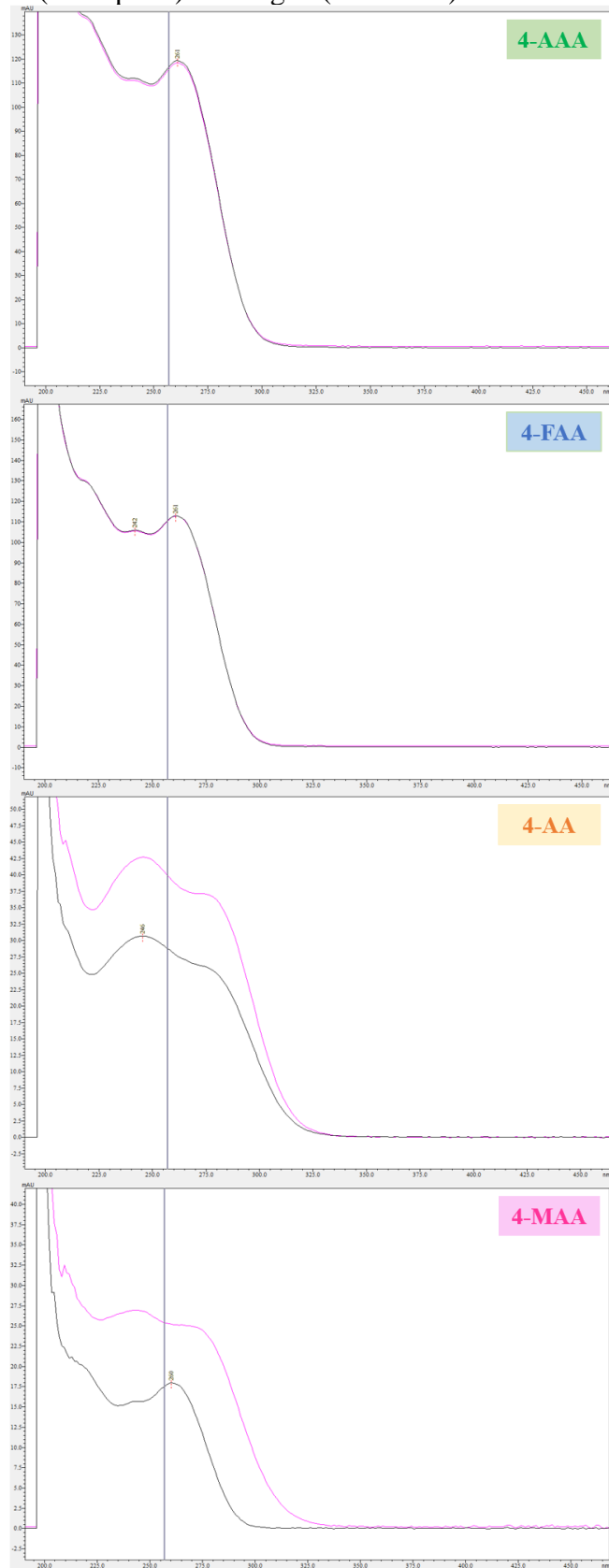
outros estudos (DOMINGUEZ-RAMIREZ *et al.*, 2012; AGUIAR *et al.*, 2013; BACHMANN *et al.*, 2020).

Figura 5 – Cromatogramas obtidos pela injeção de: (A) branco da amostra, (B) metabólitos (50,0 µg/mL) e PI (20,0 µg/mL) em água e (C) metabólitos (50,0 µg/mL) e PI (20,0 µg/mL) em soro.



Picos 1: 4-AAA (4-acetil-amino-antipirina); 2: 4-FAA (4-formil-amino-antipirina); 3: PI (padrão interno, antipirina); 4: 4-AA (4-amino-antipirina) e; 5: 4-MAA (4-metil-amino-antipirina).

Figura 6 - Espectros de Absorção UV-Vis dos metabólitos da dipirona na amostra de soro (linha preta) e em água (linha rosa) em CLAE.



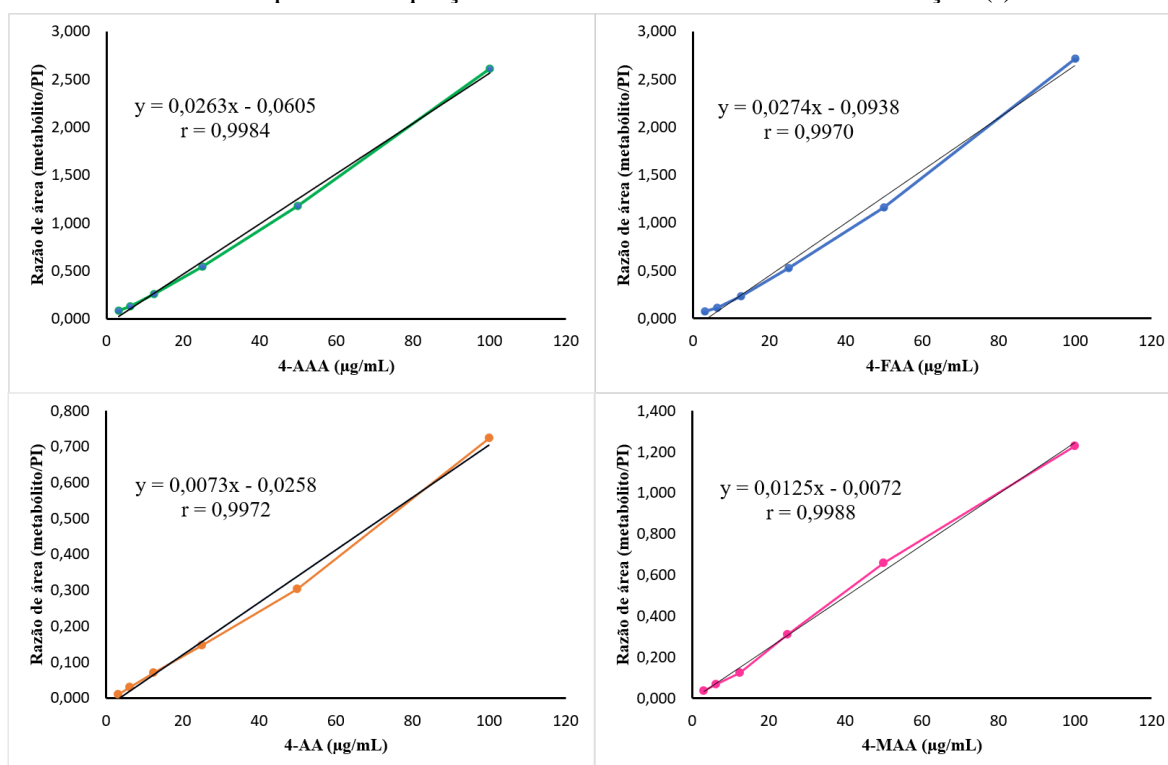
Abreviaturas: 4-AAA, 4-acetil-amino-antipirina; 4-FAA, 4-formil-amino-antipirina; 4-AA, 4-amino-antipirina e; 4-MAA, 4-metil-amino-antipirina.

4.2.2 Linearidade do método na matriz soro

A linearidade do método verificada por meio da medida dos metabólitos nas curvas-padrão preparadas em soro contendo PI. A razão “área do metabólito/área do PI” foi usada em relação à concentração sérica do metabólito. Os gráficos de linearidade com as respectivas equações da reta e os coeficientes de correlação (r) estão apresentados na Figura 7.

Para confirmar o modelo linear proposto na faixa de concentração estudada, foi realizada a análise de regressão por meio do software Microsoft Excel® para cada um dos metabólitos (Tabela 2). As equações da reta apresentadas foram utilizadas para os cálculos de concentração dos metabólitos em todas as análises durante a validação do método.

Figura 7 – Linearidade das curvas-padrão dos metabólitos da dipirona em soro, suas respectivas equações lineares e coeficientes de correlação (r).



Concentrações dos metabólitos em todas as curvas: 3,13, 6,25, 12,50, 25,00, 50,00 e 100,00 µg/mL. As curvas representam a média de três ensaios para cada metabólito. Abreviaturas: PI, padrão interno, antipirina; 20 µg/mL; 4-AAA, 4-acetil-amino-antipirina; 4-FAA, 4-formil-amino-antipirina; 4-AA, 4-amino-antipirina e; 4-MAA, 4-metil-amino-antipirina.

De acordo com os resultados de linearidade dos quatro metabólitos, o método se mostrou eficaz em identificar e quantificar os metabólitos presentes na amostra de soro proporcionalmente às concentrações estudadas, atendendo o critério mínimo de coeficiente de correlação (r) de 0,990, estabelecido na RDC 166/17 (BRASIL, 2017).

Tabela 2 – Equações da reta em soro obtidas para os metabólitos da dipirona.

| Metabólito | Equação da reta | Coefficiente de correlação (r) | Coefficiente de determinação (r ²) | Significância da regressão linear |
|------------|-------------------------|--------------------------------|--|-----------------------------------|
| 4-AAA | $y = 0,0263x - 0,06068$ | 0,9984 | 0,9969 | $p < 0,001$ |
| 4-FAA | $y = 0,0274x - 0,09225$ | 0,9941 | 0,9970 | $p < 0,001$ |
| 4-AA | $y = 0,0073x - 0,02580$ | 0,9972 | 0,9944 | $p < 0,001$ |
| 4-MAA | $y = 0,0125x - 0,00682$ | 0,9976 | 0,9988 | $p < 0,001$ |

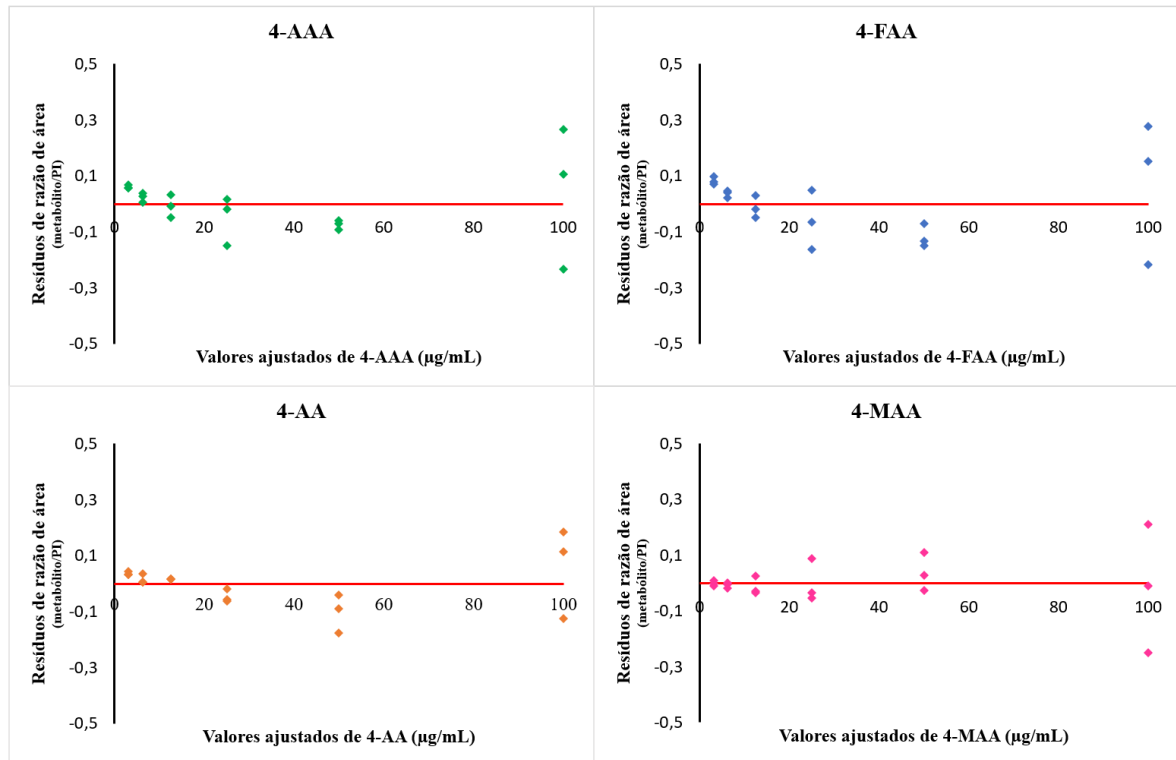
Abreviaturas: 4-AAA, 4-acetil-amino-antipirina; 4-FAA, 4-formil-amino-antipirina; 4-AA, 4-amino-antipirina e; 4-MAA, 4-metil-amino-antipirina.

Além disto, a linearidade foi avaliada por meio da análise dos resíduos da regressão linear. Essa é uma forma de aferir se as amostras se comportam de forma a contribuir para uma regressão. Os resíduos indicam a diferença entre o valor real de concentração e o valor estimado pela equação da reta, sendo, assim, uma variação natural dos dados, aleatória ou não, que o modelo não capturou (ROSSI, 2019).

O gráfico de probabilidade normal dos resíduos de concentração deve seguir aproximadamente uma distribuição aleatória ao longo da linha de regressão. Ao construir o gráfico de resíduos, se a distribuição dos pontos ocorrer de forma aleatória em torno da média das equações da reta, sem observar padrões específicos, como curva S ou S invertida, confirma-se que a equação da reta é um bom modelo matemático para representar os dados obtidos experimentalmente. Porém, quando são violadas as pressuposições do modelo, o uso da análise de regressão para análise dos dados pode levar a resultados não fidedignos e confiáveis para dedução (PIMENTEL; BARROS, 1996).

A Figura 8 apresenta a distribuição dos resíduos da regressão linear em relação à concentração dos metabólitos da dipirona. Assim, com base visual dos resultados, a distribuição dos resíduos ocorreu de forma aleatória para todas as concentrações dos metabólitos. Considera-se, então, que os metabólitos da dipirona aqui avaliados podem ser matematicamente analisados e quantificados pela regressão linear.

Figura 8 - Análise dos resíduos obtidos a partir das curvas de regressão linear.



A linha contínua vermelha representa a média das equações da reta. Abreviaturas: 4-AAA, 4-acetil-amino-antipirina; 4-FAA, 4-formil-amino-antipirina; 4-AA, 4-amino-antipirina e; 4-MAA, 4-metil-amino-antipirina.

A partir dos resultados apresentados, pode-se afirmar que o método analítico em validação é capaz de obter respostas analíticas diretamente proporcionais às concentrações dos metabólitos da dipirona (4-AAA, 4-FAA, 4-AA e 4-MAA) normalmente encontradas após a ingestão de 1 g de dipirona. A afirmação é fundamentada pela relação linear comprovada na faixa de 3,13 a 100,00 µg/mL estabelecida para o método.

No método por CLAE acoplada à espectrometria de massas descrito por Dominguez-Rodriguez *et al.* (2012) também foi observada relação linear entre a razão de área (metabólito/PI), com concentrações-dos metabólitos na faixa de 1 a 100 µg/mL. Aguiar *et al.* (2013), por sua vez, reportaram linearidade nas faixas de 0,125 a 150 µg/mL para 4-AAA, 4-FAA e 4-MAA, e de 0,042 a 50 µg/mL para 4-FAA em método CLAE acoplado à espectrometria de massas.

4.2.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os resultados para os limites de detecção e quantificação, obtidos através de cálculo, são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 – Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método para quantificação dos metabólitos da dipirona em soro.

| Metabólito | LD ($\mu\text{g/mL}$) | LQ ($\mu\text{g/mL}$) |
|------------|-------------------------|-------------------------|
| 4-AAA | 0,091 | 0,304 |
| 4-FAA | 0,186 | 0,621 |
| 4-AA | 2,478 | 8,260 |
| 4-MAA | 0,508 | 1,694 |

Abreviaturas: 4-AAA, 4-acetil-amino-antipirina; 4-FAA, 4-formil-amino-antipirina; 4-AA, 4-amino-antipirina e; 4-MAA, 4-metil-amino-antipirina.

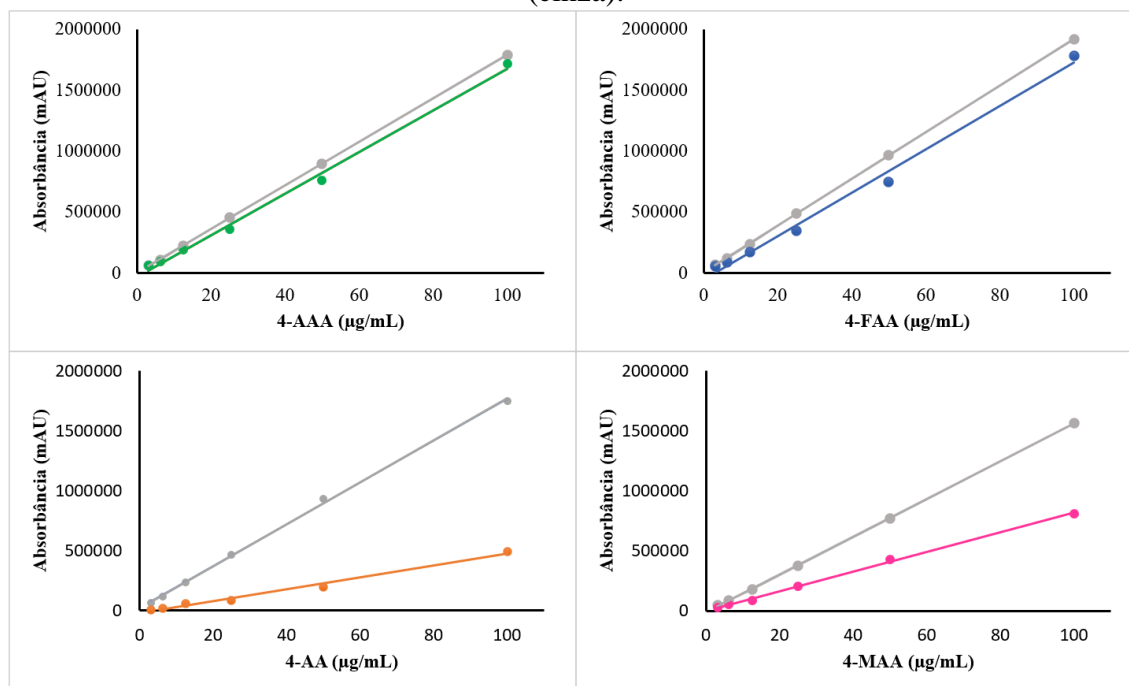
Pode-se observar que o LD e o LQ variaram entre os diferentes metabólitos da dipirona, sendo os menores limites encontrados para os metabólitos 4-AAA e 4-FAA (Tabela 3). Diferentemente, no método proposto por Dominguez-Ramirez *et al.* (2012) o LD foi de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ para todos os metabólitos, enquanto o LQ foi de 1 $\mu\text{g/mL}$. Aguiar *et al.* (2013) obtiveram LQ de 0,125 $\mu\text{g/mL}$ para 4-AA, 4-AAA e 4-MAA e de 0,04 $\mu\text{g/mL}$ para 4-FAA. Por outro lado, Bachmann *et al.* (2020) encontraram LQ de 0,025 $\mu\text{g/mL}$ para todos os metabólitos. No entanto, os autores utilizaram sistema de CLAE acoplado à espectrometria de massas, que é um método mais sensível que a detecção por UV utilizada no presente estudo. De qualquer maneira, os diferentes LD e LQ apresentados nos vários estudos provavelmente decorrem das diferentes naturezas da matriz, do método de extração e do método analítico utilizado.

A capacidade de detectar e quantificar os metabólitos na amostra é fundamental na avaliação do método bioanalítico, visto que os limites devem estar de acordo com a concentração esperada dos metabólitos no soro após a ingestão da dipirona. De acordo com Levy *et al.* (1995), a concentração máxima (C_{max}) dos metabólitos após a administração oral de 1 g de dipirona foi de 1,6 a 4,4 $\mu\text{g/mL}$ para 4-AAA, 1,8 a 2,5 $\mu\text{g/mL}$ para 4-FAA, 1,5 a 2,7 para 4-AA, e 9,7 a 17,3 $\mu\text{g/mL}$ para 4-MAA. Assim, o LD e o LQ para ~~cada um dos~~ os metabólitos avaliados no presente estudo atendem às necessidades de acordo com as concentrações encontradas na literatura, exceto o metabólito 4-AA, cujo LD foi de 2,478 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 3).

4.2.4 Efeito matriz

A avaliação do efeito matriz foi conduzida pela comparação das inclinações de duas curvas-padrão de cada metabólito, uma delas preparada em água e outra em soro (Figura 9).

Figura 9 – Curvas-padrão preparadas com os metabólitos em soro (coloridas) e em água (cinza).



As curvas representam a média de três ensaios em água e em soro. Para melhor visualização, os desvios-padrão não foram apresentados. Abreviaturas: 4-AAA, 4-acetil-amino-antipirina; 4-FAA, 4-formil-amino-antipirina; 4-AA, 4-amino-antipirina e; 4-MAA, 4-metil-amino-antipirina.

Para analisar o efeito matriz na extração e quantificação dos metabólitos da dipirona no soro, foi aplicado inicialmente o teste F para avaliar a homogeneidade das variâncias dos coeficientes angulares das curvas. Conforme pode ser visto na Tabela 5 e de acordo com os resultados do teste F (Tabela 4), os metabólitos 4-AAA, 4-FAA e 4-MAA apresentaram variâncias homogêneas (F calculado inferior ao F crítico), indicando – num primeiro momento – que não houve efeito matriz, enquanto o metabólito 4-AA apresentou variâncias diferentes (F calculado superior ao F crítico), ou seja, houve efeito matriz nesse metabólito (Tabela 4).

Em seguida, o efeito matriz para todos os metabólitos foi avaliado pela comparação das médias das inclinações das curvas usando-se o teste *t* de Student para variâncias combinadas (4-AAA, 4-FAA e 4-MAA), e pelo teste *t* de Student para variâncias distintas (4-AA). Assim, de acordo com o teste *t*, foi confirmado que não houve efeito matriz para os metabólitos 4-AAA ($p = 0,344$) e 4-FAA ($p = 0,172$), ou seja, a diferença visual observada se deveu às flutuações aleatórias das medidas e, de fato, para o metabólito 4-AA houve efeito matriz ($p = 0,013$). Entretanto, para o metabólito 4-MAA, o qual apresentou variâncias homogêneas, de acordo com o teste *t* houve diferença estatística entre os coeficientes

angulares ($p = 0,003$). Ou seja, ocorreu efeito matriz para os dois metabólitos, 4-AA e 4-MAA (Tabelas 4 e 5), confirmando a observação visual das curvas na Figura 9.

Tabela 4 – Teste F e teste t de Student para análise do efeito matriz com base no coeficiente angular.

| 4-AAA | 4-FAA | 4-AA | 4-MAA |
|--------------------------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
| <i>F crítico a 5% = 19,00</i> | | | |
| F calculado = 1,68 | F calculado = 2,07 | F calculado = 53,0 | F calculado = 2,27 |
| Não há efeito matriz | Não há efeito matriz | Há efeito matriz | Não há efeito matriz |
| <i>t crítico a 5% = 2,78</i> | | | |
| t calculado = 1,07 | t calculado = 1,66 | t calculado = 8,64 | t calculado = 6,64 |
| Não há efeito matriz | Não há efeito matriz | Há efeito matriz | Há efeito matriz |

Abreviaturas: 4-AAA, 4-acetil-amino-antipirina; 4-FAA, 4-formil-amino-antipirina; 4-AA, 4-amino-antipirina e; 4-MAA, 4-metil-amino-antipirina.

Tabela 5 – Coeficientes angulares das curvas-padrão preparadas em solvente (água) e em soro.

| Metabólitos | Curva-padrão água | Curva-padrão soro | Delta (%) (média) |
|-------------|------------------------|----------------------------|----------------------|
| | Coeficientes angulares | Coeficiente angulares | |
| 4-AAA | 17.853 ± 761 | 17.083 ± 761 | -4,31 |
| 4-FAA | 19.188 ± 818 | 17.814 ± 1.178 | -7,16 |
| 4-AA | 17.491 ± 279 | 7.254 ± 2.033 ^a | -58,52 |
| 4-MAA | 15.408 ± 1.049 | 8.129 ± 1.583 ^b | -47,24 |

Os resultados estão expressos como média ± desvio-padrão de nove ensaios para cada curva. ^a $P = 0,013$; ^b $P = 0,003$. Abreviaturas: 4-AAA, 4-acetil-amino-antipirina; 4-FAA, 4-formil-amino-antipirina; 4-AA, 4-amino-antipirina e; 4-MAA, 4-metil-amino-antipirina.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 5, o efeito matriz do soro foi irrelevante para as medidas dos metabólitos 4-AAA e 4-FAA, com variação média entre os coeficientes angulares de -4,3% ($p = 0,344$) e de -7,2% ($p = 0,172$), respectivamente. Todavia, o efeito matriz do soro para os metabólitos 4-AA e 4-MAA foi altamente expressivo, com médias de -58,5% ($p = 0,013$) e -47,2% ($p = 0,003$), respectivamente.

O efeito matriz é evidenciado em matrizes complexas, onde a intensidade do sinal é influenciada pela natureza complexa da amostra, e seu impacto na exatidão e precisão dos métodos analíticos é uma preocupação crescente na validação de métodos (GUEDES, 2014). No método em questão, observou-se que a matriz influenciou principalmente a quantificação dos metabólitos 4-AA e 4-MAA, onde ocorreu supressão do sinal analítico, de modo que a concentração sérica desses metabólitos calculada por meio das curvas-padrão preparadas em

água apresentou concentração subestimada. Desta forma, o efeito matriz mostrou ser metabólito-dependente, tendo em vista que não houve influência nas medidas dos metabólitos 4-AAA e 4-FAA. Assim, para o presente método, sugere-se a quantificação dos metabólitos em amostras de soro desconhecidas por meio da adição de padrão interno às amostras e às curvas-padrão preparadas em soro isentos de metabólitos. Na prática, a técnica de adição do padrão interno poderá ser aplicada a todos os metabólitos, pois os quatro metabólitos serão medidos numa única corrida analítica, e extraídos ~~igualmente~~ em conjunto de uma amostra de soro com adição de padrão interno.

Na literatura científica são poucos os estudos de validação de métodos para quantificar os metabólitos da dipirona que avaliaram o efeito matriz. No entanto, aqueles que discutiram esse parâmetro não encontraram diferenças significativas entre a resposta da matriz e do solvente para nenhum dos metabólitos (AGUIAR *et al.*, 2013; BACHMANN *et al.*, 2020).

Diferentemente do presente estudo, Aguiar *et al.* (2013) avaliaram o efeito matriz usando um método de “pico pós-extração”, em que amostras de plasma (sem metabólitos) foram submetidas ao método de extração com hidróxido de sódio e diclorometano e, em seguida, soluções padrão de 4-MAA, 4-FAA, 4-AA e 4-AAA e de padrão interno foram adicionadas ao sobrenadante. Após isso, as áreas foram comparadas com aquelas obtidas dos padrões em solvente (água) nos mesmos níveis de concentração. Os valores foram expressos em porcentagem e variaram de 3 a 12% (AGUIAR *et al.*, 2013). Por outro lado, Bachmann *et al.* (2020) compararam a área dos picos dos metabólitos após extração de amostras de plasma adicionadas com padrões (metabólitos) e de padrões em solvente (água e metanol), onde o efeito matriz foi expresso pela razão de área do metabólito em plasma/área do metabólito em solvente (água e metanol). A matriz plasmática alterou a intensidade do sinal dos metabólitos da dipirona em -28,3% a 1,0%, porém os autores desconsideraram esses resultados.

Em geral, para os metabólitos 4-AAA e 4-FAA, as amostras de soro foram eficientemente extraídas e não necessitam purificações extensas como indicado pelo menor efeito matriz observado para esses metabólitos no presente estudo.

4.2.5 Precisão e Exatidão

A Tabela 6 mostra os valores médios do estudo da precisão, por meio das análises de repetibilidade (intra-dia) e da precisão intermediária (inter-dias), e da exatidão (recuperação) do método.

Os valores de desvio padrão relativo (DPR, ou CV) intra-dia variaram, em média, 2,4% para 4-AAA; 2,6% para 4-FAA; 16,7% para 4-AA e; 12,9% para 4-MAA. A DPR inter-dia (precisão intermediária) foi de 4,6% para a 4-AAA; 1,6% para 4-FAA; 26,1% para 4-AA e; 18,1% para 4-MAA. De acordo com os resultados médios, uma maior variabilidade foi evidente na quantificação dos metabólitos 4-AA e 4-MAA (Tabela 6).

Segundo o critério estabelecido pela FDA para aceitação da precisão, variação máxima de 15% do valor nominal para, no mínimo, 67% dos resultados. Ao analisar os metabólitos individualmente, a 4-AAA apresentou 68% e a 4-FAA apresentou 91% dos resultados das amostras com variação máxima de 15%. Enquanto a 4-AA e a 4-MAA apresentaram apenas 30% e 22%, respectivamente, de amostras dentro da variação permitida de 15%. Dessa forma, o método se mostrou preciso somente para os metabólitos 4-AAA e 4-FAA (Tabela 6).

Portanto, com base nos resultados do presente estudo, o método foi preciso para a análise de dois dos quatro metabólitos da dipirona em soro humano. No entanto, a precisão analítica é mais importante quando se busca monitorar um parâmetro com dosagens seriadas, pois a variação de resultado deve representar a mudança do analito no organismo e não a variabilidade intrínseca do método bioanalítico. Para a quantificação de um analito em momento isolado, é mais importante que o método seja exato, ou seja, apresente resultado próximo do verdadeiro.

Alguns estudos demonstraram métodos para a quantificação dos metabólitos da dipirona mais precisos. O método descrito por Bachmann *et al.* (2020) apresentou repetibilidade de 12,7% e precisão intermediária de 9,7%, enquanto o de Ojha, Rathod e Padh (2009) foi de 1 a 11% para repetibilidade e de 5 a 9% para precisão intermediária. Porém, a metodologia utilizada nos estudos citados (CLAE acoplada à espectrometria de massas) é reconhecida pela melhor exatidão, precisão na medida de massas, resolução, faixa dinâmica e reprodutibilidade (MEURER, 2020).

No presente estudo, o método de extração resultou em recuperação geral de 75,6 a 113,1%. A recuperação média dos metabólitos nas diferentes concentrações, avaliada por injeções em triplicata das amostras, foi de 96,5% para 4-AAA, 103% para 4-FAA, 100,7% para 4-AA e 88,4% para 4-MAA. Apenas um dos metabólitos, em sua maior concentração (4-MAA, 50 µg/mL), apresentou uma recuperação menor que o limite mínimo de 80% aceito, sendo de 75,6%. No entanto, dificilmente as concentrações avaliadas são encontradas no soro após a ingestão de 1 g de dipirona, sendo de 9,7 a 17,3 µg/mL para a 4-MAA (LEVY *et al.*, 1995).

Tabela 6 – Precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão do método para a quantificação dos metabólitos da dipirona.

| | C_t ($\mu\text{g/mL}$) | Repetibilidade (n = 3) | | | Precisão intermediária (n = 15) | |
|-------|-------------------------------|-------------------------------|-------------|--------------------|------------------------------------|-------------|
| | | C_e ($\mu\text{g/mL}$) | DPR (%) | Recuperação (%) | C_e ($\mu\text{g/mL}$) | DPR (%) |
| 4-AAA | 12,5 | 13,8 | 3,6 | 110,3 | 13,4 | 10,2 |
| | 25,0 | 25,2 | 2,5 | 100,9 | 25,3 | 0,5 |
| | 50,0 | 42,2 | 1,0 | 84,3 | 40,6 | 3,2 |
| | | Média | 2,4 | 98,5 | Média | 4,6 |
| 4-FAA | 12,5 | 12,6 | 0,1 | 100,5 | 13,9 | 0,8 |
| | 25,0 | 27,4 | 0,5 | 109,5 | 25,7 | 2,1 |
| | 50,0 | 49,4 | 7,3 | 98,8 | 50,0 | 2,0 |
| | | Média | 2,6 | 102,9 | Média | 1,6 |
| 4-AA | 12,5 | 14,1 | 20,0 | 113,1 | 11,8 | 22,6 |
| | 25,0 | 20,4 | 23,2 | 81,4 | 12,6 | 32,6 |
| | 50,0 | 53,8 | 6,8 | 107,6 | 45,8 | 23,0 |
| | | Média | 16,7 | 100,7 | Média | 26,1 |
| 4-MAA | 12,5 | 11,3 | 18,0 | 90,3 | 9,0 | 6,2 |
| | 25,0 | 24,8 | 10,6 | 99,4 | 19,5 | 18,1 |
| | 50,0 | 37,8 | 10,2 | 75,6 | 29,1 | 30,1 |
| | | Média | 12,9 | 88,4 | Média | 18,1 |

Abreviaturas: 4-AA: 4-aminoantipirina; 4-AAA: 4-acetilaminoantipirina; 4-FAA: 4-formilaminoantipirina; 4-MAA: 4-Metilaminoantipirina; C_t : concentração teórica; C_e : Concentração encontrada (média de três análises em triplicata); DPR: desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (CV).

Considerando o limite de recuperação de 20% (80 a 120%), o método para quantificação dos metabólitos apresentou-se exato, com resultados comparáveis àqueles apresentados por Dominguez-Ramirez *et al.* (2012), os quais encontraram recuperação nas faixas de de 97 a 102% para 4-AAA, e 97 a 103% para 4-FAA, 89 a 100% para 4-AA, e 100 a 108% para 4-MAA, com uma boa precisão (DPR ou CV < 8%). Bachmann *et al.* (2020), que também encontraram recuperação de 93 a 100% para 4-AAA, 97 a 102% para 4-AA, e 95 a 106% para 4-MAA. No entanto, o primeiro estudo não discutiu o efeito matriz, que pode influenciar na extração/recuperação, e o segundo não encontrou influência significativa da matriz no desempenho analítico do método, como foi visto no presente estudo para os metabólitos 4-AA e 4-MAA.

4.2.6 Estabilidade dos metabólitos na amostra

Através da análise da Tabela 7, verificou-se que os metabólitos da dipirona não foram estáveis em soro quando armazenados em temperatura de -20 °C e -80 °C por 15 e 30 dias.

Tabela 7 – Estabilidade dos metabólitos da dipirona em soro após 15 e 30 dias de armazenamento em diferentes temperaturas.

| Metabólitos | - 20 °C | | | - 80 °C | |
|-------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | C _{d1} (µg/mL) | C _{d15} (µg/mL) | C _{d30} (µg/mL) | C _{d15} (µg/mL) | C _{d30} (µg/mL) |
| 4-MAA | 17,4 | 9,6 (-45%) | 7,0 (-60%) | 8,0 (-54%) | 5,0 (-71%) |
| | 27,9 | 11,9 (-57%) | 22,5 (-19%) | 12,9 (-54%) | 11,9 (-57%) |
| | 46,9 | 17,0 (-64%) | 41,0 (-13%) | 26,0 (-45%) | 33,5 (-29%) |
| 4-AA | 6,3 | 8,0 (27%) | 7,0 (11,1%) | 17,6 (179%) | 11,0 (75%) |
| | 11,8 | 12,0 (2%) | 12,0 (2%) | 36,5 (209%) | 27,1 (130%) |
| | 34,4 | 44,0 (28%) | 53,0 (54%) | 29,0 (-16%) | 48,0 (40%) |
| 4-FAA | 16,0 | 16,1 (1%) | 15,7 (-2%) | 17,3 (8%) | 15,0 (-6%) |
| | 27,2 | 31,0 (14%) | 26,4 (-3%) | 32,1 (18%) | 28,2 (4%) |
| | 54,7 | 67,0 (22%) | 57,7 (5%) | 72,0 (32%) | 56,0 (2%) |
| 4-AAA | 12,8 | 13,5 (5%) | 11,8 (-8%) | 13,3 (4%) | 11,0 (-14%) |
| | 21,0 | 24,8 (18%) | 21,2 (1%) | 19,7 (-6%) | 21,4 (2%) |
| | 39,5 | 62,5 (58%) | 42,9 (9%) | 42,0 (7%) | 42,0 (7%) |

Abreviaturas: 4-AAA, 4-acetil-amino-antipirina; 4-FAA, 4-formil-amino-antipirina; 4-AA, 4-amino-antipirina; 4-MAA, 4-metil-amino-antipirina; C_{d1}: concentração dia 1; C_{d15}: concentração dia 15; C_{d30}: concentração dia 30. Entre parênteses encontra-se a diferença percentual considerando C₀ como 100%.

Tendo em vista a falta de estabilidade observada após 15 e 30 dias de armazenamento das amostras nas diferentes temperaturas, exceto para os metabólitos 4-AAA e 4-FAA nas concentrações de 12,8 e 16,0 µg/mL, respectivamente (Tabela 7), análises adicionais foram feitas após 1 a 5 dias das amostras armazenadas a -20° C e -80° C e com a temperatura adicional de 4 °C (Tabela 8).

Assim, como pode ser visto nas Tabelas 7 e 8 e considerando o limite de variação permitida de 15%, o método avaliado não permitiu a conservação das amostras de forma refrigerada ou congelada para posterior análise. Desta forma, em estudos *in vivo* as amostras deverão ser avaliadas no mesmo dia da coleta de sangue.

No entanto, a análise da estabilidade pode estar comprometida considerando a imprecisão do método abordada previamente. Como visto na Tabela 5, a 4-AA e 4-MAA foram os metabólitos que mais sofreram variabilidade entre os dias analisados, concordando com os resultados anteriores. Além disto, é possível considerar a possibilidade de eventuais (bio)-transformações dos metabólitos da dipirona *in vitro*. Essa especulação é decorrente da

observação geral do maior número de variações negativas para o metabólito 4-MAA e maior número de variações positivas nos demais metabólitos, particularmente nos períodos de armazenamento de 15 e 30 dias (Tabela 7). Porém, estudos adicionais deverão ser realizados para a confirmação de tal ocorrência.

Curiosamente, Bachmann *et al.* (2020) verificaram que amostras de plasma contendo 0,5, 1,0 ou 7,5 µg/mL dos quatro metabólitos foram estáveis por pelo menos três meses na temperatura de -20 °C. Igualmente, outros estudos também verificaram estabilidade dos metabólitos por, pelo menos, quatro semanas a -20 °C (DOMINGUEZ-RAMIREZ *et al.*, 2012; AGUIAR *et al.*, 2013). No entanto, todos esses trabalhos avaliaram a estabilidade de amostras contendo concentrações menores que as avaliadas no presente estudo.

Tabela 8 – Estabilidade dos metabólitos da dipirona em soro em 5 dias de armazenamento em diferentes temperaturas.

| | | 4 °C | | | | - 20 °C | | | | - 80 °C | | | |
|--------------|----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Metabólitos | C _{d1} (µg/mL) | C _{d2} | C _{d3} | C _{d4} | C _{d5} | C _{d2} | C _{d3} | C _{d4} | C _{d5} | C _{d2} | C _{d3} | C _{d4} | C _{d5} |
| 4-MAA | 8,6 | 10% | -15% | -20% | -17% | 10% | 0% | 6% | 14% | -27% | 48% | -13% | 25% |
| | 15,6 | -21% | 6% | 13% | -10% | 17% | 34% | 15% | 59% | -12% | -28% | -31% | -20% |
| | 37,8 | 25% | -30% | 7% | -6% | -55% | -18% | -19% | -25% | 21% | -5% | -23% | 43% |
| 4-AA | 14,1 | 16% | -12% | -22% | -45% | -20% | -45% | -23% | -12% | 14% | -42% | -18% | 13% |
| | 18,1 | -2% | -20% | 16% | 20% | -34% | -40% | -16% | -54% | -20% | -28% | 10% | -33% |
| | 53,1 | 32% | 3% | -14% | -30% | -43% | -15% | -2% | 4% | 13% | -17% | -22% | -25% |
| 4-FAA | 12,8 | 45% | -1% | 21% | -11% | 16% | 12% | -3% | -59% | 3% | 41% | 2% | -25% |
| | 24,0 | 39% | 3% | 10% | -18% | 37% | -1% | -12% | -13% | 17% | 15% | -15% | 6% |
| | 48,8 | 17% | 16% | 24% | -19% | -44% | 15% | 10% | 7% | 16% | 9% | 8% | 12% |
| 4-AAA | 13,3 | 30% | -7% | 22% | -9% | 11% | 0% | 1% | -56% | -6% | 34% | -6% | -29% |
| | 24,8 | 27% | -2% | 12% | -20% | 24% | -10% | -9% | -8% | 4% | -5% | -29% | 5% |
| | 39,1 | 5% | -3% | 17% | -25% | -49% | 2% | 4% | 0% | -1% | -7% | 1% | -10% |

Abreviaturas: 4-AAA: 4-acetil-amino-antipirina; 4-FAA: 4-formil-amino-antipirina; 4-AA: 4-amino-antipirina; 4-MAA: 4-metil-amino-antipirina; C_{d1}: concentração dia 1; C_{d2}: concentração dia 2; C_{d3}: concentração dia 3; C_{d4}: concentração dia 4; C_{d5}: concentração dia 5. Os valores representam a diferença percentual considerando C_{d1} como 100%.

5. LIMITAÇÕES E PONTOS FORTES

Como limitações metodológicas no estudo destaca-se a realização das análises em momentos diferentes, com grande variação de temperatura ambiente entre os períodos de verão e inverno, o que pode ter influenciado alguns resultados. Porém, o estudo possui inúmeros pontos fortes, como por exemplo, corrida cromatográfica de pouco tempo, método de extração simples e pouco gasto com solventes.

Entretanto, por mais que a metodologia tenha sido rápida e seletiva, as condições operacionais adotadas para as extrações e para as análises cromatográficas podem ainda ser aperfeiçoadas, como por exemplo, o emprego de diferentes solventes para as extrações e para a fase móvel na cromatografia e a utilização de coluna cromatográfica com fase estacionária distinta.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, o método escolhido para a quantificação dos metabólitos da dipirona foi seletivo para os quatro metabólitos estudados, 4-AAA, 4-FAA, 4-AA e 4-MAA. Além disto, o método apresentou resposta linear entre as concentrações estudadas de 3,13 a 100,00 µg/mL, com coeficientes de correlação (r) maiores que 0,99 como recomenda a RDC 166/17 (ANVISA, 2017).

Para os metabólitos 4-AAA e 4-FAA, não houve efeito matriz. Entretanto, a matriz soro interferiu na quantificação dos metabólitos 4-AA e 4-MAA impossibilitando o uso da equação da reta preparada em solvente, necessitando, assim, da técnica de adição de padrão interno às amostras de soro e curvas padrão construídas com metabólitos adicionados em soros livres de metabólitos. Com base nos resultados, o método mostrou ser exato para todos os metabólitos nas concentrações séricas usualmente encontradas após ingestão de 1g de dipirona. No entanto, foi preciso apenas para os metabólitos 4-AAA e 4-FAA. De forma geral, as amostras de soro não se mostraram estáveis para análise nos dias subsequentes à coleta da amostra.

Quadro 3 – Resumo dos resultados para a validação do método.

| Parâmetros de validação | Metabólitos | | | |
|-------------------------|-------------|-------|------|-------|
| | 4-AAA | 4-FAA | 4-AA | 4-MAA |
| Seletividade | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Linearidade | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Exatidão | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| LD e LQ | ✓ | ✓ | ✗ | ✓ |
| Precisão | ✓ | ✓ | ✗ | ✗ |
| Efeito matriz | ✓ | ✓ | ✗ | ✗ |
| Estabilidade | ✗ | ✗ | ✗ | ✗ |

Abreviaturas: 4-AAA: 4-acetil-amino-antipirina; 4-FAA: 4-formil-amino-antipirina; 4-AA: 4-amino-antipirina; 4-MAA: 4-metil-amino-antipirina

Em conclusão, o método de CLAE validado é adequado para identificar e quantificar os metabólitos da dipirona em soro. Estudos adicionais serão conduzidos no laboratório para avaliar as condições metodológicas e operacionais em estudo de farmacocinética, e, assim, verificar se os resultados encontrados neste estudo satisfazem as concentrações séricas reais dos metabólitos que serão encontradas após ingestão de 1g da dipirona.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, F. *et al.* Simultaneous determination of dipyron metabolites in rat hypothalamus, cerebrospinal fluid and plasma samples by LC–MS/MS. **Bioanalysis**, v. 5, n. 21, p. 2631-2645, 2013.
- AGUNDEZ, J. A. G.; BENÍTEZ, J. G. Determination of aminopyrine and dipyron metabolites in urine. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 18, n. 1, p. 104-107, 1996.
- ANDRIOLI, C. K. **Avaliação da interferência in vitro dos metabólitos da dipirona em ensaios bioquímicos**. 2021. 35 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2021.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE n° 899, de 29 de maio de 2003**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. D.O.U. 02 de junho de 2003.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n° 166, de 24 de julho de 2017**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. D.O.U. 24 de julho 2017.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manual de garantia da qualidade analítica: áreas de identidade e qualidade de alimentos e de insumos**. Secretaria de Defesa Agropecuária. MAPA/ACS, 2015.
- BVS. Biblioteca virtual em saúde. **Automedicação**. Ministério da Saúde, 2012. Disponível em: https://bvsm.sau.de.gov.br/bvs/dicas/255_automedicacao.html. Acesso em: 23 janeiro 2022.
- BACHMANN, F. *et al.* Development and validation of an LC–MS/MS method for the bioanalysis of the major metamizole metabolites in human plasma. **Bioanalysis**, v. 12, n. 3, p. 175-189, fev. 2020.
- BACHMANN, F. **Metabolism and drug-drug interaction studies of metamizole in humans**. 2021. 141 f. Tese (Doutorado) - Universidade de Basel, Basel, 2021.
- BAGNOUD, M. A.; REYMOND, J. P. Interference of metamizol (dipyron) on the determination of creatinine with the Kodak dry chemistry slide comparison with the enzymatic method from Boehringer. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 31, p. 753-757, 1993.
- CARRETERO, I.; VADILLO, J. M.; LASERNA, J. J. Determination of antipyrine metabolites in human plasma by solid-phase extraction and micellar liquid chromatography. **The Analyst**, v. 120, n. 6, p. 1729, 1995.
- CASSIANO, N. M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Revista Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021- 1030, 2009.
- CHAPARRO, L. *et al.* Analgesic effectiveness of dipyron (metamizol) for postoperative pain after herniorrhaphy: a randomized, double-blind, dose-response study. **Pain Practice**, v. 12, n. 2, p. 142-147, 2012.

COLLARES, E. F.; TRONCON, L. E. A. Effects of dipyron on the digestive tract. **Brazilian Journal of Medical And Biological Research**, v. 52, n. 2, p. 1-9, 2019.

DAMM, D. Simultaneous determination of the main metabolites of dipyron by high-pressure liquid chromatography. **Arzneimittelforschung**, v. 39, n. 11, p. 1415-1417, 1989.

DOMÍNGUEZ-RAMÍREZ, A. M. *et al.* High-performance liquid chromatographic assay for metamizol metabolites in rat plasma: application to pharmacokinetic studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 71, p. 173-178, 2012.

ERGUN, H.; FRATTARELLI, D. A. C; ARANDA, J. V. Characterization of the role of physicochemical factors on the hydrolysis of dipyron. **Journal of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, v. 35, n. 3, p. 479-487, 2004.

FERREIRA, A. L. **Alterações hematológicas induzidas por medicamentos**. 2010. Monografia (Requisito para obtenção do certificado de Especialista em Análises Clínicas e Toxicológicas) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

FDA. Food and Drug administration. **Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation**. Rockville, MD: US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research; 2018.

GASCÓN, N. *et al.* Dipyron interference on several common biochemical tests. **Clinical Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 1033-1036, 1993.

GUEDES, J. A. C. **Validação de método analítico empregando QuEChERS e CG-EM para determinação multirresíduo de agrotóxico em goiaba**. 2014. 119 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de química, Departamento de química analítica e físico-química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

GUIMARÃES, F. de P. G. *et al.* Política de proibição da dipirona: uma reflexão. **Augustus**, v. 27, n. 54, p. 96-108, 2021.

ICTQ, Instituto de Ciência, Tecnologia e Qualidade. **Pesquisa - automedicação no Brasil (2018)**. Instituto de ciência, tecnologia e qualidade, 2018. Disponível em: <https://ictq.com.br/pesquisa-do-ictq/871-pesquisa-automedicacao-no-brasil-2018>. Acesso em: 23 de janeiro de 2022.

JBM ANALÍTICA. **Qual a importância da Validação de um Método Analítico?** 2020. Disponível em: <https://pt.linkedin.com/pulse/qual-import%C3%A2ncia-da-valida%C3%A7%C3%A3o-de-um-m%C3%A9todo-anal%C3%ADtico-jbm-analitica>. Acesso em: 13 jun. 2022.

HAMERSCHLAK, N. *et al.* Incidence of aplastic anemia and agranulocytosis in Latin America: the LATIN study. **São Paulo Medical Journal** v. 123, p. 101–104, 2005

HINZ, B. *et al.* Dipyron elicits substantial inhibition of peripheral cyclooxygenases in humans: new insights into the pharmacology of an old analgesic. **The Faseb Journal**, v. 21,

p. 2343-2351, 2007.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. **ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical.** Procedures: Text and Methodology Q2(R1), Step 4 Version, 2005.

JASIECKA, A.; MASLANKA, T.; JAROSZEWSKI, J. J. Pharmacological characteristics of metamizole. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 17, n. 1, p. 207-214, 2014.

JUNIOR, G. L. B; SCHUTZ, S. S. **Avaliação de interferências in vitro de medicamentos administrados em unidade de terapia intensiva sobre exames laboratoriais.** 2008. Monografia (Requisito parcial para conclusão da Disciplina Estágio Supervisionado em Análises Clínicas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

LAPORTE, J. *et al.* Upper gastrointestinal bleeding associated with the use of NSAIDs. **Drug Safety**, v. 27, p. 411-420, 2004.

LEVY, M. Clinical pharmacokinetics of dipyron and its metabolites. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 28, n. 3, p. 216-234, 1995.

LUNA-ZÁIZAR, H. *et al.* In vitro interference by acetaminophen, aspirin, and metamizole in serum measurements of glucose, urea, and creatinine. **Clinical Biochemistry**, v. 48, n. 7-8, p. 538-541, 2015.

MARTINS, A. F. S. **Implementação e validação de métodos analíticos.** 2016. 126 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2016.

MEURER, E. C. **Espectrometria de massas para iniciantes.** 1 ed. Appris, 2020.

MILJKOVIC, M. N. *et al.* Metamizole: Current status of the safety and efficacy. **Hospital Pharmacology**, v. 5, n. 3, p. 694-704, 2018.

NIKOLOVA, I. *et al.* Metamizole: a review profile of a well-known “forgotten” drug. part i: pharmaceutical and nonclinical profile. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 26, n. 6, p. 3329-3337, 2012.

OJHA, A.; RATHOD, R.; PADH, H. Quantification of 4-methylaminoantipyrine, the active metabolite of dipyron, in human plasma. **Bioanalysis**, v. 1, n. 2, p. 293-298, 2009.

PIMENTEL, M. F.; BARROS, B. N. Calibração: Uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v. 19, p. 268-277, 1996.

PIZZOL, T. S. D. *et al.* Analgesic use among the Brazilian population: Results from the National Survey on Access, Use and Promotion of Rational Use of Medicines (PNAUM). **Plos One**, v. 14, n. 3, p. 1-12, 2019.

REIST, L. *et al.* Dipyron is the preferred nonopioid analgesic for the treatment of acute and chronic pain. A survey of clinical practice in German-speaking countries. **European Journal of Pain**, v. 22, n. 6, p. 1103-1112, 2018.

- RICOS, C. *et al.* **Desirable Biological Variation Database specifications**. 2014. Disponível em: <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>. Acesso em: 18 jul. 2022.
- ROSSI, A. **Diagnóstico em regressão**. 2019. Disponível em: <https://lamfo-unb.github.io/2019/04/13/Diagnostico-em-Regressao>. Acesso em: 20 jun. 2022.
- SILVA, J. A. C. *et al.* Prevalência de automedicação e os fatores associados entre os usuários de um Centro de Saúde Universitário. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 11, n. 1, p. 27-30, 2013.
- SILVA, E. P.; SANTOS, F. F.; MARQUES, A. E. F. Cuidados farmacêuticos na automedicação: Uma revisão integrativa. **Educação, Ciência e Saúde**, v. 6, n. 2, 2020.
- SOARES, L. C. T.; SANTOS-NETO, Á. J. dos. Protetores de analitos e efeito de matriz em GC. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 2, p. 58-71, 2012.
- STAMMSCHULTE, T.; LUDWIG, W. D.; MUHLBAUER, B.; BRONDER, E.; GUNDERT-REMY, U. Metamizole (dipyrone)-associated agranulocytosis. An analysis of German spontaneous reports 1990–2012. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 71, n. 9, p. 1129–1138, 2015.
- VLAHOV, V. *et al.* Pharmacokinetics of metabolites in healthy subjects after a single oral dose of metamizol sodium. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 38, n.1, p. 61-65, 1990.
- YILMAZ, I. *et al.* Pharmacokinetic profiles of metamizole metabolites after intramuscular and intravenous administration in healthy arabian horses. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 44, n. 6, p. 927-936, 2021.
- ZAPATER, P. *et al.* Acute effects of dipyrone on renal function in patients with cirrhosis: a randomized controlled trial. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 116, n. 3, p. 257-263, 2015.
- ZIESENITZ, V. C. *et al.* Dose evaluation of intravenous metamizole (dipyrone) in infants and children: a prospective population pharmacokinetic study. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, p. 1491-1502, 2019.
- ZYLBER-KATZ, E. *et al.* Simultaneous determination of dipyrone metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 305, n. 2, p. 477-484, 1984.

ANEXO 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA IN VIVO DA DAPIRONA EM DETERMINAÇÕES DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SÉRICOS

Pesquisador: Flávia Martinello

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 33933120.8.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.141.744

Apresentação do Projeto:

Intervenção: administração oral de dipirona 1000mg, pós coleta basal e mais 4 coletas seriadas (2,5, 2,5 e 5 horas após ingestão)

Tamanho amostral: 10

Critério de Inclusão: indivíduos saudáveis de ambos os sexos, com idade entre 18-60 anos.

Critério de Exclusão: hipersensibilidade à dipirona ou a qualquer um dos componentes da formulação ou a outras pirazolidonas ou a pirazolidinas, indivíduos com deficiência congênita da glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD), indivíduos com doenças crônicas (como diabetes, obesidade e hipertensão), indivíduos com função da medula óssea prejudicada ou doenças do sistema hematopoiético, indivíduos que tenham desenvolvido broncoespasmo ou outras reações anafilactóides com analgésicos tais como salicilatos, paracetamol, diclofenaco, ibuprofeno, indometacina, naproxeno, indivíduos com porfiria hepática aguda intermitente, indivíduos intolerantes ao álcool, corantes e/ou conservantes, mulheres grávidas ou em lactação, indivíduos que fazem uso de tabaco, uso crônico de álcool ou uso contínuo de medicamentos, e que tenham IMC inferior a 18,5 e igual ou superior a 26.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário: avaliar a interferência in vivo da dipirona em determinações de parâmetros bioquímicos séricos.

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANÓPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 4.141.744

Objetivos secundários: a) Avaliar a concentração sérica dos quatro principais metabólitos da dipirona (4-MAA, 4-AA, 4-FAA e 4-AAA) em amostras de soro coletadas de indivíduos saudáveis 2,5, 5,0 e 10 horas após o consumo de 1000 mg do medicamento; b) Avaliar a interferência in vivo da dipirona nas determinações dos parâmetros bioquímicos de rotina em amostras de soro obtidas de indivíduos saudáveis em diferentes tempos após a ingestão de 1000 mg do medicamento; c) Sugerir o tempo ideal para suspensão do uso do medicamento antes da coleta de sangue para a análise dos referidos parâmetros avaliados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: de acordo com a bula do medicamento, não se deve ingerir dose maior do que 4000 mg de dipirona por dia. Assim, a dose que o(a) sr(a) estará ingerindo encontra-se dentro do permitido.

Os possíveis riscos à sua integridade física são relacionados ao desconforto de engolir dois comprimidos e aos eventos adversos previstos na bula da dipirona como reações alérgicas, distúrbios de pele (coceira até erupções cutâneas), inchaço, falta de ar, problemas de sangramento, problemas digestivos e distúrbios do sangue, os quais podem desenvolver-se imediatamente após a ingestão da dipirona ou horas mais tarde. Contudo, a tendência normal é que estes eventos ocorram na primeira hora após a administração. Também há o risco relacionado à coleta de sangue, como dor no local da punção e formação de hematoma. Além disto, pode haver desconforto emocional pelo uso do seu tempo ou algum constrangimento.

Benefícios: o benefício do voluntário em participar da pesquisa é contribuir para uma adequada orientação do paciente e do médico solicitante, se o uso da dipirona pode interferir ou não nos exames laboratoriais estudados e orientação sobre o tempo de suspensão prévia (ou não) do uso deste medicamento antes da coleta de sangue para realização dos exames, a fim de evitar resultados alterados e não fidedignos à clínica do paciente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de pesquisa para elaboração de Trabalho de Conclusão de Curso do Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, sob orientação da Profa. Dra. Flávia Martinello.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Apresenta TCLE.
- Folha de rosto assinada eletronicamente pela coordenadora do Curso de Graduação em Farmácia, Profa. Dra. Marení Rocha Farias, em 15/06/2020.
- Carta de anuência do Laboratório de Pesquisa em Lipídeos, Antioxidantes e Aterosclerose da

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
 Bairro: Trindade CEP: 88.040-400
 UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
 Telefone: (48)3721-6094 E-mail: cep.propesq@conbito.ufsc.br

Continuação do Parecer: 4.141.744

Universidade Federal de Santa Catarina, eletronicamente assinada pelo responsável legal, Prof. Dr. Edson Luiz da Silva, em 16/06/2020.

- Carta de anuência do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina, eletronicamente assinada pela responsável legal, Profa. Dra. Lucy Maria Bez B. Parucker, em 16/06/2020.

Recomendações:

Nada a recomendar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto não apresenta pendências e/ou inadequações. O TCLE está adequado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos que a presente aprovação (versão projeto 22/06/2020 e TCLE 22/06/2020) refere-se apenas aos aspectos éticos do projeto.

Qualquer alteração nestes documentos deve ser encaminhada para avaliação do CEPESH. Informamos que obrigatoriamente a versão do TCLE a ser utilizada deverá corresponder na íntegra à versão vigente aprovada.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|--|------------------------|-------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1575315.pdf | 22/06/2020 16:51:28 | | Aceito |
| Declaração de concordância | Anuencia_Laboratorio_assinado.pdf | 22/06/2020 16:50:41 | Flávia Martinello | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | Declaracao_Pesquisador_Colaborador_assinado.pdf | 22/06/2020 16:50:06 | Flávia Martinello | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | Declaracao_Instituicao_Lucy_assinado.pdf | 22/06/2020 16:44:10 | Flávia Martinello | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE.pdf | 22/06/2020 16:42:28 | Flávia Martinello | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | ProjetoCEPSH.pdf | 22/06/2020 16:42:04 | Flávia Martinello | Aceito |
| Folha de Rosto | folhaDeRosto_assinado_Flavia_Martinello_assinado.pdf | 15/06/2020 18:16:21 | Flávia Martinello | Aceito |

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propeq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 4.141.744

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 08 de Julho de 2020

Assinado por:
Maria Luiza Bazzo
(Coordenador(a))

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br