

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

Sofia Aquino Monteiro

**Nova metodologia analítica para
determinação de anti-inflamatórios
não esteroides em amostras de urina
por microextração em membrana
utilizando solvente supramolecular**

UFCSPA
Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

**Porto Alegre
2024**

Sofia Aquino Monteiro

**Nova metodologia analítica para
determinação de anti-inflamatórios
não esteroides em amostras de urina
por microextração em membrana
utilizando solvente supramolecular**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador(a): Prof. Dr. Josias de Oliveira Merib

**Porto Alegre
2024**

Catlogação na Publicação

Monteiro , Sofia Aquino

Nova metodologia analítica para determinação de anti-inflamatórios não esteroides em amostras de urina por microextração em membrana utilizando solvente supramolecular / Sofia Aquino Monteiro . -- 2024.

89 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em BioCiências, 2024.

Orientador(a): Prof. Dr. Josias de Oliveira Merib .

1. Solvente supramolecular. 2. Microextração. 3. AINEs. 4. Membrana microporosa. 5. Preparo de amostras. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

INSTITUIÇÃO E FONTES FINANCIADORAS

O presente trabalho foi inteiramente desenvolvido na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), nos laboratórios Central Analítica do prédio 1 e no Laboratório 405 do prédio 2. Contou com recursos financeiros provindos do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDES	14
1.2. QUÍMICA VERDE.....	18
1.2.1. TÉCNICA MINIATURIZADAS DE PREPARO DE AMOSTRAS	20
1.2.2. SOLVENTES VERDES.....	23
1.2.3. MÉTRICAS DE SUSTENTABILIDADE	27
2. OBJETIVOS.....	31
2.1. OBJETIVO GERAL.....	31
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3. ARTIGO CIENTÍFICO	32
4. DISCUSSÃO	60
4.1 PREPARO DO SOLVENTE	60
4.2 OTIMIZAÇÃO DAS ETAPAS ANALÍTICAS	60
4.3 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA	63
4.4 MÉTRICA DE SUSTENTABILIDADE	64
5. CONCLUSÕES.....	66
6. REFERÊNCIAS	67
7. ANEXO – SUPPLEMENTARY MATERIAL.....	70
7. CURRÍCULO LATTES.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

AGREEprep	do inglês Analytical Greenness Metric for Sample Preparation
AINES	Anti-inflamatórios não esteroides
COX-1	Ciclo-oxigenase 1
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
DES	do inglês Deep Eutetic Solvent / Solvente Eutético Profundo
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
GAPI	do inglês Analytical Procedure Index / Índice de Procedimento Analítico
HBA	do inglês Hydrogen Bond Acceptor / Aceptor De Ligação De Hidrogênio
HBD	do inglês Hydrogen Bond Donor / Doador De Ligação De Hidrogênio
HF-LPME	do inglês Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction / Microextração em Fase Líquida suportada por Membrana Oca
HF-MMLLE	do inglês Hollow-Fiber Membrane Microporous Liquid-Liquid Extraction
HPLC-DAD	do inglês High Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detector / Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Detector por Arranjo de Diodo
ILs	do inglês Ionic Liquids / Líquidos iônicos
LOD	Limite de Detecção

LOQ	Limite de Quantificação
MILs	do inglês Magnetic Ionic Liquids / Líquidos Iônicos Magnéticos
NSAIDs	do inglês Nonsteroidal anti-inflammatory drugs
RGB	Red-Green-Blue Model
RNA	Ácido Ribonucleico
SPMS	do inglês Sample Preparation Metric of Sustainability / Métrica de Sustentabilidade no Preparo de Amostra
SUPRAS	Solventes Supramoleculares

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Esquema representando os 12 princípios da química verde.....	19
Figura 2. Dez princípios do preparo de amostra baseado em química verde.....	20
Figura 3. Esquema dos dois modos de extração utilizando a técnica de HF-MMLLE. a) HF3-LPME: Sistema de três fases. b) HF2-LPME: Sistema de duas fases.....	22
Figura 4. Sistema semiautomatizado de 96 poços e fibra oca acoplada ao dispositivo.....	23
Figura 5. Processo de formação dos SUPRAS.....	26
Figura 6. Pictograma modelo gerado pela métrica AGREEprep.....	28
Figura 7. Pictograma modelo gerado pela métrica SPMS.....	29
Figura 8. Gráfico de superfície de resposta obtido através do desenho experimental do tipo Doehlert para avaliar o volume de amostra e o tempo de extração.....	73
Figura 9. Gráfico de superfície ternária de resposta gerado através de um planejamento simplex-centróide para avaliação da proporção dos solventes de extração.....	74

ARTIGO CIENTÍFICO

Figure 1. <i>General overview of the experimental procedure proposed in this study.....</i>	40
Figure 2. <i>Response surface obtained through a Doehlert design for the optimization of the extraction step.</i>	42
Figure 3. <i>Bar graph for the optimization of the desorption time.</i>	43

Figure 4. Bar graph for the optimization of the desorption time.	44
Figure 5. <i>Triangular surface obtained from a simplex centroid design for the optimization of the desorption solvent.....</i>	45
Figure 6. <i>Diagram obtained through the Sample Preparation Metrics of Sustainability (SPMS) for the methodology proposed in this study.....</i>	52

LISTA DE TABELAS E QUADROS

INTRODUÇÃO

Tabela 1. Estrutura química, massa molecular e log P dos compostos de interesse.....**15**

Tabela 2. Tempo de retenção encontrados para cada analito e comprimentos de onda utilizados para detecção dos compostos de interesse no sistema de cromatografia líquida.....**17**

ARTIGO CIENTÍFICO

Table 1. *Limits of detection and quantification, linear range, weighting factor, coefficients of determination and linear equation for the method developed.....47*

Table 2. *Relative recovery and precisions for the NSAIDs in urine samples.....48*

Table 3. *Comparison of the analytical features obtained with this study and other previously reported works.....50*

RESUMO

Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) são uma classe de medicamentos com efeito antipirético, analgésico e anti-inflamatório que são amplamente utilizados em todo o mundo. Pensando no impacto toxico-social do uso indiscriminado desses medicamentos, este estudo teve como objetivo desenvolver uma metodologia de preparo de amostras baseada em princípios verdes para a determinação de seis AINEs em amostras de urina, através da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD). O fluxo de trabalho experimental consistiu em uma técnica de microextração líquido-líquido com membrana microporosa oca (HF-MMLLE) usando um solvente supramolecular imobilizado nos poros de membranas de polipropileno (1 cm de comprimento). Essas membranas foram acopladas a um sistema semiautomatizado de 96 poços para permitir múltiplas extrações simultaneamente. Sob as condições otimizadas, os limites de detecção (LODs) e os limites de quantificação (LOQs) variaram de 6,06 a 30,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ e de 20 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. As faixas lineares variaram de 20 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para indometacina e diclofenaco, de 50 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para cetoprofeno e ibuprofeno, e de 100 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para naproxeno e fenoprofeno. Os coeficientes de determinação (R^2) variaram de 0,9735 a 0,9997. A precisão intradia variou de 6,13 a 20,11% e a precisão interdia variou de 2,87 a 20,72%. Os valores referentes a exatidão, em termos de recuperação variaram de 92,49 a 126,89%. Além disso, a métrica de sustentabilidade no preparo de amostras recentemente proposta (SPMS) foi empregada, resultando em uma pontuação de 8,0, considerada altamente satisfatória de acordo com os conceitos da química analítica verde.

Palavras-chave: solvente supramolecular, microextração, AINEs, membrana microporosa, preparo de amostras.

ABSTRACT

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are a class of drugs with antipyretic, analgesic, and anti-inflammatory effects widely used worldwide. This study aimed to develop an environmentally friendly and high-throughput sample preparation tool for the determination of six NSAIDs in urine samples followed by high-performance liquid chromatography coupled to diode-array detection (HPLC-DAD). The experimental workflow consisted of hollow-fiber microporous membrane liquid-liquid extraction (HF-MMLLE) using a supramolecular solvent immobilized into the porous of polypropylene hollow membranes (1 cm length). These membranes were attached to a 96-well plate system to permit multiple extractions simultaneously. Under the optimized conditions, limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) ranged from 6.06 to 30.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ and from 20 to 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. The linear ranges varied from 20 to 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ for indomethacin and diclofenac, from 50 to 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ for ketoprofen and ibuprofen, and from 100 to 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ for naproxen and fenoprofen. The coefficients of determination (R^2) ranged from 0.9735 to 0.9997. Intraday precision ranged from 6.13 to 20.11%, interday precision varied from 2.87 to 20.72%, and accuracy ranged from 92.49 to 126.89%. Moreover, the recently proposed Sample Preparation Metric of Sustainability (SPMS) was employed to evaluate the greenness of the sample preparation technique resulting in a score of 8.0, which is highly satisfactory according to the concepts of green analytical chemistry.

Keywords: supramolecular solvent, microextraction, microporous membrane, NSAIDs, sample preparation.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Anti-inflamatórios não esteroides

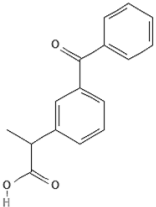
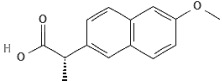
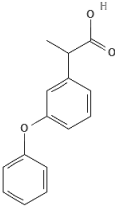
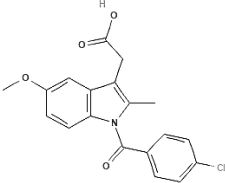
Os anti-inflamatórios não esteroides integram uma das classes de medicamentos mais utilizados mundialmente devido ao seu caráter antipirético, analgésico e anti-inflamatório. Esses medicamentos costumam ser a primeira escolha médica para pacientes grau 1 na escala de dor, classificada como leve e moderada. Seu principal mecanismo de ação se dá através da inibição da síntese das enzimas ciclo-oxigenase responsáveis pela produção das prostaglandinas, que são importantes sinalizadores de processos fisiológicos como dor, calor, rubor e demais processos relacionados à inflamação e resposta imunológica. O mecanismo de inibição dos AINEs tem ação em duas ciclo-oxigenases diferentes, sendo essas a COX-1 (que ajuda a manter o revestimento do estômago, homeostase vascular, manutenção do fluxo sanguíneo renal e demais processos fisiológicos que controlam o processo de inflamação) e a COX-2 (que tem como característica ser uma enzima indutiva, sendo responsável por produzir os mediadores durante o quadro inflamatório no organismo) (1,2).

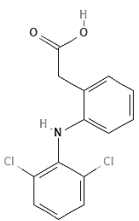
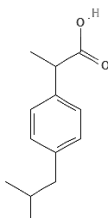
A longo prazo, o uso de AINEs pode acarretar efeitos colaterais indesejados como o acometimento do sistema gastrointestinal (3,4), sistema cardiovascular (5–7), além de lesão renal aguda induzida pela vasoconstrição (8). O uso indiscriminado desses medicamentos relacionado à automedicação evidencia um grande risco à saúde pública, apontando para a necessidade do desenvolvimento de novas técnicas analíticas mais rápidas e de fácil aplicação para a determinação dessas substâncias, visando não só o monitoramento terapêutico, mas também a aplicabilidade na rotina laboratorial. Os AINEs podem ser detectados em várias matrizes biológicas de acordo com o tempo de consumo, como por exemplo no sangue se a análise for realizada em um intervalo de tempo próximo ao uso da substância, ou então na urina, depois da droga passar por um processo de biotransformação pelo organismo.

Os AINEs têm como característica química apresentarem-se como ácidos fracos com alta capacidade de ligação com as proteínas plasmáticas, o que permite com que sejam facilmente absorvidos pelo estômago e intestino. Esses compostos podem ter ação curta no organismo, tendo meia vida de menor que seis horas como

o ibuprofeno, diclofenaco, cetoprofeno e indometacina, ou ação considerada longa, quando a meia vida do medicamento passa a ser maior do que seis horas, como é o caso do naproxeno (9). Depois de serem administrados e entrarem na corrente sanguínea, essas drogas são biotransformados pelo fígado e posteriormente são majoritariamente excretados pelo sistema renal através da urina. Na **Tabela 1** são apresentados os seis tipos de AINEs utilizados no desenvolvimento deste estudo, bem como algumas de suas características físico-químicas.

Tabela 1. Estrutura química, massa molecular e log P dos compostos de interesse.

Analito	Estrutura química	Massa Molecular (g/mol)	LogP
Cetoprofeno		254,28	3,1
Naproxeno		230,26	3,3
Fenoprofeno		242,27	3,3
Indometacina		357,80	4,3

Diclofenaco		296,10	4,4
Ibuprofeno		206,28	3,5

A detecção dos AINEs pode ser realizada através de diferentes métodos cromatográficos dependendo da intenção da análise e das características físico-químicas dos compostos trabalhados. Os métodos cromatográficos têm como princípio a separação física de misturas através de duas fases: uma estacionária e outra móvel, de maneira que a separação dos compostos ocorre por meio de repetidos processos de sorção e dessorção ao longo da fase estacionária. O nome dos sistemas cromatográficos está relacionado com o estado físico da fase móvel, assim, sistemas de cromatografia líquida trabalham com fases móveis líquidas que além de carrear os compostos analisados também atuam no processo de separação das substâncias através da sua interação. Já os sistemas de cromatografia a gás utilizam como fase móvel um gás de arraste inerte à substância de interesse, desta maneira não há interação entre a fase móvel e a amostra carregada. Em ambos os sistemas é necessário que a fase estacionária que preenche a coluna cromatográfica seja compatível com o analito estudado, de maneira que a força de interação molecular gerada seja capaz de separar e reter compostos permitindo sua detecção (10).

A escolha do sistema cromatográfico ideal para cada análise deve ser feita levando em conta a estrutura molecular dos analitos, além de características como grau de volatilidade e estabilidade térmica. Os AINEs pertencem a uma classe de mais de 20 tipos de medicamentos, que se diferem nas suas estruturas moleculares e conseqüentemente na sua ação específica ou não específica no organismo. A

determinação desses compostos pode ser realizada tanto por cromatografia líquida quanto por gasosa, entretanto, a grande maioria das análises realizadas no sistema a gás requerem que os compostos de interesse tenham alto grau de volatilidade, além de necessitarem de processos extras que demandam tempo e consumo de novos reagentes, como por exemplo a derivatização. O sistema de cromatografia líquida, além de não exigir tais demandas, ainda tem como vantagem o baixo custo de fases móveis em relação ao sistema gasoso, tornando-se a principal escolha para a realização da metodologia proposta nesse trabalho. Na **Tabela 2** é possível observar aspectos relacionados com o sistema de cromatografia líquida, como o tempo de retenção encontrado para cada analito de acordo com o método proposto, bem como os comprimentos de onda absorvidos por cada composto pesquisado.

Tabela 2. Tempo de retenção encontrados para cada analito e comprimentos de onda utilizados para detecção dos compostos de interesse no sistema de cromatografia líquida.

Analito	Tempo de Retenção (min)	Comprimento de onda (nm)
Cetoprofeno	13,31	254
Naproxeno	13,66	284
Fenoprofeno	17,18	280
Indometacina	18,57	237
Diclofenaco	19,17	280
Ibuprofeno	19,89	225

Dentre as diversas amostras biológicas utilizadas em análises toxicológicas, a urina se destaca pela sua coleta não invasiva e pelo grande volume de amostra disponível, diferente de outros tipos de matrizes complexas como o sangue, por

exemplo. A formação da urina se dá majoritariamente (95%) por água e cerca de 5% por sais inorgânicos, além de compostos orgânicos incluindo ureia, creatinina, células, proteínas, hormônios e também produtos da biotransformação gerados pelo organismo (11).

Apesar da sua composição apresentar um grande percentual de água, a urina possui diversos componentes que podem interferir na determinação dos compostos de interesse. Nesse sentido, é necessária uma eficiente etapa de preparo de amostra antes de realizar a análise instrumental buscando pré-concentrar, isolar os analitos e possibilitar um extrato mais compatível com o sistema instrumental.

1.2. Química verde

A química verde tem como conceito minimizar os impactos nocivos tanto para o meio ambiente como para o analista no que diz respeito a diversos protocolos experimentais na área química. Esse termo é uma tradução literal do inglês “Green Chemistry” preconizado em meados dos anos 90 pelos Estados Unidos através da Lei de Prevenção à Poluição, criada com objetivo de prevenir a poluição através de incentivos governamentais para que empresas agregassem mudanças economicamente efetivas na produção, operação e uso da matéria-prima. O fato é que o pensamento de preocupação e responsabilidade com a produção e geração de resíduos já vinha sendo desenvolvido mesmo antes dos anos 90 através de conferências, eventos e programas governamentais (12). São 12 os princípios que regem a química verde (**Figura 1**), todos corroborando com ações que visam aprimorar processos com o intuito de utilizar quantidades cada vez menores de produtos tóxicos e nocivos nas análises, bem como gerar uma menor quantidade de resíduos (13).

Figura 1. Esquema representando os 12 princípios da química verde.



Fonte: Esquema elaborado a partir do artigo de Galuszka et al. 2013 (13).

Entretanto, mesmo com a elaboração dos 12 princípios da química verde, ainda existia uma lacuna de implementação de técnicas mais sustentáveis nas etapas pré-analíticas existentes entre o preparo de amostras/extração e a análise instrumental. Pensando nisso, *Lopez-Lorente* e colaboradores implementaram uma cartilha com os 10 princípios verdes referentes especificamente ao preparo de amostra (**Figura 2**), preconizando a diminuição do volume de amostra, o preparo *in situ*, a redução do gasto de insumos e reagentes, minimizar o consumo de energia, o uso de materiais sustentáveis e reutilizáveis, além de incentivar o uso de solventes e reagentes menos tóxicos especificamente nessa importante etapa analítica (14).

Figura 2. Dez princípios do preparo de amostra baseado em química verde.



Fonte: Esquema elaborado a partir do artigo de *López-Lorente et al. 2022* (14).

Assim como López-Lorente e colaboradores salientam na cartilha, a química verde propõem a prevenção da produção exacerbada de resíduos, bem como a economia de átomos. Esses princípios podem ser alcançados através da elaboração de novas metodologias analíticas que utilizem menos volumes de solvente e de amostra, buscando maximizar o rendimento das análises através de técnicas miniaturizadas de extração.

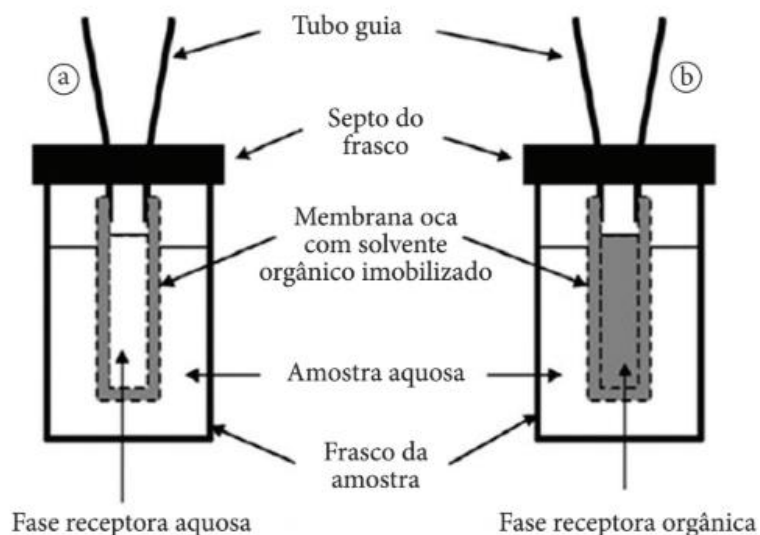
1.2.1. Técnica miniaturizadas de preparo de amostras

O preparo de amostras é a etapa mais importante em métodos analíticos pois permite uma efetiva limpeza da amostra, geralmente conhecida como *clean-up*, e maior compatibilidade com o sistema analítico, além da possibilidade de pré-concentração dos analitos. Técnicas miniaturizadas de preparo de amostra, que utilizam baixos volumes, tanto de solventes como de amostras, vêm se popularizando e ganhando cada vez mais espaço no âmbito científico. São diversas as técnicas de extração baseadas na redução de volumes.

Dente elas, cabe destacar a HF-LPME, traduzida do inglês como microextração em fase líquida suportada por fibra oca, que foi introduzida por *Pedersen-Bjergaard* em 1999 como uma adaptação da clássica microextração em fase líquida (LPME) (15). Essa técnica é baseada na utilização de uma membrana tubular porosa, cuja qual tem como vantagem a alta pré-concentração e *clean-up* de diversas matrizes, o que garante bom desempenho em amostras complexas como sangue e urina, por exemplo. A fibra é geralmente composta por polipropileno, um polímero bastante maleável, com poros que apresentam diâmetro de aproximadamente 0,2 μm . Essas características permitem o intercâmbio e a fluidez dos líquidos na qual é submersa, bem como a retenção dos analitos que possuem afinidade pelo material de sua composição ou pelo solvente impregnado nos seus poros (16).

A técnica se baseia em princípios do equilíbrio de partição entre a fase extratora e a amostra, tendo como variação um sistema de duas fases (HF2-LPME) ou três fases (HF3-LPME). A extração que ocorre no sistema de duas fases tem como pré-requisito a imiscibilidade da amostra com o solvente, de maneira que o solvente utilizado é impregnado no lúmen e nos poros da fibra (fase extratora) e esta é submersa diretamente na amostra aquosa (fase doadora), de maneira que os analitos são extraídos por difusão passiva. Já no sistema que se baseia em três fases, a membrana é previamente exposta a um solvente orgânico para que os poros sejam preenchidos, agindo como uma barreira entre o exterior e o lúmen da fibra. Assim, o sistema é configurado permitindo a extração por difusão passiva, com a amostra aquosa sendo a fase doadora, um solvente orgânico impregnado nos poros da membrana (fase orgânica) e o interior da fibra preenchido com uma solução também aquosa que irá receber os analitos, agindo como fase receptora (17). A imagem a seguir exemplifica os dois sistemas de microextração por HF-LPME, sendo o primeiro referente ao sistema HF3-LPME e o segundo referente ao sistema de duas fases.

Figura 3. Esquema dos dois modos de extração utilizando a técnica de HF-MMLLE. a) HF3-LPME: Sistema de três fases. b) HF2-LPME: Sistema de duas fases.



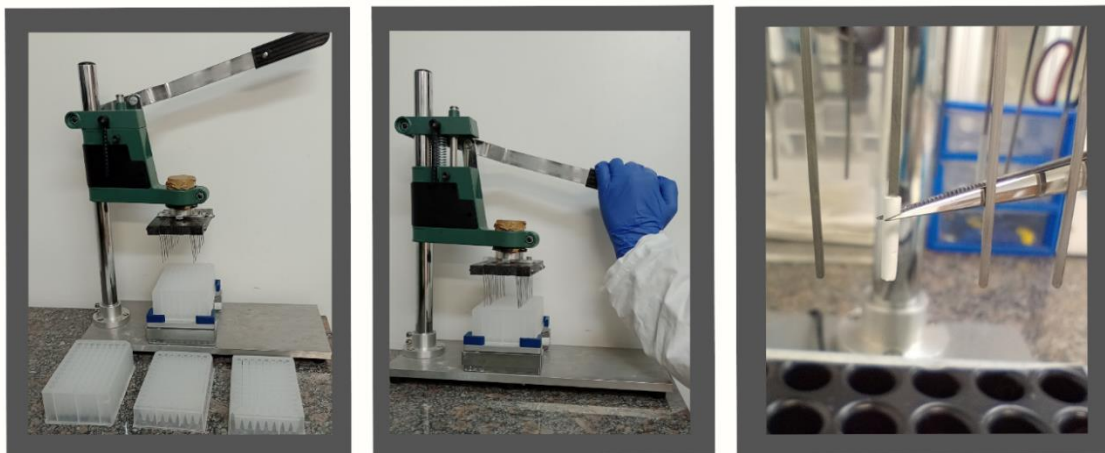
Fonte: Merib et al. 2013 (18)

Além das vantagens mencionadas anteriormente, a HF-LPME permite ainda a associação da técnica com um sistema semiautomatizado de 96 poços (do inglês *96-well plate*), permitindo a extração de diversas amostras simultaneamente e otimizando o tempo e os processos analíticos. No geral, este sistema apresenta-se como uma série de hastes de aço inoxidável nos quais podem ser fixados pequenos segmentos de membranas que podem atuar como meio no qual solventes podem ser imobilizados.

Neste trabalho, utilizou-se uma variação da técnica de HF-LPME conhecida como extração em fase líquida com fibra oca microporosa (HF-MMLLE, do inglês *hollow fiber-microporous membrane liquid-liquid extraction*). Esta configuração é baseada no sistema de duas fases, de maneira que a membrana é previamente exposta ao solvente extrator permitindo que os poros sejam preenchidos com o mesmo. Em seguida, a fibra é submersa na amostra aquosa para que os analitos sejam extraídos pelo solvente contido nos poros. Após um determinado tempo de extração, o solvente contido nos poros que já está enriquecido com os analitos é imerso em alguns microlitros de um solvente orgânico para a etapa de dessorção. Por fim, o extrato é conduzido a um sistema analítico para leitura. A seguir é

possível visualizar imagens demonstrando o sistema de 96 poços e 1 cm da fibra de polipropileno acoplada.

Figura 4. Sistema semiautomatizado de 96 poços e fibra oca acoplada ao dispositivo.



Fonte: Autora (2024).

1.2.2. Solventes verdes

Os solventes possuem papel fundamental em vários processos químicos, dispersando ou dissolvendo solutos das mais diversas maneiras e combinações, além de permitir uma maior separação e extração de compostos. Entretanto, a utilização excessiva de solventes clássicos, considerados mais tóxicos e danosos para a saúde do meio ambiente e do analista, impulsionam cada vez mais o desenvolvimento e a utilização de solventes mais verdes e sustentáveis. Nesse sentido, discute-se a necessidade do aprimoramento de técnicas com menor impacto ambiental, substituindo solventes clássicos (como diclorometano, tolueno, clorofórmio, entre outros) com alta taxa de toxicidade e inflamabilidade, por solventes que são sintetizados ou produzidos através de matérias-primas renováveis e por tecnologias mais sustentáveis (19).

São três as principais características que determinam um solvente não tradicional (ou verde): menor volatilidade, menor capacidade de se solubilizar em meio aquoso e menor taxa de toxicidade (20). Além disso, cabe destacar outras vantagens como a síntese ou produção simplificada, acessibilidade das matérias-primas, biodegradabilidade, alta performance em diferentes condições, além de boa

estabilidade. Os solventes verdes podem ser divididos em classes de acordo com suas características e propriedades, como por exemplo os líquidos iônicos, solventes eutéticos profundos e solventes supramoleculares.

Os líquidos iônicos (ILs) são sintetizados a partir de sais orgânicos que apresentam ponto de fusão menores que 100 °C. Sua composição se dá geralmente pela junção de um cátion orgânico e um ânion orgânico ou inorgânico, apresentando características como alta viscosidade e estabilidade térmica, baixa volatilidade, condutividade e miscibilidade em diferentes condições, além de capacidade de adaptação estrutural podendo apresentar hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade dependendo do grupo funcional polar ou apolar adicionado na composição (21).

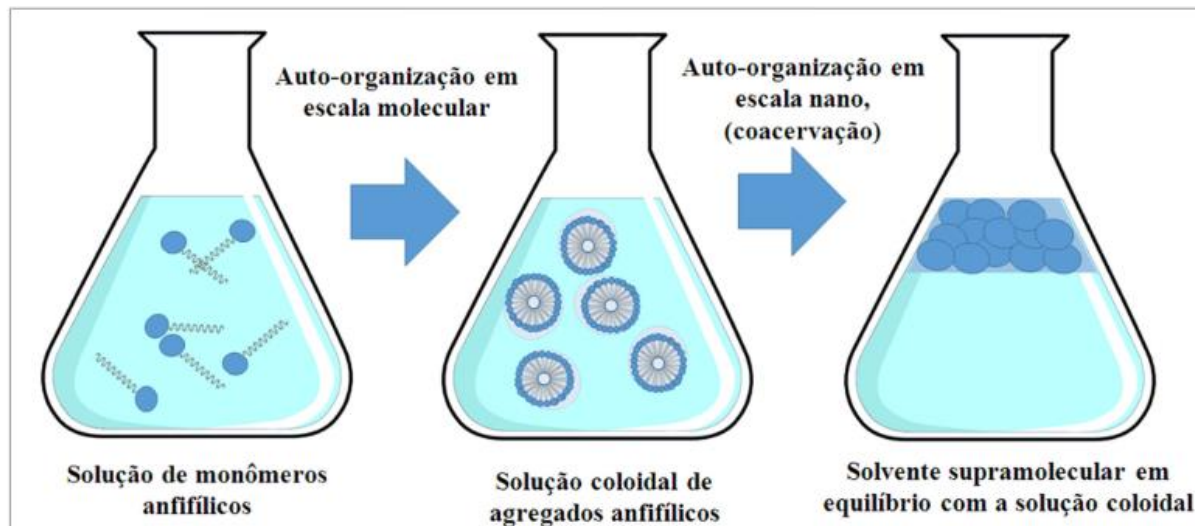
Cabe também destacar uma subclasse dos ILs que são os líquidos iônicos magnéticos (MILs), que possuem propriedades semelhantes, mas com a adição de um componente paramagnético tais como metais de transição ou lantanídeos, permitindo assim que o solvente sofra forte interação quando submetido a uma força magnética externa. Estudos recentes mostram a aplicação dos ILs e MILs para determinação de diferentes compostos como extração de fenóis, determinação de fármacos e hormônios em amostras biológicas, aplicação ambiental para auxiliar no tratamento de águas e efluentes, além da extração de DNA e RNA através de novas técnicas de microextração (21,22). Entretanto, estudos recentes envolvendo a toxicidade de alguns líquidos iônicos, têm demonstrado que alguns tipos destes solventes também podem apresentar certa toxicidade.

Os solventes eutéticos profundos (do inglês *deep eutetic solvents*, DES) têm como característica constituírem-se a partir de misturas de dois ou mais componentes sólidos ou líquidos, cuja homogeneidade resulta em solventes com menor ponto de fusão e geralmente maior densidade em comparação com os componentes primários individuais. A interação desses compostos ocorre através de ligações de hidrogênio, de maneira que um dos compostos age como doador de ligação de hidrogênio (HBD, do inglês *hydrogen bonding donor*) sendo geralmente utilizados álcoois, ácidos carboxílicos, ureia ou glicerol, e o outro como receptor (HBA, do inglês *hydrogen bonding acceptor*) sendo tipicamente utilizados produtos

à base de cloreto de colina, cloreto de tetrabutilamonio e brometo de tratributilfosfônio. Dependendo da sua composição, alguns DES passam a ser classificados como NADES (do inglês *natural deep eutectic solvents*) que são produzidos através de misturas com compostos naturais, como sacarídeos, polissacarídeos, aminoácidos, terpenos e ácidos orgânicos obtidos de fontes naturais, tornando os NADES ainda mais biodegradáveis. Uma das vantagens dos DES é que sua produção é muito versátil e simplificada, podendo ser produzidos com diversos tipos de combinações de reagentes e através de poucos passos e processos. A escolha do DES deve ser feita levando-se em consideração o procedimento experimental previsto bem como sua interação com os analitos propostos.

Por fim, destacam-se os solventes supramoleculares (SUPRAS, do inglês, *supramolecular solvents*) que são líquidos nanoestruturados com natureza anfifílica. Sua formação se dá geralmente pela associação de tensoativos com ácidos carboxílicos de cadeia longa através de um sistema auto-organizado. A produção dos SUPRAS acontece através de influências como alteração da temperatura e pH do meio, podendo ser dividida em duas etapas: primeiramente, as moléculas anfifílicas organizam suas regiões hidrofílicas e hidrofóbicas de maneira que os segmentos polares e apolares das moléculas diminuam as interações solvatofóbicas com o solvente, resultando em micelas. Posteriormente, ocorre a etapa de coacervação, que consiste na separação das fases líquidas, que só ocorre quando a concentração de moléculas anfifílicas está acima da concentração micelar crítica. Nessa etapa, as micelas se agregam formando gotas de coacervado que continuam se organizando e agregando em escalas maiores fazendo com que haja uma mudança na densidade, permitindo assim com que essa fase rica em surfactantes (SUPRA) fique na porção superior da mistura heterogênea (**Figura 5**) (23,24).

Figura 5. Processo de formação dos SUPRAS.



Fonte: *Medina et al. 2017(24).*

De acordo com a composição do solvente utilizado, as estruturas dos coacervados formados na mistura podem ganhar conformações distintas, como por exemplo micelas aquosas, micelas cilíndricas, micelas inversas ou vesículas (que são maiores em relação as micelas e conseqüentemente, apresentam maior capacidade de solubilização). Existem seis classes de surfactantes já apresentados na literatura, sendo eles: catiônicos micelares, aniônicos micelares, não-iônicos micelares, anfóteros micelares, micelas reversas de ácidos carboxílicos e vesículas de ácidos carboxílicos. Os solventes utilizados para realizar a mistura das moléculas anfífilicas permitindo a formação dos SUPRAS podem ser água, soluções aquosas de sais (hidróxido de tetrabutilamônio e cloreto de sódio, por exemplo), mistura de solventes aquosos e solventes orgânicos ou ainda solventes orgânicos puros (25).

Dentre as vantagens dos SUPRAS, cabe destacar a versatilidade e capacidade de extração desses solventes em diferentes matrizes em virtude da sua natureza anfífilica, como por exemplo detecção de herbicidas em águas e solos (26), parabenos em cosméticos (27), ocratoxinas em amostras de alimentos, além de fármacos em amostras biológicas (28).

1.2.3. Métricas de Sustentabilidade

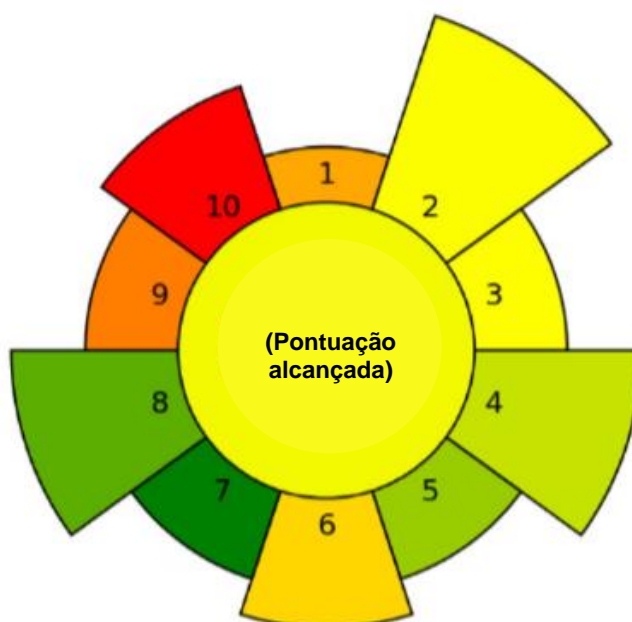
Com o desenvolvimento e a disseminação de técnicas analíticas que visam preparos e processos mais verdes, percebeu-se a necessidade de avaliar de maneira numérica o quanto essas novas metodologias realmente têm caráter sustentável. Nesse sentido, métricas de sustentabilidade foram desenvolvidas com o objetivo de avaliar o quão verde as diferentes etapas de uma metodologia analítica apresentam-se, desde a amostragem, o preparo da amostra e até mesmo a detecção e quantificação dos compostos. Existem alguns modelos distintos de métricas, com abordagens e *layouts* diferentes, mas com o mesmo enfoque no caráter quantitativo dos aspectos sustentáveis. Neste sentido, destacam-se o GAPI (do inglês *Green Analytical Procedure Index*) (29), RGB (que são as siglas das cores vermelho, verde e azul em inglês, as quais representam o desempenho analítico, a conformidade com os princípios verdes e a eficácia do método, respectivamente) (30), AGREEprep (do inglês *Analytical Greenness Metric for Sample Preparation*) (31) e SPMS (do inglês *Sample Preparation Metric of Sustainability*) (32). Abaixo serão abordadas brevemente duas das métricas que vêm sendo utilizadas para elaboração e publicação de trabalhos envolvendo metodologias voltadas à análises ambientais e toxicológicas.

A *Analytical GREENees*, ou AGREEprep, foi um dos primeiros modelos destinados a avaliar o impacto ambiental da etapa de preparo de amostras. A métrica leva em consideração os dez princípios do preparo de amostra verde e pode ser utilizada sem custos através de um site ou através de um aplicativo para celulares ou computadores. A avaliação é baseada em dez critérios, sendo praticamente todos relacionadas com o preparo de amostra, com exceção do primeiro que é sobre o pré-preparo e o nono que se refere ao pós preparo. Cada etapa possui um peso (que é demonstrado no pictograma conforme o tamanho), variando de 1 a 5 e que já são pré-definidos na métrica, entretanto, o usuário pode ajustar o peso conforme a relevância da etapa em questão para o estudo. No fim, um pictograma é gerado apresentando uma pontuação de 0 a 1, referente ao cálculo feito para cada uma das etapas avaliadas, de maneira que 1 representa o desempenho ideal. Além disso, uma escala de cor é gerada conforme o desempenho, sendo verde a melhor pontuação e cores mais quentes como

amarelo, laranja e vermelho representando baixo desempenho (**Figura 6**). As dez etapas avaliadas nessa métrica são:

1. Favorece o preparo de amostras *in situ*
2. Utiliza solventes e reagentes mais seguros
3. Prioriza a utilização de materiais sustentáveis, reutilizáveis e renováveis
4. Minimiza o desperdício
5. Minimiza o volume de amostras, de produtos químicos e de materiais
6. Maximiza o rendimento da amostra
7. Integra etapas e promove a automação
8. Minimiza o consumo de energia
9. Escolha da metodologia de detecção analítica mais ecológica possível
10. Garante procedimentos seguros para o operador

Figura 6. Pictograma modelo gerado pela métrica AGREEprep.

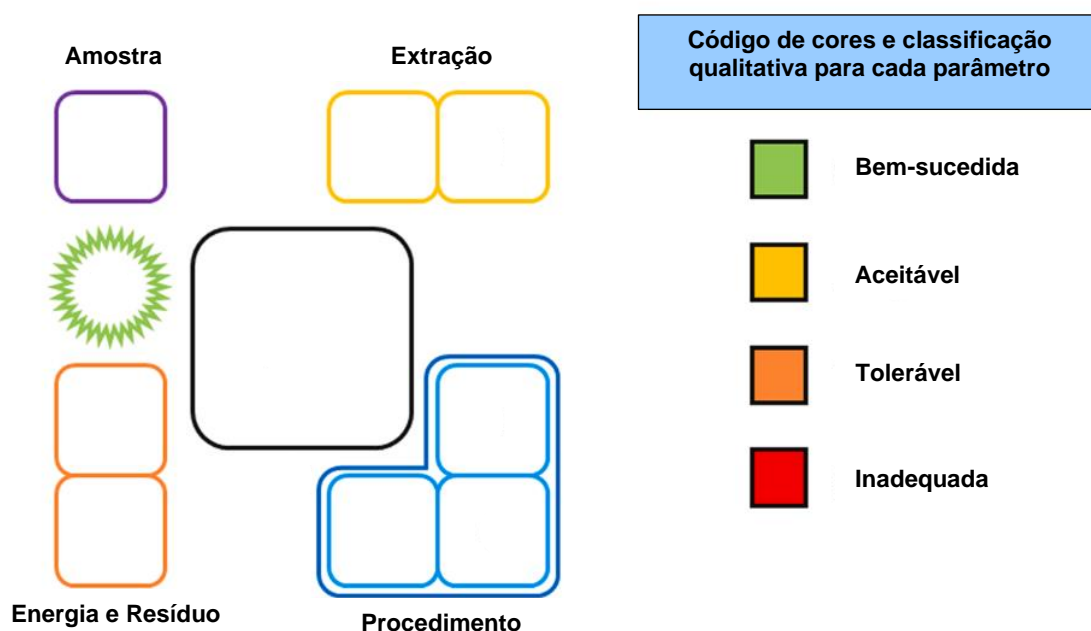


Fonte: Adaptado de *Pena-Pereira et al. 2022 (31)*.

A SPMS, do inglês *Sample Preparation Metric of Sustainability*, é outra métrica que vem ganhando notoriedade na área. Diferente das outras, essa métrica utiliza uma planilha elaborada no *software* Microsoft Excel já pré-estabelecida, o que

facilita e simplifica muito sua utilização. A avaliação consiste basicamente em cinco categorias diferentes, gerando pontuação de 1 a 10, onde o máximo significa melhor desempenho. O resultado gerado com o cálculo de todas as categorias é revelado em forma de diagrama semelhante a um relógio, sendo a pontuação geral apresentada no centro, além de exibir através de uma escala de cor o grau de sustentabilidade de cada etapa avaliada (**Figura 7**).

Figura 7. Pictograma modelo gerado pela métrica SPMS.



Fonte: Adaptado de *González-Martín et al. 2023 (32)*.

As categorias avaliadas na SPMS são:

1. Volume de amostra utilizado;
2. Informações sobre o solvente extrator, como o volume utilizado e sua natureza (natural, biodegradável, alternativo persistente ou convencional);
3. Informações sobre o procedimento – número de passos, tempo de extração e passos adicionais depois da extração (como diluição, evaporação, derivatização, etc);
4. Consumo de energia e volume de resíduo;

5. Reutilização de materiais e insumos;
6. Rendimento da amostragem – extração simultânea de mais de uma amostra.

Este estudo teve como objetivo desenvolver uma nova metodologia analítica baseada em HF-MMLLE, utilizando um solvente supramolecular como fase de extração para determinar AINEs em urina, seguido por análise de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD). Nesta abordagem, foi utilizado um sistema de 96 poços combinado com membranas de polipropileno, nas quais os poros foram preenchidos com o solvente de extração. O fluxo de trabalho experimental foi otimizado através de abordagens univariadas e multivariadas. Posteriormente, os parâmetros analíticos foram estabelecidos e a metodologia foi comparada com estudos reportados. A metodologia proposta foi elaborada para apresentar o menor impacto ambiental possível, sendo avaliada pela métrica de sustentabilidade SPMS.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver uma metodologia analítica empregando solvente supramolecular para a determinação de seis tipos de AINEs em amostras de urina através de uma técnica de microextração em membrana.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade de extração de um SUPRA a base de ácido decanóico para a determinação de AINEs em amostras de urina;
- Avaliar a capacidade de uma membrana de polipropileno em acomodar o solvente para a extração dos analitos;
- Implementar um sistema semiautomatizado para a extração simultânea de várias amostras;
- Otimizar parâmetros cromatográficos de separação;
- Otimizar as condições de extração através de planejamentos experimentais multivariados e univariados;
- Validar uma metodologia analítica para determinação de AINES baseada em HF-MMLLE;
- Determinar os parâmetros analíticos de mérito incluindo linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão;
- Avaliar a sustentabilidade do método de extração desenvolvido por meio da ferramenta SPMS;
- Aplicar o método desenvolvido na análise de amostras reais de urina.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo científico submetido na revista *Green Analytical Chemistry* (Disponível em <https://www.sciencedirect.com/journal/green-analytical-chemistry>).

Normas da revista e instruções para elaboração do artigo podem ser consultados em:

<https://www.sciencedirect.com/journal/green-analytical-chemistry/publish/guide-for-authors> .

A high-throughput sample preparation approach for the determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in urine samples through membrane-based microextraction employing a green supramolecular solvent

Sofia Aquino Monteiro^{a, b}, Camila Scheid^{a, b}, Carolina Souza Machado ^a, Josias Merib^{a, b, c*}

^a Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil.

^c Departamento de Farmacociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil.

Corresponding Author

E-mail address: josias@ufcspa.edu.br (J. Merib)

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

245, Sarmiento Leite St.

Porto Alegre RS, 90050-170

Phone: +55 51 33038883

Abstract

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are a class of drugs with antipyretic, analgesic, and anti-inflammatory effects widely used worldwide. This study aimed at developing an environmentally friendly and high-throughput sample preparation method for the determination of six NSAIDs in urine samples followed by high-performance liquid chromatography coupled to diode-array detection (HPLC-DAD). The experimental workflow consisted of hollow-fiber microporous membrane liquid-liquid extraction (HF-MMLLE) using a supramolecular solvent immobilized into the porous of polypropylene hollow membranes (1 cm length). These membranes were attached to a 96-well plate system to permit multiple extractions simultaneously. Under the optimized conditions, limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) ranged from 6.06 to 30.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ and from 20 to 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. The linear ranges varied from 20 to 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ for indomethacin and diclofenac, from 50 to 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ for ketoprofen and ibuprofen, and from 100 to 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ for naproxen and fenoprofen. The coefficients of determination (R^2) ranged from 0.9735 to 0.9997. Intraday precision ranged from 6.13 to 20.11%, interday precision varied from 2.87 to 20.72%, and accuracy ranged from 92.49 to 126.89%. Moreover, the recently proposed Sample Preparation Metric of Sustainability (SPMS) was employed to evaluate the greenness of the sample preparation technique resulting in a score of 8.0, which is highly satisfactory according to the concepts of green analytical chemistry.

Keywords: Supramolecular Solvent, Membrane-based Microextraction, NSAIDs, 96-well Plate, Sample Preparation.

1. Introduction

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) consist of a widely used class of drugs due to their antipyretic, analgesic, and anti-inflammatory properties. These drugs are the first medical choice for patients with grade-1 pain (mild to moderate) [1,2]. Their mechanism of action occurs through the inhibition of the synthesis of cyclooxygenase enzymes, responsible for the production of prostaglandins, which are important mediators of physiological processes such as pain, heat, redness and other processes related to inflammation and immune response.

According to the literature, NSAIDs inhibit the action of two different cyclooxygenases: COX-1 which is important to maintain the stomach lining, vascular homeostasis, renal blood flow, and other physiological processes that control the inflammation process; and COX-2 which is characterized as an inducible enzyme responsible for producing mediators during the inflammatory process in the body [3,4]. Long-term use of NSAIDs can lead to side effects such as gastrointestinal [5,6] and cardiovascular problems [7-9], as well as acute kidney injury induced by vasoconstriction [10].

The indiscriminate use of these drugs related to self-medication highlights a significant public health issue, emphasizing the need of faster and environmentally friendly analytical techniques for the determination of these compounds. NSAIDs can be detected in various biological matrices depending on the time after consumption. For example, blood can be an interesting choice if the analysis is performed immediately after the consumption. On the other hand, urine is a more appropriate matrix after the drug has been subjected to biotransformation in the organism [11].

NSAIDs consist of weak acids that can be easily absorbed by stomach and intestine. These compounds can exhibit short action in the organism with a half-life shorter than six hours such as ibuprofen, diclofenac, ketoprofen, and indomethacin, or long action characterized by a half-life longer than six hours such as naproxen. These drugs are biotransformed by the liver and then predominantly excreted by the renal system [12].

Among various biological samples used in toxicological analyses, urine can be highlighted because of its non-invasive collection, large availability, and lower

amount of possible interfering components compared to other complex matrices such as blood. Urine is mostly comprised of water (95%) and 5% of inorganic salts as well as organic compounds including urea, creatinine, cells, proteins, hormones, and also biotransformation products generated by the organism [13].

The analysis of urine by chromatographic systems generally requires a sample preparation step. In general, this step involves the use of extraction techniques to promote analyte pre-concentration, removal of possible interfering components permitting the injection in the analytical instrumentation. Microextraction techniques are more sustainable approaches compared to traditional techniques such as liquid-liquid extraction (LLE) and solid-phase extraction (SPE). These techniques exhibit analytical features associated with the principles of green analytical chemistry [14,15]. They have been successfully applied in numerous studies involving biological samples offering environmentally friendly processes and reducing risks to human health.

Membrane-based microextraction approaches are important configurations of sample preparation techniques. These approaches were firstly exploited by Pedersen-Bjergaard et al. in 1999 with hollow-fiber liquid-phase microextraction (HF-LPME). In a first configuration, an organic solvent (1-octanol) was immobilized into the porous of a polypropylene hollow fiber to create a supported liquid membrane (SLM). This SLM was used to separate the aqueous sample (donor solution) and an acidic acceptor solution forming a three-phase system. Therefore, the acceptor solution was capable of trapping the analytes after the migration through the membrane [16]. Other configurations have been proposed, including a two-phase setup in which the solvent immobilized into the pores is also introduced in the lumen of the hollow fiber to extract the analytes from aqueous samples [17]. Moreover, hollow-fiber membrane microporous liquid-liquid extraction (HF-MMLLE) is an alternative configuration in which an extraction solvent is immobilized only into porous of a hydrophobic membrane.

More recently, greener solvents have been investigated in microextraction approaches. In this regard, supramolecular solvents (SUPRAS) have demonstrated low volatility and toxicity which is particularly interesting for extraction solvents. SUPRAS exhibit amphiphilic characteristics that is advantageous for the extraction

of compounds with varied physico-chemical properties. They are nanostructured liquids obtained as follows: firstly, amphiphilic molecules organize their hydrophilic and hydrophobic regions forming micelles through intermolecular forces in order to reduce the solvation layer with the solvent; subsequently, the coacervation stage occurs which consists of the separation of liquid phases through the self-organization of these structures [18]. SUPRAS proved to be a promising alternative for the extraction of various analytes in different types of matrices due to their excellent extraction efficiency and chemical stability [19-25].

Another important aspect of modern analytical methodologies is the possibility of processing numerous samples simultaneously. In this case, high-throughput systems are gaining significant attention in the last years. These strategies are important not only for research purposes but also for routine analysis. Particularly, automated or semiautomated workflows have been successfully employed in association with microextraction techniques to provide sustainable and rapid methodologies [26].

Considering the development and improvements of analytical techniques toward greener strategies, sustainability metrics have been developed to quantify the greenness of analytical methodologies. The Sample Preparation Metric of Sustainability (SPMS) is a simple tool recently developed to examine the sample preparation step, and it is typically performed with aid of an electronic spreadsheet. The evaluation consists of five different categories, generating scores from 1 to 10, where the maximum score indicates better performance. The result generated from the calculation of all categories is displayed in a clock-like diagram, with the overall score presented in the center, as well as showing the degree of "greenness" or sustainability of each evaluated stage through a color scale [27].

This study aimed at developing a novel and high-throughput analytical methodology based on HF-MMLLE using a supramolecular solvent as extraction phase to determine NSAIDs in human urine followed by high-performance liquid chromatography coupled to diode-array detection (HPLC-DAD) analysis. In this approach, a 96-well plate system was used combined with polypropylene membranes in which the pores were filled with the extraction solvent. The experimental workflow was optimized through univariate and multivariate

approaches. Afterward, the analytical parameters of merit were established, and the methodology was compared with previously reported studies. Furthermore, the greenness of the sample preparation step was determined using the recently proposed SPMS.

2. Material and methods

2.1 Chemicals and Reagents

Analytical standards (>98.5%) for ketoprofen (Keto), ibuprofen (Ibu), diclofenac (Diclo), fenoprofen calcium salt hydrate (Feno), indomethacin (Indo), and naproxen (Nap) were purchased from Sigma-Aldrich (Milwaukee, USA). Acetonitrile (ACN), methanol (MeOH) and ethyl acetate (EtAc) HPLC-grade were provided by Merck (Darmstadt, Germany). Stock solutions of each analyte were prepared at concentration of 1000 mg L⁻¹ by dissolving 1 mg of the solid standards in methanol (MeOH). Subsequently, stock solutions containing a mixture of the six analytes were prepared by appropriate dilution of analytical standards in MeOH. All the stock solutions were stored at freezer in - 20 °C. Ultrapure water was obtained from a Milli-Q purification system by Millipore (Bedford, USA). The SUPRA was prepared using decanoic acid (>95%) obtained from Neon Commercial (São Paulo, Brazil), hydrochloric acid, and tetrahydrofuran HPLC-grade were obtained from Sigma-Aldrich (Milwaukee, USA). The polypropylene (PP 300/1200 Accurel®) microporous hollow fiber membrane (300 µm wall thickness, 1.2 mm inner diameter, 0.2 µm pore size) was obtained from Membrane (Wuppertal, Germany).

2.2 Instrumental conditions

The chromatographic analyses were conducted using a Prominence LC-20AT high-performance liquid chromatograph coupled with a diode array detector (HPLC-DAD) from Shimadzu (Kyoto, Japan). Automatic injections of 20 µL were performed with a SIL-20A autosampler also obtained from Shimadzu. Separations were carried out employing a C18 chromatographic column (4.6 mm x 250 mm; 5 µm) obtained from Restek (Pennsylvania, USA) with oven temperature maintained at 30 °C. The mobile phase was comprised of 0.1% (v/v) acidified water (A) and ACN (B), and the separation was conducted using a gradient concentration mode varying from 40%

to 95% (v/v) of B as follows: starting with 40% of B, the concentration of B raised to 50% from 0.01 to 3 min, and this condition was maintained up to 4 min. From 4 to 9 min, the concentration of B was increased to 60% and kept up to 10 min. Afterward, from 10 to 15 min, the concentration of B was increased to 80% and kept up to 16 min. Finally, from 16 to 20 min, the concentration of B was increased to 95% of B and maintained up to 24.5 min. After this gradient, the initial condition was established.

The flow rate of mobile phase was 0.8 mL/min. Some physico-chemical properties of the analytes, as well as the wavelengths used for the detection are shown in **Table S1** of the Supplementary Material. The LCSolution software (Shimadzu) was used for data treatment.

2.3 Preparation of the supramolecular solvent

In this study, the supramolecular solvent was prepared as inverted hexagonal aggregates of decanoic acid (DeA) based on previous study [25]. In this regard, 6.5 g of DeA were weighed and dissolved in 80 mL of a 10 mM hydrochloric acid solution. Then, 4.2 mL of tetrahydrofuran were added to promote the coacervation phase. The mixture was stirred for 5 min and centrifuged at 3500 rpm for 10 min. The formation of two phases was observed, and the upper phase containing the supramolecular solvent was collected. Using this procedure, approximately 20 mL of solvent were obtained, and stored in a glass vial at 4 °C. This solvent was stable for a month without loss of extraction efficiency.

2.4 Samples

For the optimization and validation steps, a drug-free (blank) human urine sample was collected from healthy volunteers who declared not to have used any NSAIDs or similar compounds. Two hundred μ L of the blank urine were diluted in 3.8 mL of ultrapure water and spiked with the standard solution to achieve the desired concentration of each analyte, and then subjected to extractions following the methodology proposed in this study. After the determination of the analytical parameters of merit, some urine samples were provided by volunteers from our research group to evaluate the applicability of the methodology. All samples were

collected in appropriate flasks and stored at 4 °C to prevent degradation, proteolysis, and possible bacterial proliferation.

2.5 Experimental Procedure

The experimental procedure was based on a hollow fiber-microporous membrane liquid-liquid microextraction (HF-MMLLE) using 1 cm length polypropylene hollow fibers. The membranes were cleaned with acetone under sonication for 10 min. Subsequently, the membranes were attached to the pins of a 96-well plate sampler as shown in **Fig. S1** of the Supplementary Material. Then, the supramolecular solvent (decanoic acid) was immobilized into the porous of the polypropylene membranes for 10 min. Related to this impregnation time, a previous evaluation was carried out by weighing the polypropylene membrane before and after immobilizing the solvent using different times (10, 20 and 30 min). It was observed that the membrane weight did not change after 10 min of immersion into the solvent. Therefore, the complete impregnation into the porous was achieved within 10 min.

Afterward, the set of membranes filled with the supramolecular solvent (about 20 μL) was inserted into the urine samples for 100 min during the extraction step at room temperature and under stirring (200 rpm). Following, a desorption step was performed using a 100 μL of a mixture of acetonitrile and ethyl acetate (75:25 v/v) in which the membranes enriched with the analytes were immersed under stirring for 20 min directly on insert. A volume of 20 μL of the extract was injected into the HPLC-DAD system. A diagram of the optimized experimental workflow is shown in **Fig. 1**.

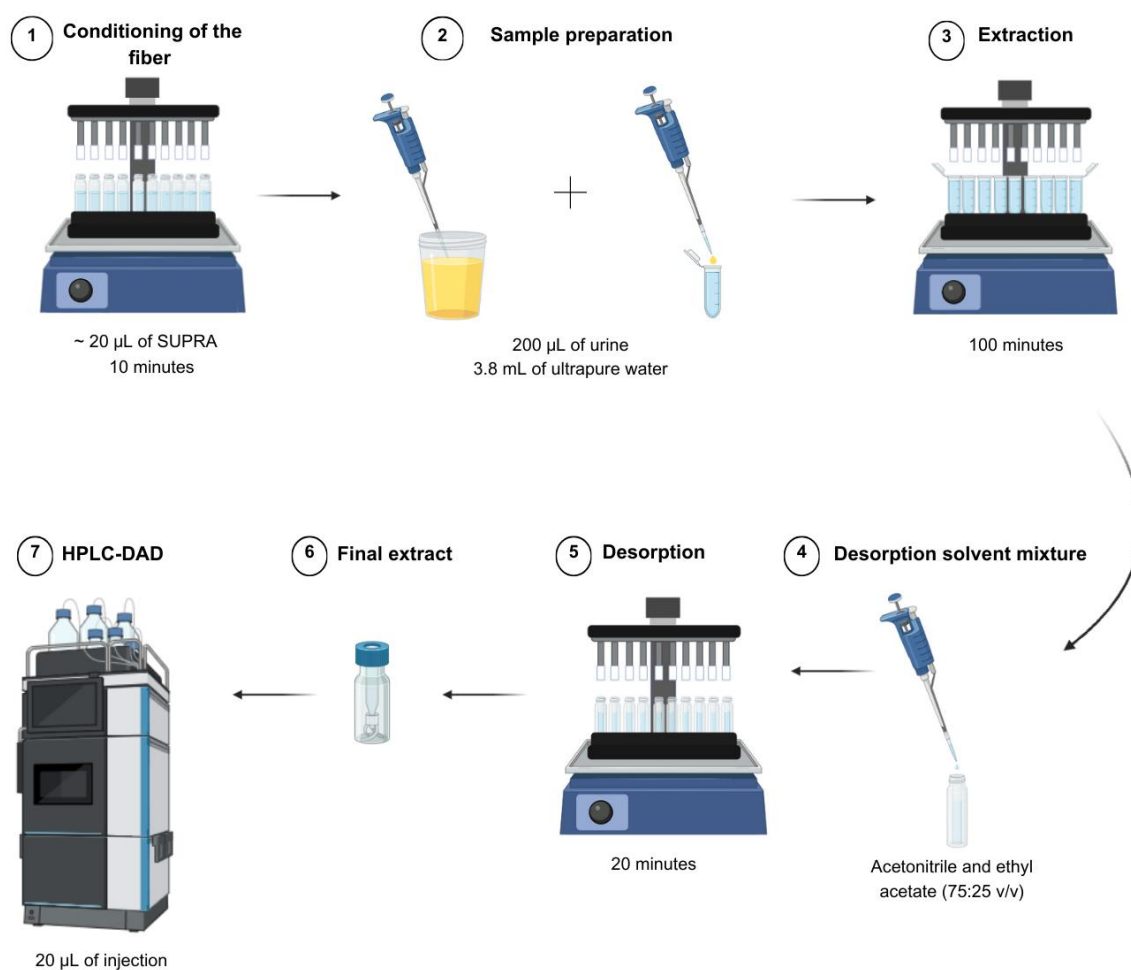


Figure 1. General overview of the experimental procedure proposed in this study.

2.6 Optimization of the experimental conditions

Univariate and multivariate strategies were adopted to obtain the best experimental conditions for the methodology proposed in this study. Optimization was carried out in three main stages: a) sample dilution, b) extraction step (extraction time and sample volume), and c) desorption step (type of solvent and desorption time). In the optimization steps, blank urine samples spiked with 500 µg/L of each analyte were used. Statsoft Statistica 10 (Statsoft, USA) and Microsoft Excel 2016 (Microsoft, USA) were used for the statistical evaluation. The matrices containing experiments performed for both Doehlert and simplex centroid designs are shown in Supplementary Material (Tables S2 and S3).

2.7 Method validation

The methodology was validated according to the guidelines of the Association of Official Analytical Collaboration (AOAC) International [28]. Limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), linearity, intra and interday precisions, and accuracy (recovery) were assessed. A calibration curves were performed for each analyte, with each concentration evaluated in triplicate. The coefficients of determination (R^2) were calculated based on the calibration curves, which were tested for homoscedasticity. The first concentration of the linear range was adopted as LOQ. LOD was obtained by dividing LOQ by 3.3. It is worth mentioning that the LOQs for the analytes were experimentally determined through extractions in triplicate, with coefficients of variation $\leq 20\%$ being considered satisfactory. Regarding recovery (accuracy), intraday and interday precisions were evaluated at 3 concentrations (low, medium, and high) for each analyte. The low concentration refers to LOQ values according to each analyte, and the medium and high concentration were respectively $500 \mu\text{g L}^{-1}$ and $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ for all analytes. Three extractions were performed on the same day to assess intraday precision ($n = 3$), and three assays each day were performed in three different days to estimate interday precision ($n = 9$). Seven real samples, donated by volunteers, were analyzed to evaluate the applicability of the developed method.

3. Results and discussion

3.1 Optimization of the experimental conditions

3.1.1 Sample dilution

Urine is a complex biological matrix that requires a proper sample preparation step prior to the instrumental analysis. Firstly, the evaluation of sample dilution was carried out using blank samples spiked with $500 \mu\text{g L}^{-1}$ of each analyte to determine the best condition for the extraction. The methodology features a simple and rapid sample preparation process, requiring only a dilution step prior to the extraction, which is performed directly on the vials of the 96-well plate of the semi-automatic system. Samples were prepared sequentially, with all dilutions carried out side by side with the addition of ultrapure water. In this regard, a univariate design using three dilutions were examined: 5-fold, 10-fold, and 20-fold dilution. Considering the

chromatographic peak areas of the analytes, 20-fold dilution exhibited the best extraction efficiency for analytes as shown in **Fig 2**. Therefore, this condition was adopted for the next experiments.⁵

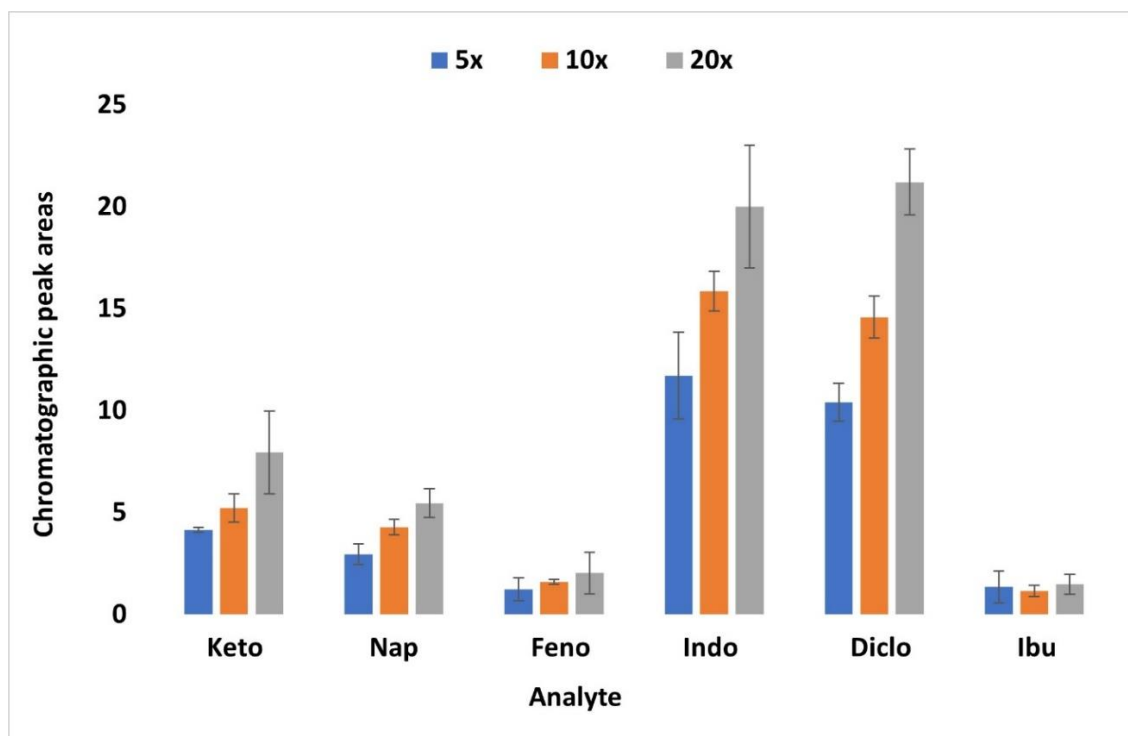


Figure 2. Bar graph for the optimization of sample dilution.

3.1.2 Optimization of the extraction step

In this step, a Doehlert design, including a triplicate in the central point, was used to assess the best condition regarding sample volume and extraction time. In this case, the geometric means of the chromatographic peak areas of the analytes were used as analytical response to establish the statistical model of the optimized condition. Three sample volumes (3.5, 4.0, and 4.5 mL) and five extraction times (40, 60, 80, 100 and 120 min) were examined. The response surface obtained with this optimization is shown in **Fig. 3**. In this case, this contour plot indicates in red the region with the best analytical response.

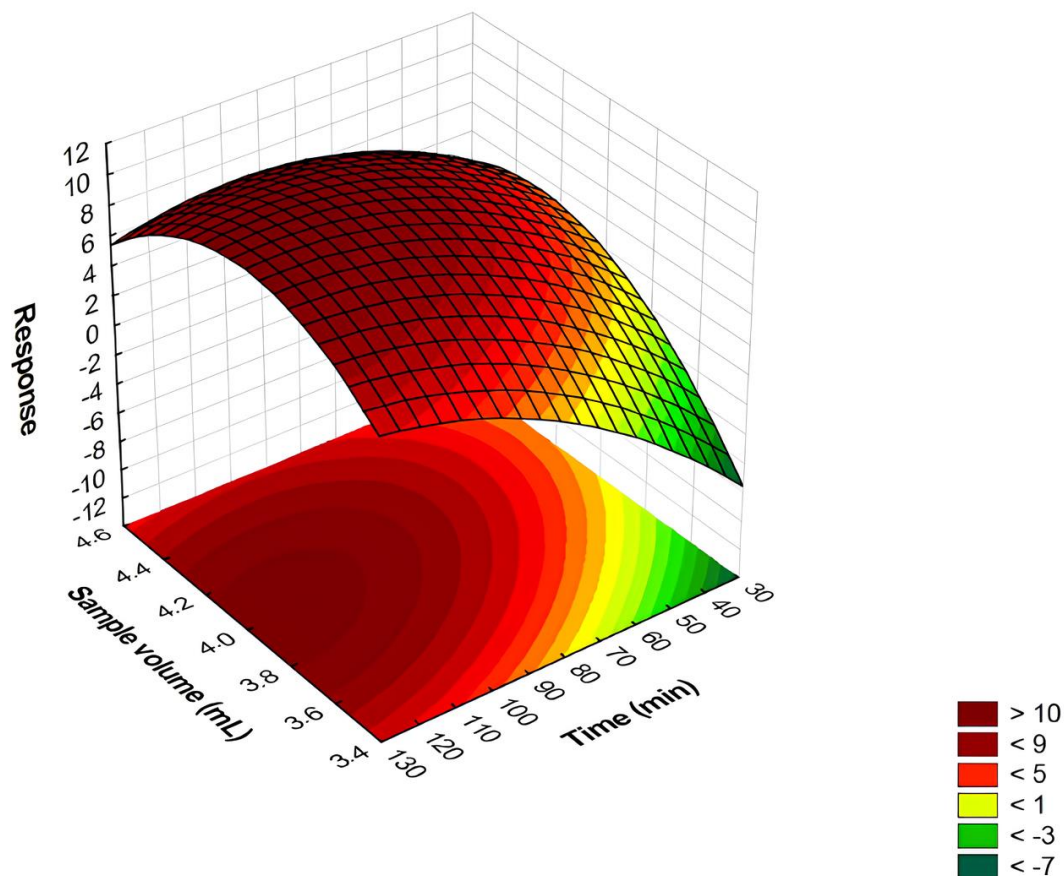


Figure 3. Response surface obtained through a Doehlert design for the optimization of the extraction step.

According to **Fig. 3**, it was possible to observe that sample volume of 4 mL and extraction time of 100 min permitted to achieve significant chromatographic responses. It is worth mentioning that longer extraction times also provided satisfactory responses. However, 100 min were chosen to increase the sample throughput since offered satisfactory responses for the extraction of the analytes. The statistical model exhibited significance with $R^2 = 0.9859$ for the methodology. No lack of fit was observed considering 95% of confidence level. ANOVA table of this experimental strategy is shown in **table S4** of the Supplementary Material.

3.1.3 Optimization of the desorption step

The optimization of the desorption step was performed considering solvent composition and desorption time. Particularly, desorption times were evaluated

through a univariate strategy using 10, 20, and 30 min (in triplicate) and ACN was initially used as desorption solvent in this step. Taking into account the chromatographic peak areas, it was observed that the best desorption condition was achieved with 20 min as shown in **Fig 4**. Curiously, desorption using 30 min exhibited a significant decrease in analytical response, this fact may be due to a possible re-extraction of analytes by the microporous membrane in longer times.

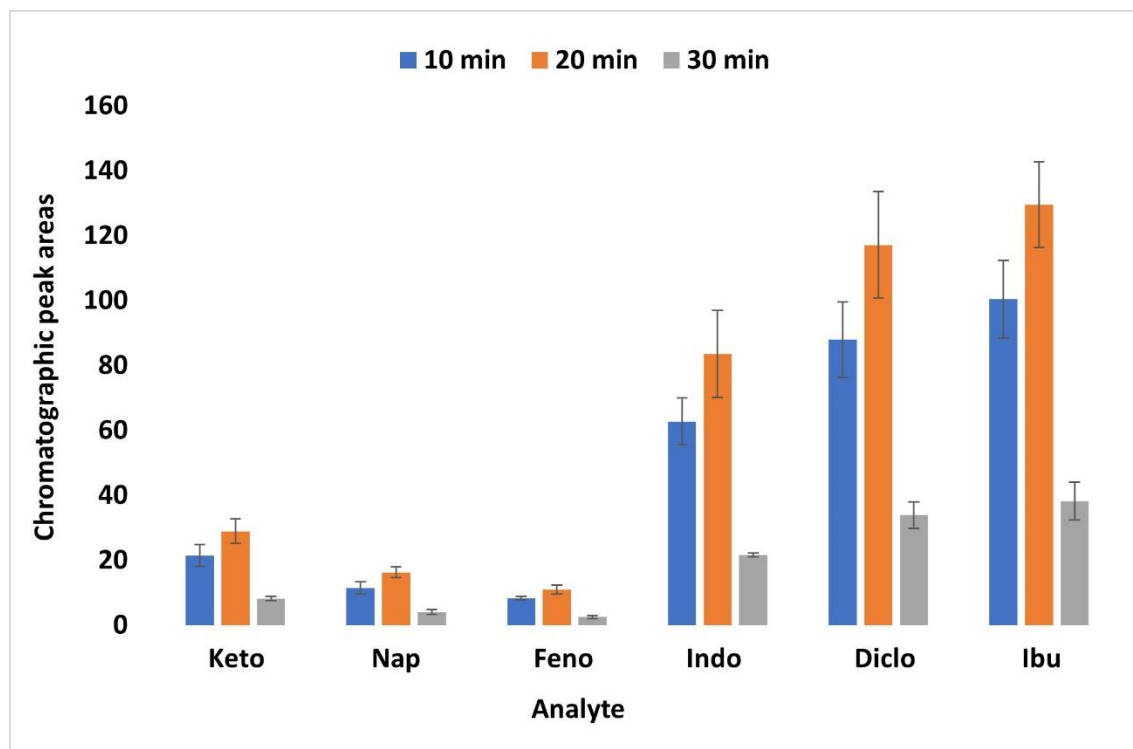


Figure 4. Bar graph for the optimization of the desorption time.

Regarding the solvent composition, a simplex centroid design was employed using ACN, MeOH, EtAc, and their mixtures. Extractions were performed according to the previously optimized parameters using sample volume of 4.0 mL, extraction time of 100 min, and desorption time of 20 min. According to the triangular surface obtained in **Fig. 5**, it can be observed that the best composition of solvent was based on 75% of ACN and 25% of EtAc that corresponds to the region with the highest analytical response in red. More specifically, a quadratic model was employed with $R^2 = 0.9768$ that exhibited statistical significance and no lack of fit using 95% of confidence level. In this case, 100 μL of a mixture containing 75% of ACN and 25%

of EtAc was employed in this step and adopted for further experiments. ANOVA table of this optimization is shown in **table S5** of the Supplementary Material.

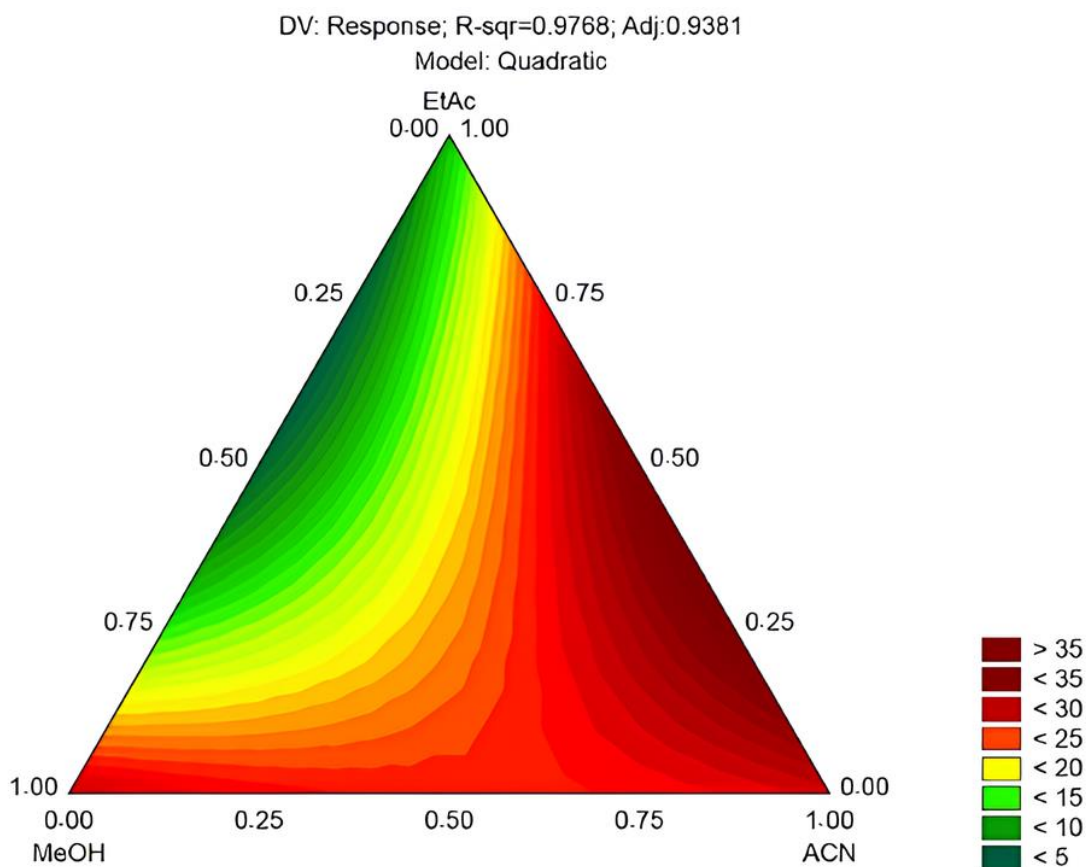


Figure 5. Triangular surface obtained from a simplex centroid design for the optimization of the desorption solvent.

3.2 Analytical parameters of merit and analysis of real samples

The analytical parameters of merit were obtained considering the previously optimized experimental conditions. Calibration curves were performed with five concentrations in triplicate for each target compound. The linear ranges were obtained from 20 to 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ for indomethacin and diclofenac, 50 to 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ for ketoprofen and ibuprofen, and 100 to 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ for naproxen and fenoprofen. The calibration curves were heteroscedastic for all analytes and weighting factors of $1/x$ and $1/y^2$ were used. Chromatograms of the analytes and their respective

wavelengths evaluated are shown in **Fig S2** of the Supplementary Material. The coefficients of determination (R^2) were greater than 0.9735, and LODs and LOQs ranged from 6.06 to 30.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ and from 20 to 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. Intraday precision ranged from 6.13 to 20.11%, and interday precision varied from 2.87 to 20.72%. Regarding accuracy, results ranging from 92.49 to 126.89% were obtained. In this evaluation, a blank urine from a male volunteer was used and spiked with known concentrations of the analytes. All analytical figures of merit obtained in this study are shown in **Table 1** and **Table 2**.

Table 1. Limits of detection and quantification, linear range, weighting factor, coefficients of determination and linear equation for the method developed.

Analyte	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Linear range ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Weighting factor	R ²	Linear equation
Keto	15.2	50.0	50 - 1000	1/x	0.984	$y = 0.040x - 1.262$
Nap	30.3	100.0	100 - 1000	1/x	0.992	$y = 0.028 x - 1.475$
Feno	30.3	100.0	100 - 1000	1/y ²	0.999	$y = 0.020 x - 0.699$
Indo	6.06	20.0	20 - 1000	1/x	0.974	$y = 0.140x - 2.276$
Diclo	6.06	20.0	20 - 1000	1/x	0.986	$y = 0.166 x - 3.700$
Ibu	15.15	50.0	50-100	1/x	0.995	$y = 0.225 x - 9.515$

Table 2. Recovery and precisions for the NSAIDs in urine samples.

Analyte	Spiked concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recovery (%) n = 3	Precision (RSD, %)	
			Intraday (n = 3)	Interday (n = 9)
Keto	50	114.72	15.50	11.50
	500	106.53	10.45	15.05
	1000	97.04	12.61	15.51
Nap	100	106.79	13.33	7.49
	500	100.73	8.52	15.40
	1000	93.24	12.39	20.72
Feno	100	101.10	15.48	10.59
	500	99.38	7.44	13.94
	1000	102.78	9.80	17.94
Indo	20	120.68	8.52	2.87
	500	92.49	7.90	11.37
	1000	93.90	11.20	18.28
Diclo	20	126.89	9.55	6.28
	500	102.92	8.37	14.94
	1000	102.64	11.18	17.85
Ibu	50	113.39	20.11	6.16
	500	99.00	6.40	12.77
	1000	103.23	6.13	14.26

After the optimization and validation steps, the methodology proposed in this study was applied to analyze seven urine samples donated by volunteers of our research group. The analytes were not detected in those samples. In terms of analytical performance, the results obtained were satisfactory, since the methodology requires low volumes of solvent and sample, consequently reducing waste and environmental impacts. Additionally, this methodology employs the use of a greener solvent compared to traditional organic solvents used in analytical extractions.

The approach proposed in this work is particularly interesting because only a small amount of solvent is immobilized into the porous the membrane, without requiring any solvent in the lumen of the hollow fiber. Therefore, the solvent consumption is lower compared to traditional HF-LPME configurations. For example, a three-phase configuration of HF-LPME requires an additional solution (generally aqueous acceptor solution) in the lumen of the hollow fiber. Moreover, a two-phase configuration of HF-LPME also requires an additional volume of solvent (same solvent immobilized into the porous) in the lumen of the hollow fiber.

Table 3 contains some of the analytical features of this methodology compared to other previously reported studies for the determination of NSAIDs. Despite offering some higher LOQs than other works, the methodology based on HF-MMLLE followed by HPLC-DAD proposed in this study exhibits important advantages regarding the use of a supramolecular solvent as greener alternative to traditional organic solvents (such as chloroform) for the extraction step. Moreover, HPLC-DAD consists of a cheaper alternative than more sophisticated analytical instruments coupled to mass spectrometry detectors. Therefore, this approach is a cost-effective and safer alternative to be employed in toxicological analysis. Other valuable aspect is related to the analysis throughput, since the extraction apparatus is capable of processing up to 96 samples simultaneously which is important also for routine analysis.

Table 3. Comparison of the analytical features obtained with this study and other previously reported works.

Analyte	Sample matrix	Extraction solvent	Sample preparation technique	Time needed for extraction (min)	Number of the samples extracted simultaneously	Instrumentation	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Reference
Carbamazepine, Ibu and Diclo	Water and sediment	SUPRA (DeA/THF/H ₂ O)	Solid-phase extraction	30	1	UHPLC-UV	1250	[21]
Ibu, nap and keto	Fish tissue	SUPRA (DeA/THF/H ₂ O)	VA-DLLME ¹	> 15	1	LC-MS/MS	1.7 - 3.3	[25]
Ibu, nap and diclo	Urine and plasma	Chloroform	AA-LLME ²	10 – urine 20 – plasma	1	GC-FID	0.21 - 9.2 urine 0.84 - 37.0 plasma	[29]

Ibu, diclo, nap, keto and pregabalin	Urine	Polymeric membrane	FPSE ³	> 40	1	GC-MS	4.9 – 16	[30]
Ibu, nap, keto, diclo, indo, 2- naphthoic acid, Flurbiprofen and etodolac	Surface water	Chloroform	USAEME ⁴	> 8.5	1	GC-MS	0.0050 - 0.010	[31]
Diclo, keto, flurbiprofen and mefanamic acid	Bovine milk	Deep eutectic solvent	LLME ⁵	> 11	1	HPLC-MS/MS	-	[32]
Keto, nap, feno, indo, diclo and ibu	Human Urine	SUPRA (DeA/THF/H ₂ O)	HF-MMLLE	120	Up to 96	HPLC-DAD	20 - 1000	This study

¹ VA-DLLME: Vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction

² AA-LLME: Air-assisted liquid-liquid microextraction

³ FPSE: Fabric phase sorptive extraction

⁴ USAEME: Ultrasound-assisted emulsification microextraction

⁵ LLME: Liquid-liquid microextraction

3.3 Greenness evaluation

In order to obtain a comprehensive evaluation of the green aspects of this methodology, the recently proposed Sample Preparation Metric of Sustainability (SPMS) [27] was employed. The metric is based on four categories with different weights to assess the relative impact on the sustainability of the sample preparation analytical method, as follows: 1) sample information; 2) information about the solvent used (type and amount); 3) analytical procedure; and 4) energy consumption and waste. SPMS is based on a score of up to 10 points; therefore, 10 consists of the best in terms of sustainability. Additionally, there is a color diagram indicating whether the parameters analyzed in each category are successful (green), acceptable (yellow), tolerable (orange), or inadequate (red). In this study, a score of 8.0 was obtained as shown in **Fig. 6**.

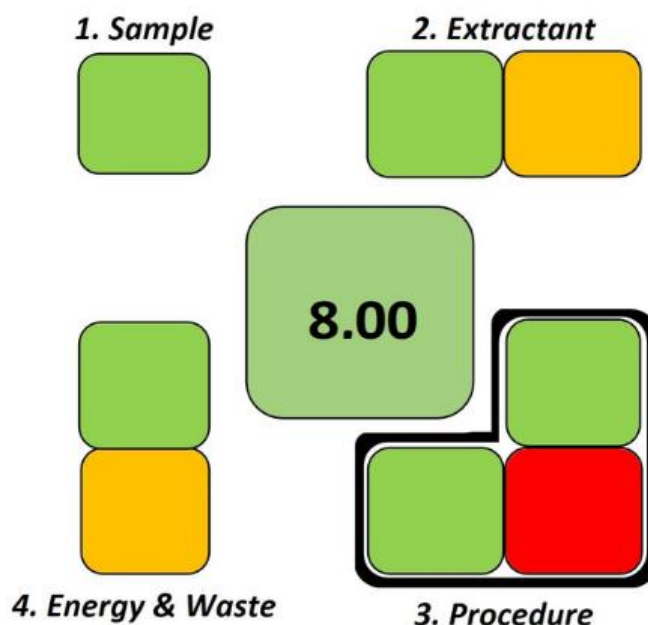


Figure 6. Diagram obtained through the Sample Preparation Metrics of Sustainability (SPMS) for the methodology proposed in this study.

According to this figure, very satisfactory scores were obtained particularly regarding the sample volume, and type/amount of solvent used. In this case, the supramolecular solvent produced for this methodology consists of an "alternative

degradable" type of compound. Additionally, this methodology also achieved very satisfactory scores related to energy consumption and waste, and regarding the analytical procedure. Importantly, the use of a 96-well plate system in which up to 96 samples can be examined simultaneously achieved significant score. On the other hand, a long extraction time of 100 min consists of a drawback of this methodology. However, this sample preparation methodology with a high global score of 8.0 can be considered sustainable and environmentally friendly. This advantage becomes even more evident when compared to other analytical methodologies using traditional solvents and less sustainable techniques as shown in **Fig.S3** of the Supplementary Material. In this case, analytical methodologies based on ultrasound-assisted emulsification microextraction, and air-assisted liquid-liquid microextraction obtained global scores of 5.89 and 6.00, respectively. Additional information related to the SPMS of this methodology and a comparison with global scores of other analytical methodologies are shown in Supplementary Material (**Tables S6 – S10**).

4. Conclusion

An environmentally friendly analytical methodology based on supramolecular solvent was successfully developed and optimized for the determination of six NSAIDs in human urine. According to our knowledge, this is the first study reporting the combination of HF-MMLLE and supramolecular solvent using a semiautomated system comprised of 96-well plate. The production of the supramolecular solvent used in this study was simple and straightforward, and a low volume was required for each extraction. Despite a long extraction time, this methodology features simple application, high-throughput and low-cost. On the other hand, a manual labor is necessary to promote the movements of the extraction platform which consists of a limitation of this experimental workflow. Importantly, this study contributed to propose a sustainable analytical strategy that can replace other methodologies that employ toxic organic solvents as extraction phases in toxicological analysis. Therefore, this strategy may offer a suitable possibility to be also exploited in environmental and food matrices.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

Authors are grateful to the Brazilian governmental agency Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) for the financial support that made this research possible with particular thanks to Central Analítica Laboratory (UFCSPA) for providing some instruments used in this study.

References

- [1] S.M. Ford, S.S. Roach, Roach's Introductory Clinical Pharmacology, Lippincott Williams & Wilkins, 11th ed., (2010).
- [2] J.S.L. Soares, A.M. Pereira, T. da C. Alexandrino, A.L. da S. Pereira, S.O. do C. Queiroz, A.S. Freitas, Creation of Booklet-Like Educational Technology for Pharmaceutical Follow-up in Pain Control in Cancer Patients, *Research, Society and Development* 12 (2023), <https://doi.org/10.33448/rsd-v12i1.39855>.
- [3] M.O.E. Hilário, M.T. Terreri, C.A. Len, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Cyclooxygenase 2 inhibitors, *J. Pediatr (Rio J)*. 82 (2006), <https://doi.org/10.2223/JPED.1560>.
- [4] L.L. Brunton, R. Hilal-Dandan, B.C. Knollmann, *The Pharmacological Basis of Goodman and Gilman Therapy*, 13th ed., (2018).
- [5] L. McEvoy, D.F. Carr, M. Pirmohamed, Pharmacogenomics of NSAID-Induced Upper Gastrointestinal Toxicity, *Front. Pharmacol.* 12 (2021) 1-15, <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.684162>.
- [6] J.Q. Yuan, K.K.F. Tsoi, M. Yang, J.Y. Wang, D.E. Threapleton, Z.Y. Yang, B. Zou, C. Mao, J.L. Tang, F.K.L. Chan, Systematic review with network meta-analysis: Comparative effectiveness and safety of strategies for preventing NSAID-associated gastrointestinal toxicity, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 43 (2016) 1262–1275, <https://doi.org/10.1111/apt.13642>.
- [7] A.M. Schjerning, P. McGettigan, G. Gislason, Cardiovascular effects and safety of (non-aspirin) NSAIDs, *Nat. Rev. Cardiol.* 17 (2020) 574–584, <https://doi.org/10.1038/s41569-020-0366-z>.
- [8] T. Grosser, E. Ricciotti, G.A. FitzGerald, *The Cardiovascular Pharmacology of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs*, *Trends Pharmacol. Sci.* 38 (2017) 733–748, <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.05.008>.

- [9] P. Gurbel, U. Tantry, S. Weisman, A narrative review of the cardiovascular risks associated with concomitant aspirin and NSAID use, *J. Thromb. Thrombolysis*. 47 (2019) 16–30, <https://doi.org/10.1007/s11239-018-1764-5>.
- [10] G.N.C. Lucas, A.C.C. Leitão, R.L. Alencar, R.M.F. Xavier, E.D.F. Daher, G.B. Da Silva, Pathophysiological aspects of nephropathy caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs, *Braz. J. Nephrol.* 41 (2019) 124–130, <https://doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-2018-0107>.
- [11] C.D. Klaassen, J.B. Watkins III, *Essentials of Toxicology*, McGraw Hill Professional, 2nd ed., (2010).
- [12] K.R. Olson, *Poisoning and drug overdose*, McGraw Hill LLC, 6th ed., (2011).
- [13] S. Aitekenov, A. Gaipov, R. Bukasov, Review: Detection and quantification of proteins in human urine, *Talanta*, 223 (2021) 121718, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121718>.
- [14] A. Gałuszka, Z. Migaszewski, J. Namieśnik, The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 50 (2013) 78–84, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.04.010>.
- [15] Á.I. López-Lorente, F. Pena-Pereira, S. Pedersen-Bjergaard, V.G. Zuin, S.A. Ozkan, E. Psillakis, The ten principles of green sample preparation, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 148 (2022) 116530, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116530>.
- [16] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2650–2656, <https://doi.org/10.1021/ac990055n>.
- [17] A. Esrafil, M. Baharfar, M. Tajik, Y. Yamini, M. Ghambarian, Two-phase hollow fiber liquid-phase microextraction, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 108 (2018) 314–322, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.09.015>.

- [18] C. Caballo, M.D. Sicilia, S. Rubio, Supramolecular Solvents for Green Chemistry, in: *The Application of Green Solvents in Separation Processes*, Elsevier Inc. (2017) 111–137, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805297-6.00005-X>.
- [19] F. Rezaei, Y. Yamini, M. Moradi, B. Daraei, Supramolecular solvent-based hollow fiber liquid phase microextraction of benzodiazepines, *Anal. Chim. Acta.* 804 (2013) 135–142, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.10.026>.
- [20] N. Caballero-Casero, M. Ocak, Ü. Ocak, S. Rubio, Quick supramolecular solvent-based microextraction for quantification of low curcuminoid content in food, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 2179–2187, <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7409-9>.
- [21] S. Bajkacz, P. Adamczewska, K. Kokoszka, E. Kycia-Słocka, A. Sochacki, E. Felis, Supramolecular solvent-based microextraction of selected anticonvulsant and nonsteroidal anti-inflammatory drugs from sediment samples, *Molecules.* 25 (2020) 5671, <https://doi.org/10.3390/molecules25235671>.
- [22] C. Caballo, M.D. Sicilia, S. Rubio, Fast, simple and efficient supramolecular solvent-based microextraction of mecoprop and dichlorprop in soils prior to their enantioselective determination by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Talanta.* 119 (2014) 46–52, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.10.043>.
- [23] M. Moradi, Y. Yamini, F. Rezaei, E. Tahmasebi, A. Esrafil, Development of a new and environment friendly hollow fiber-supported liquid phase microextraction using vesicular aggregate-based supramolecular solvent, *Analyst.* 137 (2012) 3549–3557, <https://doi.org/10.1039/c2an35304k>.
- [24] L. Muñoz-Bustamante, N. Caballero-Casero, S. Rubio, Drugs of abuse in tap water from eight European countries: Determination by use of supramolecular solvents and tentative evaluation of risks to human health, *Environ. Int.* 164 (2022) 107281, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107281>.

- [25] C. Caballo, M.D. Sicilia, S. Rubio, Enantioselective analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in freshwater fish based on microextraction with a supramolecular liquid and chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 4721–4731, <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8675-5>.
- [26] J. Merib, High-throughput platforms for microextraction techniques, *Anal. Bioanal. Chem.* 415 (2023) 3671-3681, doi: 10.1007/s00216-022
- [27] R. González-Martín, A. Gutiérrez-Serpa, V. Pino, M. Sajid, A tool to assess analytical sample preparation procedures: Sample preparation metric of sustainability, *J. Chromatogr. A.* 1707 (2023) 46429, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464291>.
- [28] Guidelines for Standard Method Performance Requirements Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, Oxford University Press (2023).
- [29] M.A. Farajzadeh, H. Nasrollahpour, M.R.A. Mogaddam, L. Khoshmaram, Determination of widely used non-steroidal anti-inflammatory drugs in biological fluids using simultaneous derivatization and air-assisted liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-flame ionization detection, *J. Iran. Chem. Soc.* 13 (2016) 289–298, <https://doi.org/10.1007/s13738-015-0736-3>.
- [30] B. Jain, R. Jain, A. Kabir, S. Sharma, Rapid determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine samples after in-matrix derivatization and fabric phase sorptive extraction-gas chromatography-mass spectrometry analysis, *Molecules.* 27 (2022) 7188, <https://doi.org/10.3390/molecules27217188>.
- [31] C.H. Lee, Y. Shin, M.W. Nam, K.M. Jeong, J. Lee, A new analytical method to determine non-steroidal anti-inflammatory drugs in surface water using in situ derivatization combined with ultrasound-assisted emulsification microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry, *Talanta.* 129 (2014) 552–559, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.06.027>.

[32] A. Shishov, D. Nechaeva, A. Bulatov, HPLC-MS/MS determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine milk based on simultaneous deep eutectic solvents formation and its solidification, *Microchem. J.* 150 (2019) 104080, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104080>.

4. DISCUSSÃO

4.1 Preparo do solvente

Diante da variedade de combinações de moléculas anfífilas com solventes específicos que proporcionam a formação de SUPRAS, neste trabalho buscou-se explorar o uso de ácido decanóico como tensoativo. Desta maneira, a produção do SUPRA a base de micelas reversas de ácido carboxílico se deu através da adição de 6,5 g de ácido decanóico em 80 mL de água ultrapura. Depois da dissolução, foram adicionados 4,2 mL de tetrahidrofurano para promover a fase de coacervação. A produção do SUPRA foi extremamente simples e de rápida execução (menos de 10 min), sendo possível a obtenção de cerca de 20 mL de solvente com essa mistura.

Em relação às características físico-químicas do solvente preparado, cabe destacar sua apresentação em forma de líquido incolor, homogêneo e com viscosidade baixa. Sua interação com a membrana microporosa se demonstrou satisfatória, uma vez que o solvente foi facilmente impregnado nos poros da fibra de 1 cm após 10 minutos de exposição. Além da facilidade da execução e satisfatória interação com a técnica de microextração escolhida, o solvente apresenta ainda boa estabilidade, podendo ser armazenado em um recipiente de vidro sem prejuízos na sua eficiência por até 30 dias em refrigeração (4 °C). Foram realizados testes para avaliar o volume de solvente necessário para preencher os poros da fibra. Através da diferença entre a massa pesada da fibra antes da interação com o SUPRA e após os 10 minutos de impregnação foi possível concluir que foram necessários cerca de 20 µL de solvente extrator por amostra, demonstrando satisfatório rendimento da técnica, uma vez que utiliza baixíssimos volumes de solvente.

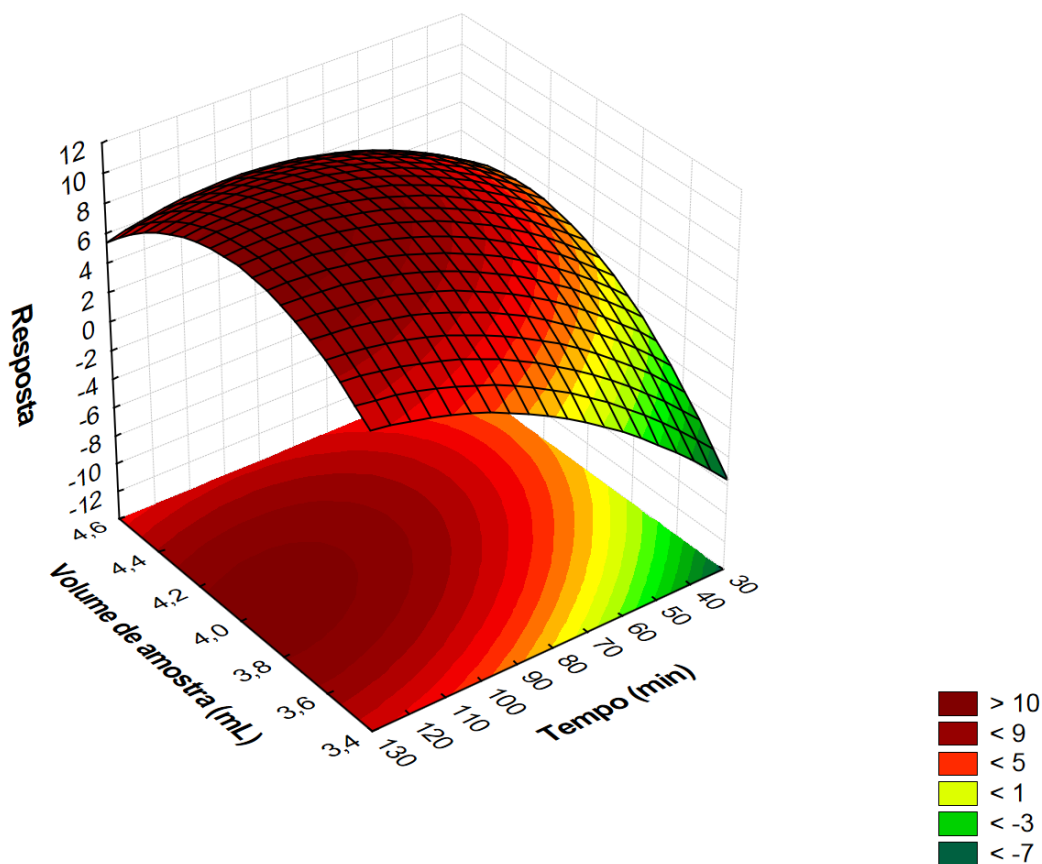
4.2 Otimização das etapas analíticas

As etapas mais significativas da metodologia analítica passaram por testes de otimização afim de garantir resultados com melhor eficiência e eficácia, buscando menores gastos e reduzindo desperdícios. Para isso, foram utilizados os *softwares Statsoft Statistica 10 (Statsoft, EUA) e Microsoft Excel 2016 (Microsoft, EUA)*. A

primeira etapa da otimização objetivou avaliar a influência da diluição da amostra, tendo em vista o grau de complexidade da urina e a necessidade de compatibilização da amostra com a instrumentação analítica. Assim, através de um planejamento univariado foram testados três níveis de diluição, sendo eles 5, 10 e 20 vezes. Considerando a média geométrica das áreas dos picos cromatográficos gerados foi possível determinar que os testes utilizando amostras 20 vezes diluídas apresentaram melhor eficiência na extração dos compostos de interesse. A urina é uma matriz biológica complexa, que apresenta diversos elementos em sua composição que podem ser interferentes prejudiciais no processo de detecção dos analitos. Assim, uma maior diluição da amostra permite com que ocorra uma menor interação do sinal ruído no cromatograma, ou seja, evita com que o efeito matriz interfira na intensidade do sinal instrumental gerado, evidenciando os compostos de interesse.

Após a determinação do grau de diluição da amostra, foram realizados testes para avaliar a influência do volume da amostra e do tempo de extração. Para isso foi utilizado um planejamento experimental do tipo Doehlert, sendo testados três volumes diferentes (3,5 mL, 4,0 mL e 4,5 mL) e cinco tempos de extração (40, 60, 80, 100 e 120 minutos). O ponto central do desenho foi realizado em triplicata e as médias geométricas das áreas dos picos cromatográficos dos analitos foram utilizadas como resposta analítica para estabelecer o modelo estatístico da condição otimizada. Através de um gráfico de superfície de resposta (**Figura 8**) foi possível concluir que a combinação de 4 mL de volume de amostra e 100 minutos de tempo de extração garantiu os melhores resultados analíticos.

Figura 8. Gráfico de superfície de resposta obtido através do desenho experimental do tipo Doehlert para avaliar o volume de amostra e o tempo de extração.



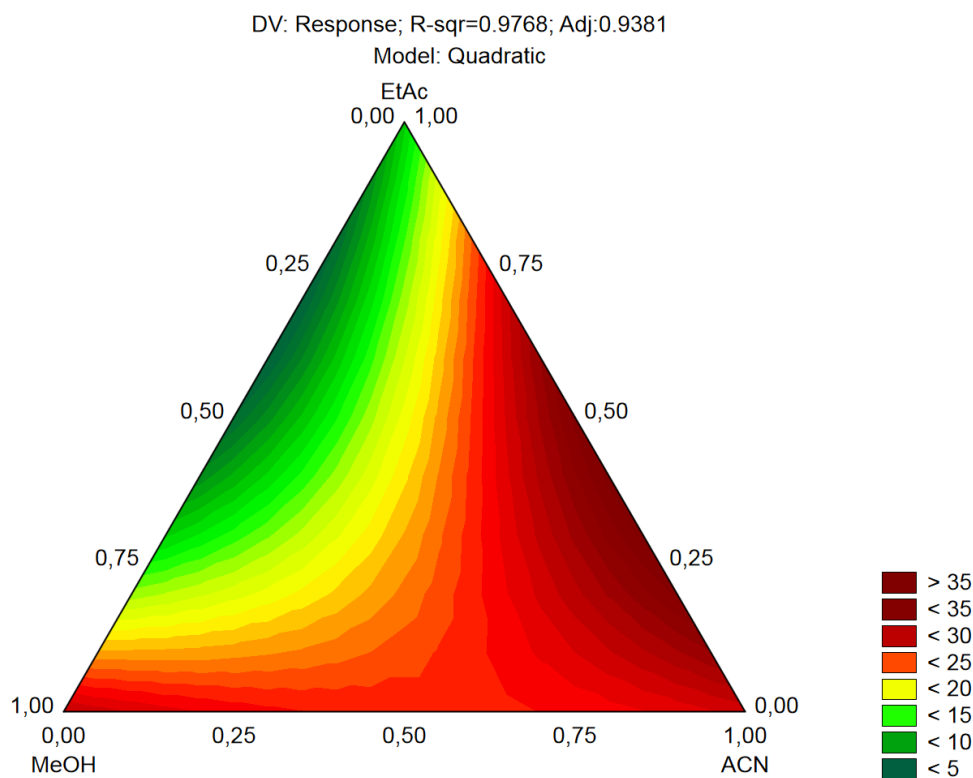
Fonte: *Software Statsoft Statistica 10 (Statsoft, EUA)*.

Depois de definido o tempo de extração e o volume de amostra, foram feitos testes para avaliar o tempo de dessorção e a composição do solvente utilizado nessa etapa. Os tempos testados foram 10, 20 e 30 minutos de dessorção conduzidos por um experimento univariado, de maneira que cada ponto foi realizado em triplicata. Nesta etapa experimental, foi utilizado como solvente de dessorção acetonitrila pura. De acordo com a média geométrica das áreas cromatográficas apresentadas, o tempo que se mostrou mais eficiente para dessorver os analitos impregnados na membrana porosa foi de 20 minutos.

Se tratando da composição do solvente de dessorção, foi realizado um planejamento composto central, avaliando a eficácia e interação entre acetato de etila, acetonitrila e metanol em diferentes proporções. Através do gráfico ternário gerado (**Figura 9**) foi possível concluir que a mistura de acetato de etila 25% e

acetonitrila 75% no volume final de 100 μ L, demonstrada pela coloração vermelha mais intensa, apresentou melhor resultado analítico.

Figura 9. Gráfico de superfície ternária de resposta gerado através de um planejamento simplex-centróide para avaliação da proporção dos solventes de extração.



Fonte: Software Statsoft Estatística 10 (Statsoft, EUA).

4.3 Validação da metodologia

A validação da metodologia analítica foi conduzida utilizando-se os parâmetros otimizados. A amostra utilizada para a etapa de validação foi doada por um voluntário saudável e enriquecida com concentrações conhecidas dos analitos. As curvas de calibração de cada composto alvo foram realizadas em cinco concentrações e em triplicata para cada ponto.

Após as etapas de otimização e validação, a metodologia proposta neste estudo foi aplicada para analisar sete amostras de urina doadas por voluntários do nosso grupo de pesquisa. Em termos de desempenho analítico, os resultados

obtidos foram satisfatórios, pois a metodologia necessitou baixos volumes de solvente e amostra, conseqüentemente reduzindo a geração de resíduos e impactos ambientais.

A metodologia baseada em HF-MMLLE seguida de HPLC-DAD proposta neste estudo apresenta vantagens importantes em relação ao uso de um solvente supramolecular como alternativa mais sustentável aos solventes orgânicos tradicionais (como o clorofórmio, por exemplo). Além disso, o HPLC-DAD consiste em uma alternativa mais barata em comparação com instrumentos analíticos mais sofisticados acoplados a detectores de espectrometria de massa, por exemplo. Portanto, esta abordagem é uma alternativa mais econômica e mais segura para ser empregada em análises toxicológicas. Outro aspecto importante está relacionado à frequência analítica, uma vez que o sistema de extração é capaz de processar várias amostras simultaneamente, o que é importante também para análises de rotina laboratorial.

4.4 Métrica de sustentabilidade

Dentre as métricas de sustentabilidade disponíveis, escolheu-se utilizar a SPMS para avaliar o impacto e a sustentabilidade da metodologia proposta. De acordo com a pontuação e a escala de cor obtida no gráfico gerado pela métrica, o estudo apresentou respostas muito satisfatórias principalmente no que diz respeito ao volume da amostra, tipo e quantidade de solvente utilizado. Neste caso, o SUPRA produzido consiste em um composto classificado pela métrica como "degradável alternativo". Além disso, a metodologia também obteve pontuações muito satisfatórias em relação a categoria 'consumo e desperdício de energia' e a categoria referente ao procedimento analítico.

É importante ressaltar que a utilização de um sistema semiautomatizado de 96 poços, no qual várias amostras podem ser examinadas simultaneamente, alcançou uma pontuação satisfatória, além de gerar uma coloração positiva (verde) na escala de cor. Por outro lado, o longo tempo de extração (100 min) da metodologia consiste em uma desvantagem, justificando a coloração alaranjada para esse parâmetro na ferramenta. Por fim, esta metodologia de preparo de amostras obteve uma

pontuação global elevada (8 de 10 pontos), podendo assim ser considerada sustentável e ambientalmente correta - atingindo mais um dos objetivos esperados.

5. CONCLUSÕES

Foi desenvolvida e otimizada com sucesso uma metodologia analítica sustentável baseada em solvente supramolecular para a determinação de seis AINEs em amostras de urina. De acordo com o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que relata a combinação de HF-MMLLE e solvente supramolecular utilizando um sistema semiautomatizado composto por uma placa de 96 poços. A produção do solvente supramolecular utilizado neste estudo foi simples e direta, sendo necessário um volume reduzido para cada extração. Apesar de um longo tempo de extração, esta metodologia apresenta uma aplicação simples, uma alta frequência analítica (extração de várias amostras simultaneamente) e de baixo custo. É importante salientar que este estudo contribuiu para propor uma estratégia analítica sustentável que pode substituir outras metodologias que utilizam solventes orgânicos tóxicos como fases de extração na análise toxicológica. Além disso, esta estratégia pode oferecer uma possibilidade adequada para ser também explorada em matrizes ambientais e de alimentos.

6. REFERÊNCIAS

1. Hilário MOE, Terreri MT, Len CA. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Cyclooxygenase 2 inhibitors. Vol. 82, *Jornal de Pediatria*. 2006.
2. BRUNTON LL, HILAL-DANDAN R, KNOLLMANN BC. *The Pharmacological Basis of Goodman and Gilman Therapy*. 13^o ed. Mc Graw Hill Education, Artmed, organizadores. 2018.
3. McEvoy L, Carr DF, Pirmohamed M. Pharmacogenomics of NSAID-Induced Upper Gastrointestinal Toxicity. Vol. 12, *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
4. Yuan JQ, Tsoi KKF, Yang M, Wang JY, Threapleton DE, Yang ZY, et al. Systematic review with network meta-analysis: Comparative effectiveness and safety of strategies for preventing NSAID-associated gastrointestinal toxicity. *Aliment Pharmacol Ther*. 1^o de junho de 2016;43(12):1262–75.
5. Schjerning AM, McGettigan P, Gislason G. Cardiovascular effects and safety of (non-aspirin) NSAIDs. Vol. 17, *Nature Reviews Cardiology*. Nature Research; 2020. p. 574–84.
6. Grosser T, Ricciotti E, FitzGerald GA. *The Cardiovascular Pharmacology of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs*. Vol. 38, *Trends in Pharmacological Sciences*. Elsevier Ltd; 2017. p. 733–48.
7. Gurbel P, Tantry U, Weisman S. A narrative review of the cardiovascular risks associated with concomitant aspirin and NSAID use. Vol. 47, *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. Springer New York LLC; 2019. p. 16–30.
8. Lucas GNC, Leitaõ ACC, Alencar RL, Xavier RMF, Daher EDF, Silva GB Da. Pathophysiological aspects of nephropathy caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Brazilian Journal of Nephrology*. 1^o de março de 2019;41(1):124–30.
9. Olson KR. *Poisoning and drug overdose*. 6^o ed. McGraw Hill LLC; 2011. 832.
10. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. *Skoog and West's Fundamentals of Analytical Chemistry*. 9^a. Cengage Learning; 2015.
11. Aitekenov S, Gaipov A, Bukasov R. Review: Detection and quantification of proteins in human urine. Vol. 223, *Talanta*. Elsevier B.V.; 2021.
12. Farias LA, Fávaro DIT. VINTE ANOS DE QUÍMICA VERDE: CONQUISTAS E DESAFIOS. Vol. 34, *Quim. Nova*. 2011.

13. Gałuszka A, Migaszewski Z, Namieśnik J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. Vol. 50, TrAC - Trends in Analytical Chemistry. Elsevier B.V.; 2013. p. 78–84.
14. López-Lorente ÁI, Pena-Pereira F, Pedersen-Bjergaard S, Zuin VG, Ozkan SA, Psillakis E. The ten principles of green sample preparation. Vol. 148, TrAC - Trends in Analytical Chemistry. Elsevier B.V.; 2022.
15. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. *Anal Chem.* 15 de julho de 1999;71(14):2650–6.
16. Esrafili A, Baharfar M, Tajik M, Yamini Y, Ghambarian M. Two-phase hollow fiber liquid-phase microextraction. Vol. 108, TrAC - Trends in Analytical Chemistry. Elsevier B.V.; 2018. p. 314–22.
17. Carasek E, Merib J. Membrane-based microextraction techniques in analytical chemistry: A review. Vol. 880, *Analytica Chimica Acta*. Elsevier B.V.; 2015. p. 8–25.
18. Merib J, Carasek E. Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME): Fundamentos e aplicações recentes. *Scientia Chromatographica.* 2013;5(4):249–62.
19. Carasek E, Bernardi G, Morelli D, Merib J. Sustainable green solvents for microextraction techniques: Recent developments and applications. *J Chromatogr A.* 15 de março de 2021;1640.
20. Kokosa JM. A guide to recent trends in green applications of liquid phase microextraction for bioanalytical sample preparations. *Sustain Chem Pharm.* 1º de setembro de 2021;22.
21. Silva Alves M, Carlos Ferreira Neto L, Scheid C, Merib J. An overview of magnetic ionic liquids: from synthetic 2 strategies to applications in microextraction techniques. 2022.
22. Merib J, Spudeit DA, Corazza G, Carasek E, Anderson JL. Magnetic ionic liquids as versatile extraction phases for the rapid determination of estrogens in human urine by dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high-performance liquid chromatography-diode array detection. *Anal Bioanal Chem.* 1º de julho de 2018;410(19):4689–99.
23. Rubio S. Twenty years of supramolecular solvents in sample preparation for chromatography: achievements and challenges ahead. Vol. 412, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2020. p. 6037–58.

24. Medina DAV, Cabal LFR, Sartore DM, Lima AM, Santos ÁJ dos. Solventes supramoleculares: Uma alternativa na microextração em fase líquida para análises cromatográficas. *Scientia Chromatographica*. 2017;9(2):83–100.
25. Caballo C, Sicilia MD, Rubio S. Supramolecular Solvents for Green Chemistry. Em: *The Application of Green Solvents in Separation Processes*. Elsevier Inc.; 2017. p. 111–37.
26. Asiabi H, Yamini Y, Moradi M. Determination of sulfonylurea herbicides in soil samples via supercritical fluid extraction followed by nanostructured supramolecular solvent microextraction. *Journal of Supercritical Fluids*. 2013;84:20–8.
27. Moradi M, Yamini Y. Application of vesicular coacervate phase for microextraction based on solidification of floating drop. *J Chromatogr A*. 16 de março de 2012;1229:30–7.
28. Peyrovi M, Hadjmohammadi M. Extraction optimization of Loratadine by supramolecular solvent-based microextraction and its determination using HPLC. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 1º de fevereiro de 2015;980:41–7.
29. Płotka-Wasyłka J. A new tool for the evaluation of the analytical procedure: Green Analytical Procedure Index. *Talanta*. 1º de maio de 2018;181:204–9.
30. Nowak PM, Kościelniak P. What color is your method? adaptation of the rgb additive color model to analytical method evaluation. Vol. 91, *Analytical Chemistry*. American Chemical Society; 2019. p. 10343–52.
31. Pena-Pereira F, Tobiszewski M, Wojnowski W, Psillakis E. A Tutorial on AGREEprep an Analytical Greenness Metric for Sample Preparation. *Advances in Sample Preparation*. 1º de agosto de 2022;3.
32. González-Martín R, Gutiérrez-Serpa A, Pino V, Sajid M. A tool to assess analytical sample preparation procedures: Sample preparation metric of sustainability. *J Chromatogr A*. 27 de setembro de 2023;1707.
33. Lee CH, Shin Y, Nam MW, Jeong KM, Lee J. A new analytical method to determine non-steroidal anti-inflammatory drugs in surface water using in situ derivatization combined with ultrasound-assisted emulsification microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*. 1º de novembro de 2014;129:552–9.
34. Shishov A, Nechaeva D, Bulatov A. HPLC-MS/MS determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine milk based on simultaneous deep eutectic solvents formation and its solidification. *Microchemical Journal*. 1º de novembro de 2019;150.

7. ANEXO – Supplementary Material

A high-throughput sample preparation approach for the determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in urine samples through membrane-based microextraction employing a green supramolecular solvent

Sofia Aquino Monteiro^{a, b}, Camila Scheid^{a, b}, Carolina Souza Machado^a, Josias Merib^{a, b, c*}

^a Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil.

^c Departamento de Farmacociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil.

Corresponding Author

E-mail address: josias@ufcspa.edu.br (J. Merib)

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

245, Sarmiento Leite St.

Porto Alegre RS, 90050-170

Phone: +55 51 33038883

Table S1. Chemical structure, molecular weight, retention time, log P and wavelengths used for the detection of the target analytes.

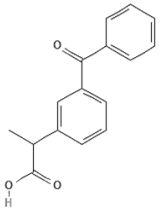
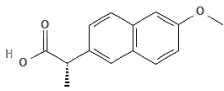
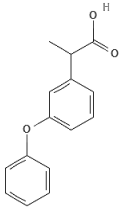
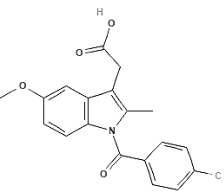
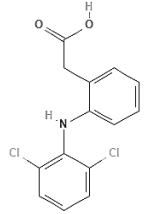
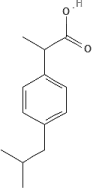
Analyte	Chemical structure	Molecular weight (g/mol)	Retention time (min)	LogP	Wavelength for the detection (nm)
Keto		254.28	13.31	3.1	254
Nap		230.26	13.66	3.3	284
Feno		242.27	17.18	3.3	280
Indo		357.8	18.57	4.3	237
Diclo		296.1	19.17	4.4	280
Ibu		206.28	19.89	3.5	225

Table S2: Matrix of the Doehlert design applied in this study.

Sample volume (mL)	Extraction time (min)
3.5	60
4.5	60
3.5	100
4.5	100
4	120
4	40
4	80
4	80
4	80

Table S3: Matrix of the simplex centroid design applied in this study containing each solvent composition evaluated.

MeOH	ACN	EtAc
1.00	0.00	0.00
0.00	1.00	0.00
0.00	0.00	1.00
0.50	0.50	0.00
0.50	0.00	0.50
0.00	0.50	0.50
0.33	0.33	0.34
0.33	0.33	0.34
0.33	0.33	0.34

Table S7. Electronic spreadsheet for the greenness evaluation related to the proposed method.

Sample amount	
<i>Sample amount (mL or g)</i>	≤ 10

Extractant information	
<i>Amount of extractant (mL or g)</i>	≤ 0.1
<i>Nature of extractant</i>	Alternative degradable

Procedure information	
<i>Number of steps</i>	≤ 2
<i>Extraction time (min)</i>	> 60
<i>Additional steps after extraction</i>	No additional steps
<i>Samples throughput</i>	Multiple samples

Energy consumption	
<i>Dispersion/stir</i>	Stir plate
<i>Separation</i>	No centrifuge
<i>Temperature</i>	Room temperature

Total waste	
<i>Waste (mL or g)</i>	≤ 10

Reusability of extractant	
<i>Reusable</i>	No
Global score	8.00

Table S8. Parameters evaluated with SPMS.

Color code						
Color	Green	Yellow	Orange	Red		
	10	6	3	1		
Sample amount						
Sample amount (mL or g)	≤ 10	10 < x ≤ 50	50 < x ≤ 100	> 100		
Score (max 10)	5	3	2	1		
Extractant information						
Amount of extractant (mL or g)	≤ 0.1	0.1 < x ≤ 0.5	0.5 < x ≤ 1	> 1		
Score (max 10)	20	12	6	2		
Nature of extractant	Natural	Alternative degradable	Alternative persistent	Conventional persistent		
Score (max 10)	20	12	6	2		
Procedure information						
Number of steps	≤ 2	2 < x ≤ 4	4 < x ≤ 6	> 6		
Score (max)	10	6	3	1		
Extraction time (min)	≤ 5	5 < x ≤ 15	15 < x ≤ 60	> 60		
Score (max 10)	10	6	3	1		
Additional steps after extraction	No additional steps	Dilution	Evaporation	Derivatization		
Score (max 10)	10	5	3	3		
Number of samples done at same time	Multiple samples	Single sample				
	Mark	No mark				
	3	1				
Energy consumption and waste						
Dispersion/stir	Without / Manual shake	Vortex	Ultrasounds	Shaker	Stir plate	Pumping
Score (max 3)	3	3	2	1	1	2
Separation	No centrifuge	Centrifuge				
Score (max 2)	2	1				
Temperature	Room temperature	Microwave	Heat plate	Freezing		
Score (max 5)	5	3	1	1		
Waste (mL or g)	≤ 10	10 < x ≤ 50	50 < x ≤ 100	> 100		
Score (max 10)	10	6	3	1		
Reusability of extractant						
Reusable	Yes	No				
	Mark	No mark				
	2	1				
Total score	95					
Global score						
Final score (0-1)	$(\sum \text{Scores})/95$					
Final score (0-10)	0-1 score*10					
Global score color code						
Color	Green	Yellow	Red			
	10	5	0			

Table S9. Spreadsheet with the score for each available criteria for this methodology.

	Scoring	
<i>Sample volume (mL)</i>	5	5
<i>Amount of extractant (mL or g)</i>	20	20
<i>Nature of extractant</i>	12	12
<i>Number of steps</i>	10	10
<i>Extraction time (min)</i>	1	1
<i>Additional steps after extraction</i>	10	10
<i>Samples throughput</i>	3	3
<i>Dispersion/stir</i>	1	1
<i>Separation</i>	2	2
<i>Temperature</i>	5	5
<i>Energy</i>	8	8
<i>Waste (mL or g)</i>	10	10
Reusable	0	0
Global score	8.00	8.00

Table S10. Excel sheet for the greenness evaluation regarding comparative methods. Technique using chloroform and ultrasound-assisted emulsification microextraction to determine 8 types of drugs in surface water [31]. B) Methodology based on air-assisted liquid-liquid microextraction using chloroform [29].

A)

Sample amount	
<i>Sample amount (mL or g)</i>	≤ 10

Extractant information	
<i>Amount of extractant (mL or g)</i>	≤ 0.1
<i>Nature of extractant</i>	Conventional persistent

Procedure information	
<i>Number of steps</i>	$2 < x \leq 4$
<i>Extraction time (min)</i>	$5 < x \leq 15$
<i>Additional steps after extraction</i>	Derivatization
<i>Samples throughput</i>	Single sample

Energy consumption	
<i>Dispersion/stir</i>	Ultrasounds
<i>Separation</i>	Centrifuge
<i>Temperature</i>	Room temperature

Total waste	
<i>Waste (mL or g)</i>	$10 < x \leq 50$

Reusability of extractant	
<i>Reusable</i>	No
Global score	5.89

B)

Sample amount	
<i>Sample amount (mL or g)</i>	≤ 10

Extractant information	
<i>Amount of extractant (mL or g)</i>	≤ 0.1
<i>Nature of extractant</i>	Conventional persistent

Procedure information	
<i>Number of steps</i>	$4 < x \leq 6$
<i>Extraction time (min)</i>	$5 < x \leq 15$
<i>Additional steps after extraction</i>	Derivatization
<i>Samples throughput</i>	Single sample

Energy consumption	
<i>Dispersion/stir</i>	Ultrasounds
<i>Separation</i>	Centrifuge
<i>Temperature</i>	Room temperature

Total waste	
<i>Waste (mL or g)</i>	≤ 10

Reusability of extractant	
<i>Reusable</i>	Yes

Global score	6.00
---------------------	-------------

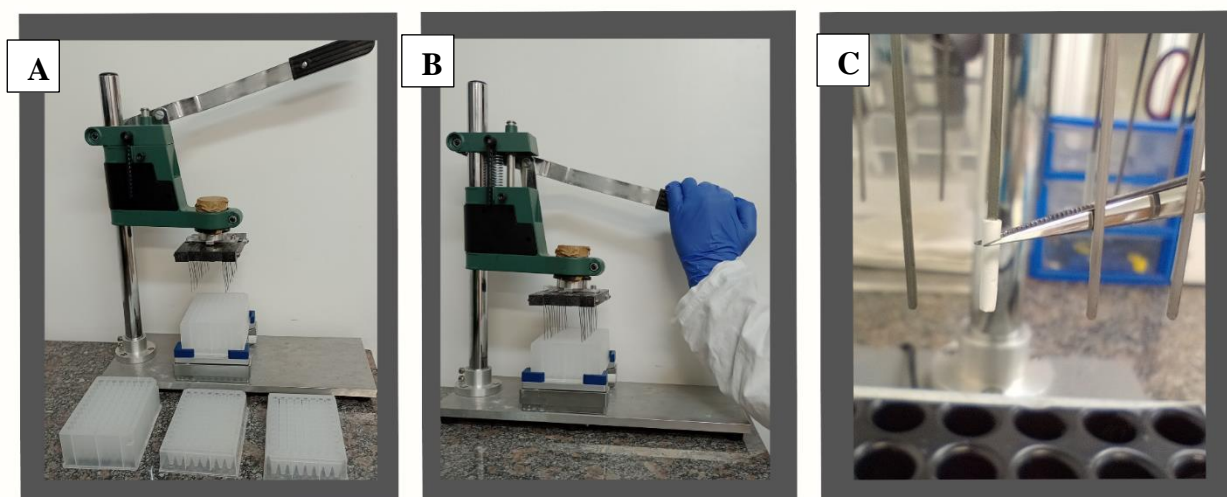


Figure S1. Overview of the semiautomated 96-well plate system used in this study (A and B), and 1cm-length polypropylene hollow fiber being inserted in a pin with tweezers (C).

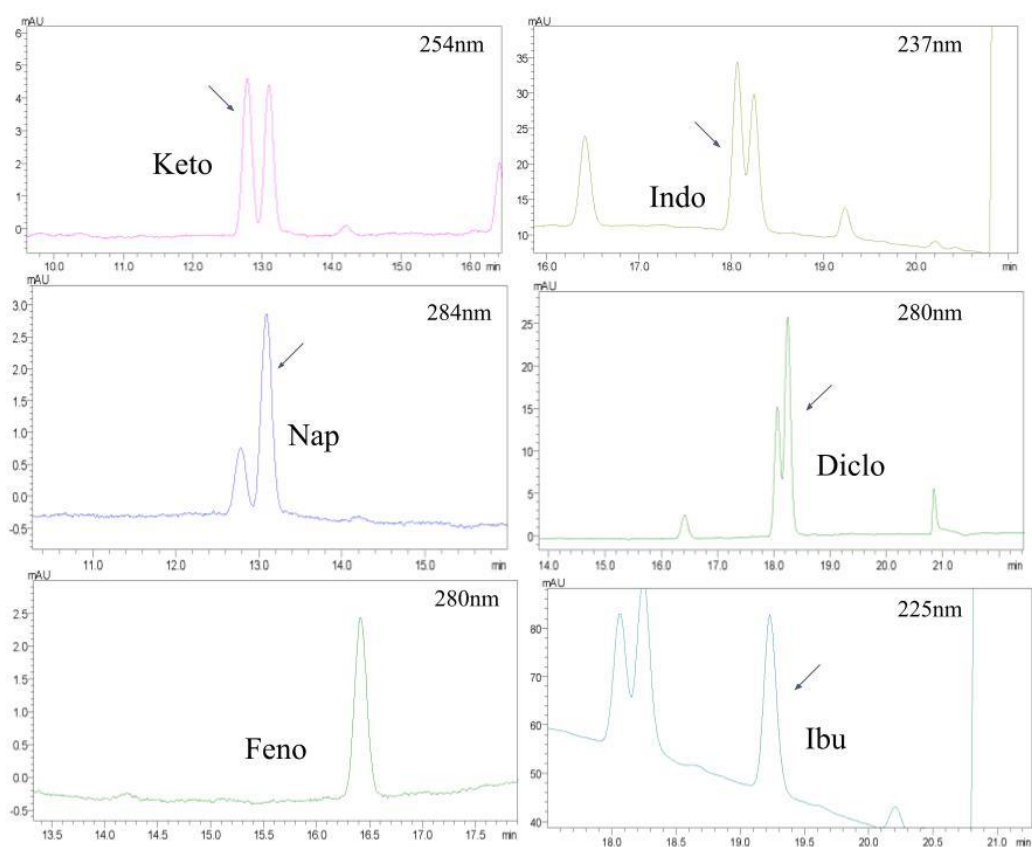


Figure S2. Chromatograms obtained from human urine sample spiked with 500 $\mu\text{g/L}$ of the analytes.

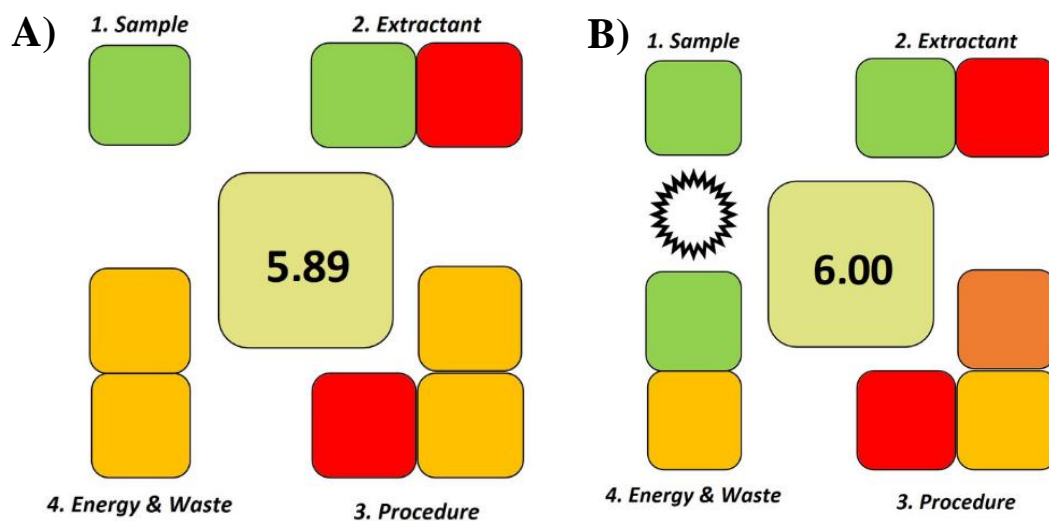


Figure S3. Comparison of sustainability metric scores of techniques using traditional solvents for the extraction of different NSAIDs. A) Technique using chloroform and ultrasound-assisted emulsification microextraction to determine 8 types of drugs in surface water [31]. B) Methodology based on air-assisted liquid-liquid microextraction using chloroform [29].



Sofia Aquino Monteiro

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2456591273336518>

ID Lattes: **2456591273336518**

Última atualização do currículo em 25/05/2024

Possui curso técnico em Análises Clínicas pelo Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Graduada em Toxicologia Analítica pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Mestranda no Programa de Pós-Graduação em Biociências pela UFCSPA, na área de toxicologia e preparo de amostras. Membro do Grupo de Estudos em Preparo de Amostras e Cromatografia (GEPAC). Atualmente é bolsista de apoio técnico na Central Analítica da UFCSPA. Possui experiência em análises toxicológicas, análises clínicas e biologia molecular. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome

Sofia Aquino Monteiro 

Nome em citações bibliográficas

MONTEIRO, S. A.; MONTEIRO, SOFIA
AQUINO; AQUINO MONTEIRO, SOFIA

Lattes iD



<http://lattes.cnpq.br/2456591273336518>

Orcid iD



<https://orcid.org/0009-0008-7605-153X>

Endereço

Endereço Profissional

Fundação Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre,
Departamento de Farmacologia e
Toxicologia.
Rua Sarmiento Leite, 245 - Central
Analítica
Centro Histórico
90050170 - Porto Alegre, RS - Brasil
Telefone: (51) 33038883
URL da Homepage: <https://ufcspa.edu.br/>

Formação acadêmica/titulação

2022

Mestrado em andamento em BIOCÊNCIAS.

Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.

Título: Determinação de AINES em amostras de urina através de microextração em fibra oca utilizando solvente supramolecular.

Orientador: 🧑🏻‍🔬 Josias de Oliveira Merib.

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

Palavras-chave: Solventes Supramoleculares; AINES; HF-LPME; Preparo de amostra.

2019 - 2022

Graduação em Toxicologia Analítica.

Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.

2021 - 2023

Curso técnico/profissionalizante em Análises Clínicas.

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, Brasil.

Formação Complementar

2023 - 2023

Diagnóstico Laboratorial da Tuberculose: TRM-TB. (Carga horária: 20h).

Sistema TELELAB de educação permanente, TELELAB, Brasil.

2023 - 2023

ISTs - cuidados na execução dos testes rápidos. (Carga horária: 30h).

Sistema TELELAB de educação permanente, TELELAB, Brasil.

2023 - 2023

Genética para não Geneticistas. (Carga horária: 14h).

INSTITUTO DE ENSINO E PESQUISA DASA, IEP DASA, Brasil.

2023 - 2023

Coleta de sangue-Diagnóstico e monitoramento de DST,AIDS e Hepatites Virais. (Carga horária: 15h).

Sistema TELELAB de educação permanente, TELELAB, Brasil.

2023 - 2023

Capacitação em Oncologia Pediátrica.
(Carga horária: 40h).
Instituto do Câncer Infantil, ICI, Brasil.

2022 - 2022

Biossegurança - Laboratórios de DST,
AIDS e Hepatites Virais. (Carga horária:
15h).
Sistema TELELAB de educação
permanente, TELELAB, Brasil.

2022 - 2022

Técnicas de Coloração de Gram. (Carga
horária: 15h).
Sistema TELELAB de educação
permanente, TELELAB, Brasil.

2021 - 2021

Extensão universitária em
Otimização,Validação de Métodos e
Controle de Qualidade em Análises
Toxicol. (Carga horária: 30h).
Universidade Estadual de Campinas,
UNICAMP, Brasil.

2021 - 2021

Extensão universitária em Competências
Relacionais para o Atendimento de
Usuários de Alcool e drogas. (Carga
horária: 16h).
Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, UFRGS, Brasil.

2021 - 2021

Gerenciamento de Resíduos. (Carga
horária: 20h).
Chemsul - Consultoria Química,
CHEMSUL, Brasil.

2020 - 2020

Princípios e Aplicações de Cromatografia
Gasosa - Módulo I. (Carga horária: 1h).
Shimadzu do Brasil Comércio, SBC, Brasil.

2020 - 2020

Fundamentos de GCMS.
Shimadzu do Brasil Comércio, SBC, Brasil.

2020 - 2020

BIOSSEGURANÇA E PESQUISA EM
TEMPOS DA COVID-19. (Carga horária:
2h).
Fundação Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre,
UFCSPA, Brasil.

2020 - 2020

Desenvolvimento de Métodos por LC-MS e
Dicas para Validação.

2019 - 2019

Curso para Usuários de GC e GCMS: fundamentos e práticas avançadas em análi. (Carga horária: 8h).
Agilent Technologies Brasil, AGILENT, Brasil.

Atuação Profissional

Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.

Vínculo institucional

2023 - Atual

Vínculo: Bolsista, Enquadramento
Funcional: Apoio Técnico, Carga horária:
30

Outras informações

Bolsista de apoio técnico nos laboratórios da Central Analítica da UFCSPA.

Vínculo institucional

2021 - 2022

Vínculo: Bolsista, Enquadramento
Funcional: Iniciação Científica, Carga
horária: 20

Outras informações

Bolsista de iniciação científica pelo PROBIC/FAPERGS no projeto "Investigação de novas metodologias analíticas automatizadas para a extração de DNA", sob orientação do Professor Doutor Josias de Oliveira Merib.

Vínculo institucional

2020 - 2021

Vínculo: Bolsista, Enquadramento
Funcional: Iniciação Científica, Carga
horária: 20

Outras informações

Bolsista de iniciação científica pelo PIC/UFCSPA no projeto "Novas metodologias analíticas baseadas em sistema semiautomatizado 96-well plate e líquidos iônicos magnéticos para o rápido diagnóstico de biomarcadores patológicos em amostras de urina e saliva", sob orientação do Professor Doutor Josias de Oliveira Merib.

Vínculo institucional

2019 - 2020

Vínculo: Bolsista, Enquadramento
Funcional: Iniciação Científica, Carga
horária: 20

Outras informações

Bolsista de iniciação científica pelo PIC/UFCSPA no projeto "Determinação de NBOMes em amostras de sangue utilizando técnicas de microextração por líquidos iônicos", sob orientação do Professor Doutor Tiago Franco de Oliveira.

Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul, CIT RS, Brasil.

Vínculo institucional

2019 - 2021

Vínculo: Estágio, Enquadramento
Funcional: Estagiária, Carga horária: 30

Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, ISCMPA, Brasil.

Vínculo institucional

2021 - 2022

Vínculo: Estagiária, Enquadramento
Funcional: Estagiária, Carga horária: 30

Outras informações

Estagiária no Laboratório de Biologia Molecular da Santa Casa, localizado no Hospital Dom Vicente Scherer. Carga Horária: 270 horas.

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, Brasil.

Vínculo institucional

2022 - 2023

Vínculo: Institucional, Enquadramento
Funcional: Estagiária, Carga horária: 20

**Outras
informações**

Estagiária no Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Diagnóstico Laboratorial (SDLab) do HCPA. Carga horária: 600 horas.

Áreas de atuação

1.

Grande área: Ciências Biológicas / Área:
Farmacologia / Subárea: Toxicologia.

2.

Grande área: Ciências da Saúde / Área:
Farmácia / Subárea: Avaliação e análises
toxicológicas.

3.

Grande área: Ciências Exatas e da Terra /
Área: Química / Subárea: Química
Analítica.

Idiomas

Inglês

Compreende Bem, Fala Razoavelmente,
Lê Bem, Escreve Bem.

Espanhol

Compreende Razoavelmente, Fala Pouco,
Lê Razoavelmente, Escreve Pouco.

Alemão

Compreende Pouco, Fala Pouco, Lê Pouco,
Escreve Pouco.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica



1.

SCHEID, CAMILA ; **MONTEIRO, SOFIA AQUINO** ; MELLO, WENDELL ; VELHO, MAIARA CALLEGARO ; DOS SANTOS, JULIANA ; BECK, RUY CARLOS RIVER ; DEON, MONIQUE ; MERIB, JOSIAS . A novel honeycomb-like 3D-printed device for rotating-disk sorptive extraction of organochlorine and organophosphorus pesticides from environmental water samples. JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A **JCR**, v. 1722, p. 464892, 2024.

2.

AQUINO MONTEIRO, SOFIA; SCHEID, CAMILA ; DEON, MONIQUE ; MERIB, JOSIAS . Fundamentals, recent applications, and perspectives of 3D printing in sample preparation approaches. MICROCHEMICAL JOURNAL **JCR**, v. 195, p. 109385, 2023. **Citações:** **SCOPUS** 2

3.

DE ANDRADE, DÉBORA COELHO ; **MONTEIRO, SOFIA AQUINO** ; MERIB, JOSIAS . A review on recent applications of deep eutectic solvents in microextraction techniques for the analysis of biological matrices. Advances in Sample Preparation, v. 1, p. 100007, 2022. **Citações:** **WEB OF SCIENCE** 28 | **SCOPUS** 35

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1.

III Congresso UFCSPA: Ciência para um mundo em movimento. Determinação de AINEs em amostras de urina através de microextração líquido-líquido utilizando solventes supramoleculares. 2023. (Congresso).

2.

Shimadzu Summit. 2023. (Encontro).

3.

XVI Jornada de Técnicos de Análises Clínicas do HCPA. 2022. (Outra).

4.

Entendendo as Vacinas: da Varíola à COVID-19. 2021. (Seminário).

5.

I Congresso Nacional Multidisciplinar de COVID-19. 2021. (Congresso).

6.

II Congresso UFCSPA: conectando experiências em saúde global. Novas metodologias analíticas baseadas em sistema semiautomatizado 96-well plate e líquidos iônicos magnéticos para o rápido diagnóstico de biomarcadores patológicos em amostras de urina e saliva. 2021. (Congresso).

7.

Microbiologia e Aplicações no Contexto Forense. 2021. (Outra).

8.

SIBRAT - Simpósio Brasileiro de Análises Toxicológicas. 2021. (Simpósio).

9.

III QUIMTOX - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.III QUIMTOX - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. 2020. (Encontro).

10.

One health e o impacto da química neste processo.One health e o impacto da química neste processo. 2020. (Encontro).

11.

VI Mostra de Trabalhos de Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.Determinação de NBOMes em amostras de sangue utilizando técnicas de microextração por solventes de hidrofiliabilidade comutável. 2020. (Outra).

12.

I Congresso UFCSPA: conectando saúde e sociedade. 2019. (Congresso).

13.

II QUIMTOX - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.II QUIMTOX - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. 2019. (Outra).

14.

Oficina: Como organizar a farmácia caseira.Congresso UFCSPA: conectando saúde e sociedade. 2019. (Oficina).

15.

Oficina: Gerenciamento de Resíduos.Congresso UFCSPA: conectando saúde e sociedade. 2019. (Oficina).

16.

Oficina: Parasitoses intestinais em crianças de creches/escolas de Porto Alegre: prevalência e profilaxia.Congresso UFCSPA: conectando saúde e sociedade. 2019. (Oficina).