

RELATÓRIO FINAL

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DA
FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA PRODUZIDA PELA USP-SÃO CARLOS E A
FOSFOETANOLAMINA PADRÃO SIGMA EM PLASMA DE RATO**

Estudo nº: 021-DVM-020-15

Patrocinador: **Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI**

Esplanada dos Ministérios, Bloco E

Brasília, DF

SUMÁRIO

IDENTIFICAÇÃO	4
DECLARAÇÃO DE GARANTIA DA QUALIDADE	5
RESUMO	6
DATAS	7
1. OBJETIVO DO ESTUDO	7
2. PESSOAL ENVOLVIDO E SUAS ATRIBUIÇÕES	7
3. SUBSTÂNCIA TESTE, SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA, VEÍCULO, REAGENTES E SOLVENTES	7
3.1. CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA TESTE	7
3.2. CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA.....	8
3.3. CARACTERIZAÇÃO DO VEÍCULO.....	8
3.4. CARACTERIZAÇÃO DE REAGENTES E SOLVENTES UTILIZADOS NO ESTUDO.....	8
3.5. PREPARO DA SUBSTÂNCIA TESTE E DA SUBSTÂNCIA REFERÊNCIA.....	9
3.6. JUSTIFICATIVA PARA A SELEÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DA SUBSTÂNCIA TESTE.....	11
4. SISTEMA TESTE	11
4.1. JUSTIFICATIVA PARA A SELEÇÃO DO SISTEMA TESTE	11
4.2. COMITÊ DE ÉTICA	11
4.3. ALOJAMENTO DOS ANIMAIS	11
4.3.1. <i>Biotério de Criação</i>	12
4.3.2. <i>Biotério de Manutenção</i>	12
5. ROBUSTEZ, RASTREABILIDADE E REPRODUTIBILIDADE	12
6. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO	13
6.1. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	13
6.1.1. <i>Caracterização e ionização da substância teste no MSMS</i>	13
6.1.2. <i>Condições cromatográficas</i>	13
6.1.3. <i>Obtenção do Plasma</i>	14
6.1.4. <i>Extração da Substância Teste do plasma</i>	14
6.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	15
6.2.1. <i>Limites de detecção e quantificação</i>	15
6.2.2. <i>Seletividade</i>	15
6.2.3. <i>Efeito de matriz</i>	16
6.2.4. <i>Linearidade</i>	16
6.2.5. <i>Recuperação</i>	18
6.2.6. <i>Precisão</i>	19
6.2.7. <i>Exatidão (bias)</i>	19
6.2.8. <i>Robustez</i>	19
6.2.9. <i>Estabilidade</i>	20
6.2.9.1. <i>Estabilidade em solução</i>	20
6.2.9.2. <i>Estabilidade na matriz biológica</i>	20
6.2.9.2.1. <i>Estabilidade após ciclos de congelamento/descongelamento</i>	21
6.2.9.2.2. <i>Estabilidade de curta duração</i>	21
6.2.9.2.3. <i>Estabilidade de longa duração</i>	21

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA PRODUZIDA PELA USP-SÃO CARLOS E A FOSFOETANOLAMINA PADRÃO SIGMA EM PLASMA DE RATO

6.2.9.2.4. Estabilidade pós-processamento	22
6.3 APLICAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO VALIDADO	22
6.4 EUTANÁSIA	22
6.5 ESTATÍSTICA	22
7. RESULTADOS	23
7.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	23
7.1.1. <i>Extração da Substância Teste do plasma</i>	23
7.1.2. <i>Caracterização da Substância Teste por Espectrometria de Massas e Condições Cromatográficas</i>	25
7.2 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA.....	31
7.2.1. <i>Limite de Detecção e Limite de Quantificação</i>	33
7.2.2. <i>Seletividade</i>	33
7.2.3. <i>Efeito de Matriz</i>	34
7.2.4. <i>Recuperação</i>	36
7.2.5. <i>Linearidade</i>	37
7.2.6. <i>Precisão</i>	39
7.2.7. <i>Exatidão</i>	43
7.2.8. <i>Robustez</i>	44
7.2.9. <i>Estabilidade</i>	46
7.2.9.1. Estabilidade em solução.....	46
7.2.9.2. Estabilidade na matriz biológica.....	47
7.2.9.2.1. Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento	47
7.2.9.2.2. Estabilidade de curta duração.....	47
7.2.9.2.3. Estabilidade de longa duração	48
7.2.9.2.4. Estabilidade pós-processamento	49
8. CONCLUSÃO	50
9. REGISTRO DE DADOS BRUTOS	51
10. ARQUIVAMENTO.....	51
11. REFERÊNCIAS.....	51
DECLARAÇÃO DO DIRETOR DE ESTUDO	53
DECLARAÇÃO DO GERENTE DA INSTALAÇÃO TESTE E DIRETOR-PRESIDENTE	54

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA PRODUZIDA PELA USP-SÃO CARLOS E A FOSFOETANOLAMINA PADRÃO SIGMA EM PLASMA DE RATO

IDENTIFICAÇÃO

Título do Estudo	DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA PRODUZIDA PELA USP-SÃO CARLOS E A FOSFOETANOLAMINA PADRÃO SIGMA EM PLASMA DE RATO
Número do Estudo	021-DVM-020-15
Patrocinador	Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI Telefone: +55 (61) 2033-7500 Esplanada dos Ministérios, Bloco E Brasília – DF CEP 70067-900
Instalação de Teste	Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos Av. Luiz Boiteux Piazza, 1302 Florianópolis – SC - Brasil CEP 88056-000
Diretor Presidente	Dr. João Batista Calixto Telefone: 48 32612856 E-mail: joao.calixto@ciemp.org.br Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos Av. Luiz Boiteux Piazza, 1302 Florianópolis – SC - Brasil CEP 88056-000
Gerente da Instalação de Teste	Dr. Jarbas Mota Siqueira Junior Telefone: 48 32612856 E-mail: jarbas.siqueira@ciemp.org.br Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos Av. Luiz Boiteux Piazza, 1302 Florianópolis – SC - Brasil CEP 88056-000
Diretora de Estudo	Dra. Raquel Cristina Schwanke Telefone: 48 32612856 E-mail: raquel.schwanke@ciemp.org.br Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos Av. Luiz Boiteux Piazza, 1302 Florianópolis – SC - Brasil CEP 88056-000
Pesquisadora Responsável	Dra. Melina Heller Telefone: 48 32612856 E-mail: melina.heller@ciemp.org.br Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos Av. Luiz Boiteux Piazza, 1302 Florianópolis – SC - Brasil CEP 88056-000
Unidade da Garantia da Qualidade	Franciele Avila Silveira Telefone: 48 32612856 E-mail: franciele.silveira@ciemp.org.br

DECLARAÇÃO DE GARANTIA DA QUALIDADE

Declaro que o Relatório Final foi revisado e reflete os Dados Brutos.

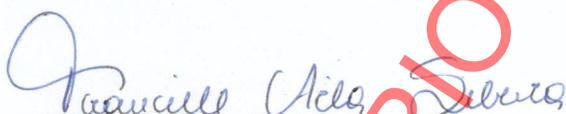
Declaro que foram realizadas auditorias, conforme descrito abaixo, não sendo observadas não conformidades que pudessem afetar a qualidade dos resultados.

Itens Auditados	Data da Auditoria	Data de relato ao DE*	Data de relato ao GIT#
Plano de Estudo	27/01/2016	27/01/2016	27/01/2016
Dados Brutos	03 e 04/08/2016	04/08/2016	04/08/2016
Relatório Final	08/08/2016	08/08/2016	08/08/2016

*DE: Diretor de Estudo; #GIT: Gerente da Instalação de Teste

Auditoria de estudo nº 021-DVM-020-15.

Florianópolis, 08 de agosto de 2016.



Franciele Avila Silveira

Coordenadora da Unidade de Garantia da Qualidade

RESUMO

O estudo de desenvolvimento e validação do método reportado neste relatório, 021-DVM-020-15, intitulado “Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação da Fosfoetanolamina sintética produzida pela USP – São Carlos e a Fosfoetanolamina padrão Sigma em plasma de rato” foi realizado seguindo o modelo BPL (Boas Práticas de Laboratório), praticado no CIE nP e obedecendo a ética de experimentação animal. Os dados gerados foram auditados pela Unidade de Garantia da Qualidade do CIE nP. No presente estudo, o desenvolvimento do método analítico da Substância Teste Fosfoetanolamina Sintética da USP - São Carlos (ST-021.3) e da Substância de Referência Fosfoetanolamina padrão Sigma Aldrich (SR-092) (para fins de comparação) foram realizados utilizando um equipamento de cromatografia líquida de ultra performance (UPLC, do inglês Ultra Performance Liquid Chromatography) acoplado a um espectrômetro de massas com analisador do tipo triplo-quadrupolo (Xevo™ TQ-S, Waters). A validação do método foi realizada conforme os guias das agências reguladoras nacionais e internacionais (ICH, FDA e ANVISA). O desenvolvimento do método analítico para a determinação da Substância Teste Fosfoetanolamina USP foi trabalhoso devido às características físico-químicas da molécula que comprometeram diversas condições de análise. Não obstante às dificuldades, a metodologia analítica descrita neste relatório se mostrou robusta, linear, precisa, reprodutível e com sensibilidade adequada para os níveis de concentração a serem detectados no plasma. A validação da metodologia para as Substâncias Teste e de Referência foi realizada utilizando os seguintes parâmetros: seletividade, efeito de matriz, curva de calibração/linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão, recuperação, estabilidade e robustez. Foram feitas três curvas de calibração ao logo do estudo, todas na faixa de 0,11 a 5,53 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e com R^2 superior a 0,9936, mostrando adequada linearidade. O método mostrou seletividade e especificidade para a substância teste, apesar de acentuado efeito de matriz. Os limites de detecção e quantificação foram 2,74 ng mL^{-1} e 110,00 ng mL^{-1} , respectivamente. Este método foi testado em todos os parâmetros de validação preconizados pela ANVISA e todos apresentaram $\text{CV} \leq 20\%$ como é o recomendado, com exceção de um controle de baixa concentração que se apresentou superior ao valor preconizado para o parâmetro exatidão. O procedimento de preparo de amostra resultou em recuperação média de aproximadamente 45%. No entanto, a recuperação se mostrou consistente, precisa e reprodutiva. Sendo assim, concluiu-se que o método analítico foi validado com sucesso e disponível para ser aplicado na quantificação das Substâncias Teste (Fosfoetanolamina USP) e de Referência (Fosfoetanolamina Sigma) em amostras de plasma de ratos. Porém, cabe ressaltar que a Fosfoetanolamina não se mostrou estável no plasma nos ensaios de estabilidade de curta e longa duração, nem após três ciclos de congelamento e descongelamento. Portanto, é recomendável que se processe e analise as amostras da matriz biológica logo após a coleta.

DATAS

Data do início do estudo: 27/01/2016

Data do início do ensaio: 01/02/2016

Data do término do ensaio: 01/08/2016

Data do término do estudo: 08/08/2016

1. OBJETIVO DO ESTUDO

Desenvolver e validar metodologia analítica para a quantificação da Substância Teste Fosfoetanolamina da USP (ST-021.3) em plasma de rato e aplicação nos estudos de farmacocinética.

2. PESSOAL ENVOLVIDO E SUAS ATRIBUIÇÕES

Nome	Título
Raquel Cristina Schwanke	Diretora de estudo
Melina Heller	Pesquisadora Responsável
Daniela Ferraz Pereira Leite, PhD	Coordenadora de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação
Edir Rezende	Apoio Técnico

3. SUBSTÂNCIA TESTE, SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA, VEÍCULO, REAGENTES E SOLVENTES

3.1. Caracterização da Substância Teste

Nome: Fosfoetanolamina Sintética – USP São Carlos

Nome químico (IUPAC): Não se aplica

Número do CAS: Não se aplica

Lote: Não informado

Data de fabricação: Não informado

Data de validade: Não informado

Pureza/ Composição: ¹Fosfoetanolamina Sintética - 32,2 %; Fosfatos inorgânicos -34,9%; Monoetanolamina protonada- 18,2 %; Pirofosfatos Inorgânicos – 3,6 %, Fosfobisetanolamina – 3,9 %; Água – 7,2%.

²Fosfoetanolamina Sintética - 16,9 %; Sal (de Ca²⁺, Zn²⁺ ou Mg²⁺) de Fosfoetanolamina Sintética - 45,6 %; Monoetanolamina - 37,5 %.

Estabilidade: Não informado

Aspectos físicos: Cristal branco

Fabricante: IQSC - USP

Identificação CIEnP: 021.2 e 021.3

¹Composição do composto “Fosfoetanolamina Sintética-USP” na íntegra em percentagem de massa - Dados fornecidos pela Unicamp.

²Composição da fração solúvel do composto “Fosfoetanolamina Sintética-USP” em percentagem de massa - Dados fornecidos pela USP.

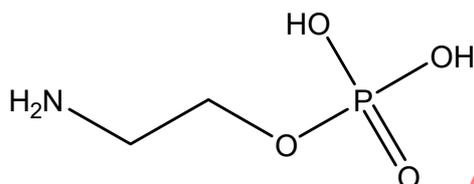


Figura 1. Estrutura molecular da Fosfoetanolamina, Massa Molecular = 141,06 g mol⁻¹.

3.2. Caracterização da Substância de Referência

Nome	: O-Phosphoethanolamine (Fosfoetanolamina)
Nome químico (IUPAC)	: 2-aminoethyl dihydrogen phosphate
Número do CAS	: 1071-23-4
Lote	: BCB157961V
Data de validade	: Não informado
Pureza	: Não informado
Fabricante	: Sigma-Aldrich
Aspectos físicos	: Sólido branco

3.3. Caracterização do Veículo

Não se aplica.

3.4. Caracterização de Reagentes e Solventes utilizados no estudo

Nome	: Metanol
Lote	: 491718
Data de validade	: 05/2018
Pureza	: 99,9% (grau HPLC)
Fabricante	: Panreac (Espanha)

Nome	: Acetonitrila
Lote	: 475265
Data de validade	: 01/2018
Pureza	: 99,9% (grau HPLC)
Fabricante	: Panreac (Espanha)

Nome	: Acetato de amônio
------	---------------------

Lote : BCBL3513V
Data de validade : 22/05/2017
Pureza : 99,0%
Fabricante : Sigma-Aldrich

Nome : Isotiocianato de fenila (Pitc, do inglês Phenyl isothiocyanate)
Lote : BCBL8662V
Data de validade : 04/11/2019
Pureza : 99,0%
Fabricante : Sigma-Aldrich

Nome : Piridina
Lote : SHBG8498V
Data de validade : 21/06/2022
Pureza : 99,9%
Fabricante : Sigma-Aldrich

Nome : Trietilamina
Lote : SHBF7579V
Data de validade : 20/11/2017
Pureza : 99,0%
Fabricante : Sigma-Aldrich

Nome : Etanol absoluto
Lote : 185728
Data de validade : 09/01/2018
Pureza : 99,5%
Fabricante : Synth

3.5. Preparo da Substância Teste e da Substância Referência

Todo método analítico deve ser desenvolvido utilizando um padrão analítico de referência, com grau de pureza conhecido. Sendo assim, este método foi desenvolvido e validado com o padrão analítico de Fosfoetanolamina da marca Sigma Aldrich, no caso, a Substância de Referência Fosfoetanolamina (SR-092), que será denominada no presente estudo "fosfo Sigma". Para tanto, foi pesada a quantidade de 0,0119 g (incerteza de 0,0001 g) de fosfo Sigma em um tubo de centrifuga tipo falcon. Ao tubo, foi adicionado o volume de

10,00 mL de metanol, resultando em uma solução mãe de concentração $1,19 \text{ mg mL}^{-1}$, que foi denominada Solução 1.

Soluções de trabalho na faixa de concentração de 2,38 a $119,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ foram preparadas, diariamente durante todo o período do estudo, por diluição apropriada da Solução 1 em uma mistura de metanol:água 50% (v/v). Cada solução de trabalho foi utilizada para o enriquecimento do plasma, no preparo de calibradores e controles de qualidade de acordo com as concentrações apropriadas.

A Substância Teste Fosfoetanolamina da USP (ST 021.3), enviada ao CIEnP pelo MCTI, apresenta baixo grau de pureza, correspondendo a apenas 32,2% na forma sólida, segundo o Relatório de Caracterização do Conteúdo das Cápsulas de Fosfoetanolamina (FOS) por Análise de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H , ^{13}C e ^{31}P elaborado pelo Laboratório de Química Orgânica Sintética (LQOS) no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, coordenado pelo Prof. Dr. Luiz Carlos Dias, em colaboração com o Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio), da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, coordenado pelo Prof. Dr. Eliezer J. Barreiro. Sendo assim, para garantir que a Substância Teste Fosfoetanolamina da USP (ST 021.3) fabricada pelo Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP), pudesse ser quantificada de maneira adequada a partir da Substância de Referência Fosfoetanolamina da Sigma (SR-092), foi preparada uma solução da Substância Teste nas mesmas concentrações que a Substância de Referência as quais foram, posteriormente, quantificadas através da curva de calibração preparada com a Substância de Referência.

Para preparar a solução com a Substância Teste foi pesada uma quantidade do sólido que correspondesse à concentração da solução mãe feita com a fosfo Sigma ($1,19 \text{ mg/mL}$), ou seja, a solução foi preparada considerando-se que na quantidade pesada teria somente 32,2% de Fosfoetanolamina. Para tanto, foi pesado 0,0315 g do pó que foi solubilizado, em 10,00 mL de água desionizada. Esta solução ficou com a concentração de $1,01 \text{ mg mL}^{-1}$ e foi chamada de ST-021.3-32%. Essa solução precisou ser filtrada em filtros de seringa de $0,45 \text{ } \mu\text{m}$ antes de ser utilizada, pois foi observada a presença de uma fração insolúvel considerável no fundo do tubo falcon. Esta solução, foi preparada e diluída em água desionizada até as concentrações apropriadas no dia do experimento.

Todas as soluções foram devidamente documentadas, rotuladas e armazenadas a uma temperatura de 4°C (geladeira) durante todo o período do estudo.

3.6. Justificativa para a seleção das concentrações da Substância Teste

No processo de validação de um método analítico é necessário trabalhar com controles de qualidade em três níveis de concentração, sendo que estes controles são utilizados nos ensaios de recuperação, exatidão, precisão, seletividade e efeito de matriz. O recomendado pela ANVISA é que as concentrações dos controles de qualidade (CQs) sigam as seguintes proporções: CQB (Controle de Qualidade Baixo) = 3 vezes LQ (Limite de Quantificação); CQM (Controle de Qualidade Médio) = ponto médio da curva de calibração; CQA (Controle de Qualidade Alto) = entre 75 e 85% do maior ponto da curva de calibração. Esses valores foram estipulados após a definição da faixa de aplicação da curva de calibração e do limite de quantificação. No presente estudo, a faixa de aplicação foi baseada na sensibilidade do método analítico.

4. SISTEMA TESTE

Para a obtenção do plasma utilizado neste estudo foram utilizados ratos fêmeas da espécie *Rattus norvegicus* e linhagem Sprague Dawley, a partir de 8 semanas, saudáveis, provenientes do Biotério de Criação do CIEnP. Estes animais, cujas matrizes foram adquiridas da empresa Charles River (USA), são mantidos sob condições SPF “specific pathogen free”.

4.1. Justificativa para a seleção do Sistema Teste

O método analítico foi desenvolvido e validado utilizando a mesma espécie e linhagem, bem como, a mesma matriz biológica (plasma), utilizada nos estudos de farmacocinética (021-PKB-023-15).

4.2. Comitê de ética

Os procedimentos experimentais seguiram as recomendações dos Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O protocolo utilizado neste estudo foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Utilização Animal (CEUA) do CIEnP, sob o número 222/00 (Desenvolvimento e Validação de Método Analítico). Os protocolos aprovados são mantidos em arquivos no CIEnP.

4.3. Alojamento dos Animais

Todas as gaiolas contêm forração tipo maravalha (ASPEN – Lignocel®), material para nidificação (madeira Aspen) e um pequeno bloco de madeira Aspen como enriquecimento

ambiental. A maravalha utilizada para a cama foi previamente autoclavada e renovada periodicamente para manter o ambiente seco e limpo. A temperatura das salas foi ajustada para $21 \pm 2^\circ\text{C}$ com faixa de umidade de 45 - 70%. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12h, sendo que o início do ciclo claro começou às 6:30 da manhã. Por todo o período do estudo, os animais receberam água e ração *ad libitum*, sendo a ração da marca Nuvital CR1® (Quimtia, Colombo, Paraná, Brasil) autoclavada, e a água, filtrada, clorada e embalada na máquina *Hydropac* (Lab Products, Belcamp, Maryland, EUA). O CIEnP realiza mensalmente a avaliação de potabilidade da água fornecida aos animais.

4.3.1. Biotério de Criação

Os animais foram acondicionados no biotério do CIEnP em caixas conectadas em racks microisoladoras fabricadas pela empresa Lab Products, medindo (LxCxA): 31x16x14 cm, com até 5 animais por gaiola.

4.3.2. Biotério de Manutenção

Os animais utilizados neste estudo foram acondicionados no Biotério de Manutenção de roedores do CIEnP em gaiolas conectadas a racks microisoladoras da empresa ALESCO, medindo (LxCxA): 42,2x23x17 cm, e foram aclimatados por um período de no mínimo, 5 dias (no máximo 5 animais por gaiola).

5. ROBUSTEZ, RASTREABILIDADE E REPRODUTIBILIDADE

Com o intuito de eliminar possíveis desvios que possam interferir na confiabilidade, rastreabilidade e na reprodutibilidade dos resultados do estudo, foram empregados os critérios propostos pelo ARRIVE (do inglês, Animal Research Reporting In Vivo Experiments) (Kilkenny et al., 2010) e adotados pelos periódicos British Journal of Pharmacology (McGrath e Liley, 2015) e Biochemical Pharmacology (Mullane et al., 2015). Para isso, os seguintes procedimentos foram rigorosamente aplicados desde o planejamento experimental até a realização dos experimentos: 1) Nenhum dado foi excluído ou incluído nos resultados; 2) Todos os reagentes foram obtidos de fornecedores credenciados pelo CIEnP e somente foram usados dentro do prazo de validade indicado pelo Fabricante; 3) Todos dados brutos gerados foram pronta e imediatamente registrados pelo pessoal responsável pela condução do estudo e foram auditados pela UGQ.

6. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

A validação do método foi conduzida conforme os guias das agências reguladoras nacionais e internacionais ICH (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*), FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) e ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

O desenvolvimento e a validação da metodologia foram realizados utilizando os seguintes parâmetros: curva de calibração/linearidade, seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão, recuperação, efeito de matriz, estabilidade e robustez.

Uma vez validado, o método analítico foi utilizado para a quantificação da Substância Teste nas amostras de plasma de ratos a fim de se determinar o perfil farmacocinético da mesma (estudo 021-PKB-023-15 descrito em relatório específico).

6.1. Desenvolvimento do método analítico

6.1.1. Caracterização e ionização da substância teste no MSMS

O método analítico foi desenvolvido utilizando equipamento do tipo UPLC-MSMS cujo sistema é composto por um espectrômetro de massas Xevo TQS com analisador de massas tipo triploquadrupolo, da marca Waters (Reino Unido). O espectrômetro de massas foi acoplado a um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (Acquity H-Class) equipado com degaseificador, sistema de bombas quaternário, forno para coluna cromatográfica, amostrador com controle de temperatura e injetor automático, também da marca Waters. A aquisição e o tratamento dos dados foram realizados com o software MassLynx, versão 4.1.

O espectrômetro de massas foi calibrado nos modos de íons positivos e negativos com uma solução padrão de calibração de ácido fosfórico. Nitrogênio foi utilizado como gás nebulizante (150 L/hora) e gás secante (1100 L/hora). Outros parâmetros do MS: fonte de ionização, *electrospray*; tensão do capilar, 3000 V; temperatura da fonte, 550 °C; voltagem do cone, 25 V. Os parâmetros da cela de colisão foram: vazão do gás de colisão (argônio), 0,15 mL/min; energia de colisão, 20 eV.

6.1.2. Condições cromatográficas

Para a separação cromatográfica do analito foi escolhida uma coluna cromatográfica de fase reversa C18 (Acquity UPLC® BEH C18 5,0 cm x 2,1 mm, 1,7 µm, marca Waters).

Os solventes constituintes da fase móvel foram: acetato de amônio 10,00 mmol L⁻¹ em água desionizada (solvente A) e Acetonitrila (solvente B) e o modo de eluição por

gradiente linear foi o que proporcionou a melhor separação do analito de outros interferentes da matriz. A Tabela 1 apresenta a programação do gradiente utilizado na separação da Substância Teste e da Substância de Referência. A taxa de fluxo da fase móvel foi fixada em 200,00 $\mu\text{L min}^{-1}$. Em todas as corridas, o volume injetado foi de 1,00 μL .

A temperatura do forno foi ajustada a 30°C para todas as corridas analíticas, assim como, a temperatura do amostrador que foi mantida a 10°C sempre que amostras, controles de qualidade ou calibradores, permaneceram no equipamento.

Tabela 1. Composição da fase móvel e gradiente utilizado na determinação da Fosfoetanolamina (Substância Teste e de Referência) em amostras de plasma.

Tempo (min)	% Acetonitrila
0,00	5
1,00	5
2,00	95
3,00	95
3,10	5
5,00	5

6.1.3. Obtenção do Plasma

Para o desenvolvimento e validação do método analítico foi gerado um banco de plasma de ratos fêmeas da linhagem Sprague Dawley não tratados. O volume de aproximadamente 10,0 mL de sangue circulante de cada animal foi coletado por punção cardíaca terminal e centrifugado, separadamente, a 4 °C, 4.000 rpm por 15 minutos. O plasma resultante foi misturado para obtenção de um pool de plasma homogêneo.

6.1.4. Extração da Substância Teste do plasma

O procedimento de extração das amostras descrito a seguir foi aplicado no preparo dos calibradores e controles de qualidade (CQs):

1. A fortificação das amostras de plasma com a Substância de Referência para confecção dos calibradores e controles de qualidade de validação do método foi realizada adicionando-se 10,0 μL de calibrador a 50,0 μL de plasma branco, nas concentrações estipuladas para a curva de calibração e para os CQs;

2. A 60,0 μL de volume total (plasma + solução de trabalho, no caso das amostras de validação) foi adicionado 150,0 μL de solução de acoplamento e 5,0 μL de Pitc;
3. As amostras foram agitadas em vórtex por 1 minuto;
4. Colocadas em estufa à 60 °C por 10 minutos;
5. Agitadas em vórtex por 15 segundos;
6. Colocadas em freezer a -20 °C por 5 minutos;
7. Agitadas em vórtex por 15 segundos;
8. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 14.000 RPM;
9. 150,0 μL do sobrenadante foi transferido para o vial de injeção;
10. Foi injetado 1,0 μL da amostra no UPLC-MSMS.

6.2 Validação do método analítico

6.2.1. Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) foi determinado pelo método baseado na relação sinal ruído, pelo qual é feita a comparação entre a medição do sinal do analito em baixas concentrações (neste caso 110,00 ng mL^{-1} , menor ponto da curva de calibração) e o sinal dado pela linha de base no cromatograma. Assim, é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser corretamente detectada. A relação sinal-ruído pode ser de 3:1 ou 2:1, proporções geralmente aceitas como estimativas do limite de detecção (Ribani et al., 2004).

O menor ponto da curva de calibração foi considerado como parâmetro validado para o limite de quantificação (LQ). Vale ressaltar que, o limite de quantificação representa a concentração mais baixa de um analito que pode ser determinada com precisão aceitável (repetitividade) e exatidão, nas condições declaradas no ensaio.

6.2.2. Seletividade

Para determinação da seletividade, o método analítico foi primeiramente desenvolvido em solvente. A seguir, a Substância de Referência foi adicionada a oito amostras distintas de plasma branco, na concentração correspondente ao LQ (0,11 $\mu\text{g mL}^{-1}$). O processamento das amostras foi realizado como descrito na Seção 6.1.4. Em seguida, foram preparadas oito amostras de plasma branco sem adição do composto para poder verificar se, no tempo de retenção do analito, ocorreria a eluição de algum interferente. Todas as amostras foram analisadas de acordo com as condições cromatográficas propostas.

6.2.3. Efeito de matriz

Na cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, o efeito de matriz avalia se substâncias, inerentes à matriz (que podem coeluir ou não com os compostos de interesse), afetam a ionização dos mesmos, provocando supressão ou aumento do sinal proveniente da formação de íons.

A razão da resposta entre a amostra pós-extração e a solução preparada em solvente, determina o grau do efeito de matriz.

O procedimento foi realizado através do preparo de seis amostras de plasma branco utilizando o tratamento da amostra escolhido, ou seja, a 50,0 µL de plasma branco foi adicionado 150,0 µL de solução de acoplamento e 5,0 µL de Pitc; essas amostras foram submetidas ao processo descrito na Seção 6.1.4. Cada amostra de plasma branco processada rendeu um volume final de 205,0 µL, então foi adicionado 5 µL de um CQ na concentração de 4,27 µg mL⁻¹ preparado em metanol:água 50% e derivatizado separadamente, para resultar em uma concentração final de 0,10 µg mL⁻¹. O CQ 4,27 µg mL⁻¹ foi preparado a partir da diluição (seis vezes) de uma solução de 91,80 µg mL⁻¹ da Substância de Referência (concentração final 15,3 µg mL⁻¹), a 60 µL dessa solução foi adicionado 150,0 µL de solução de acoplamento e 5,0 µL de Pitc, resultando na concentração final pretendida de 4,27 µg mL⁻¹.

Paralelamente, foram preparados seis CQs em metanol:água 50% na concentração final de 0,10 µg mL⁻¹ para avaliação da resposta do analito na ausência da matriz. Estes CQs foram preparados da seguinte maneira: uma solução da Substância de Referência na concentração de 2,16 µg mL⁻¹ foi diluída seis vezes, resultando em uma solução na concentração de 0,36 µg mL⁻¹; então, a 60 µL dessa solução foi adicionado 150,0 µL de solução de acoplamento e 5,0 µL de Pitc, resultando na concentração final de 0,10 µg mL⁻¹. Estes CQs também foram submetidos ao processo descrito na Seção 6.1.4.

6.2.4. Linearidade

Para a avaliação da linearidade do método, foram construídas três curvas de calibração distintas em plasma na faixa de aplicação de 0,11 a 5,53 µg mL⁻¹. Os calibradores foram preparados da seguinte maneira: primeiramente a curva de calibração foi construída em uma mistura de metanol:água 50% (v/v) em uma faixa de concentração de 2,38 a 119,00 µg mL⁻¹, a partir da solução 1 da Substância de Referência Fosfoetanolamina Sigma (SR 092) na concentração de 1,19 mg mL⁻¹ (Tabela 2). Em seguida, cada ponto da curva em

solvente foi diluído seis vezes em plasma branco, resultando em uma curva de calibração na faixa de 0,40 a 19,83 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 3) que após todo o procedimento de preparo de amostra, conforme descrito na seção 6.1.4, resultou nas curvas com a faixa de aplicação desejada (Tabelas 4).

Tabela 2. Preparação dos Calibradores da Substância de Referência em solvente.

Calibrador	Vol. ^a SR ^b , (1,19 mg mL^{-1})	Vol. Solvente,	Conc. ^c , ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
	μL	μL	μL
P1 ^d	2,0	998,0	2,38
P2	10,0	990,0	11,88
P3	20,0	980,0	23,76
P4	40,0	960,0	47,52
P5	61,0	939,0	72,36
P6	81,0	919,0	96,12
P7	100,0	900,0	119,00

^aVol – Volume; ^bSR– Substância de Referência; ^cConc. – Concentração;

^dPonto da Curva.

Tabela 3. Preparação dos calibradores da Substância de Referência em plasma.

SR ^b - Conc. Inicial em solvente ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Vol ^a . SR em solvente (μL)	Vol. Plasma (μL)	Conc. ^c . SR no plasma ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
2,38	10,0	50,0	0,40
11,88	10,0	50,0	1,98
23,76	10,0	50,0	3,96
47,52	10,0	50,0	7,92
72,36	10,0	50,0	12,06
96,12	10,0	50,0	16,02
119,00	10,0	50,0	19,83

^aVol – Volume; ^bSR– Substância de Referência; ^cConc. – Concentração.

Tabela 4. Dados relativos a construção das curvas de calibração da Substância de Referência em plasma.

SR ^b - Conc. ^c . Inicial no plasma ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	SR - Conc. Final no plasma ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Vol ^a . Plasma + SR (μL)	Vol. Sol. Aco.* (μL)	Vol. Pite (μL)	Vol. Total (μL)
0,40	0,11	60,0	150,0	5,0	215,0
1,98	0,55	60,0	150,0	5,0	215,0
3,96	1,11	60,0	150,0	5,0	215,0
7,92	2,21	60,0	150,0	5,0	215,0
12,06	3,37	60,0	150,0	5,0	215,0
16,02	4,47	60,0	150,0	5,0	215,0
19,83	5,53	60,0	150,0	5,0	215,0

*Sol. Aco. – Solução de Acoplamento; ^aVol – Volume; ^bSR – Substância de Referência; ^cConc. – Concentração.

As curvas de calibração foram injetadas sempre no mesmo dia do preparo. A construção da curva de regressão linear foi obtida por meio do método dos mínimos quadrados. A linearidade foi avaliada considerando o coeficiente de correlação r e aplicando-se o teste de hipótese de linearidade *a priori*.

6.2.5. Recuperação

Para a avaliação da eficiência da extração, assim como, da reprodutibilidade da reação de derivatização da Substância de Referência na matriz biológica foram utilizadas concentrações em três níveis: baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA), de acordo com a curva de calibração, as quais foram utilizadas como controles de qualidade do método.

Inicialmente, foi estipulada a faixa de aplicação do método: 0,11 a 5,53 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O recomendado pela ANVISA é que as concentrações dos controles de qualidade (CQs) sigam as seguintes proporções: CQB = 3 vezes LQ; CQM = ponto médio da curva de calibração; CQA = entre 75 e 85% do maior ponto da curva de calibração. Os controles de qualidade no plasma foram preparados como descrito a seguir:

1. A partir da solução 1 da Substância de Referência foram preparados três CQs nas concentrações: 6,48, 61,56 e 96,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Estes controles foram preparados em metanol:água 50% (v/v) nos dias das análises;

2. Em seguida, foi adicionado 10,00 µL de cada CQ a 50,00 µL de metanol:água 50% (v/v) ou a 50,00 µL de plasma, resultando nas concentrações de: 1,08, 10,26 e 16,02 µg mL⁻¹. Estes controles após todo o procedimento de preparo de amostra, conforme descrito na seção 6.1.4, resultaram nas concentrações finais desejadas para o estudo: CQB = 0,30 µg mL⁻¹, CQM = 2,86 µg mL⁻¹ e CQA = 4,47 µg mL⁻¹. Os CQs em solvente foram preparados em triplicata e os CQs em plasma em quintuplicata.

6.2.6. Precisão

No presente trabalho foram avaliadas a precisão instrumental, a precisão intra-ensaio e a precisão intermediária (inter-ensaio). A precisão instrumental foi determinada pela injeção de uma amostra de plasma e de solvente adicionadas de Substância de Referência na mesma concentração que o limite de quantificação (0,11 µg mL⁻¹) dez vezes, consecutivamente. A resposta avaliada foi a área do pico da Fosfoetanolamina.

Para a avaliação da precisão intra-ensaio foram preparadas cinco replicatas dos controles de qualidade CQB, CQM e CQA em plasma. A precisão intermediária (repetibilidade) foi verificada através da repetição do procedimento experimental utilizado para determinação da precisão intra-ensaio, em dois dias distintos. A resposta avaliada para ambos ensaios foi a área do pico da fosfo Sigma e os resultados foram expressos como coeficiente de variação percentual (CV%).

6.2.7. Exatidão (bias)

Neste trabalho, a exatidão do método analítico foi verificada através da repetição do procedimento experimental adotado na determinação da repetibilidade (Seção 6.2.6.), mas em dois dias distintos. A exatidão foi expressa como o desvio em porcentagem bias do valor de referência utilizando a seguinte equação:

$$\text{Exatidão (\%bias)} = \left(\frac{x_i - x}{x} \right) \times 100$$

Onde x_i é o valor de concentração experimental e x é o valor de concentração nominal da determinação.

6.2.8. Robustez

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta frente a pequenas variações. No presente trabalho, a robustez foi avaliada através da observação da sensibilidade, da linearidade e da diferença estatística entre duas curvas de calibração distintas analisadas em duas colunas Acquity UPLC® BEH C18 com comprimento de 50 mm,

diâmetro interno de 2,1 mm e tamanho da partícula igual a 1,7 μm disponíveis no laboratório. As curvas foram construídas com 8 níveis de concentração em metanol:água 50% de acordo com o processamento das amostras descrito na Seção 6.1.4.

6.2.9. Estabilidade

Para assegurar que a estabilidade do analito seja mantida nas condições de preparo, análise e estocagem das amostras, vários tipos de estabilidade devem ser avaliados durante a validação de um método analítico: estabilidade das soluções padrão, estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, estabilidade de curta duração, estabilidade das amostras processadas e estabilidade de longa duração (Cass et al., 2009).

6.2.9.1. Estabilidade em solução

O teste de estabilidade da Fosfoetanolamina em solução foi realizado da seguinte forma: a partir da solução 1 da Substância de Referência foram preparados dois CQs nas concentrações 19,44 e 96,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em seguida, adicionou-se 10,00 μL de cada CQ a 50,00 μL de metanol:água 50% (v/v), resultando nas concentrações de 3,24 e 16,02 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, estes controles foram armazenados em geladeira à 4 °C por 12 horas. Após este período, os mesmos controles foram deixados à temperatura ambiente para arrefecimento e, posteriormente, foram submetidos ao procedimento de preparo de amostra, conforme descrito na seção 6.1.4, resultando nas concentrações finais desejadas para o estudo: 0,90 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 4,47 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os CQs em solvente foram preparados em triplicata.

O resultado foi observado pelo coeficiente de variação percentual (%) entre a média das áreas dos picos cromatográficos das triplicatas dos CQs preparadas no momento do ensaio e após permanecerem 12 horas no refrigerador.

6.2.9.2. Estabilidade na matriz biológica

Neste trabalho, a estabilidade da Substância de Referência Fosfoetanolamina SIGMA (SR 092) na matriz biológica, foi determinada a partir dos testes de congelamento e descongelamento, estabilidade de curta duração, estabilidade pós-processamento e estabilidade de longa duração. Todos os testes foram realizados com CQs sempre nas concentrações de 0,90 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 4,47 $\mu\text{g mL}^{-1}$, preparados em triplicata, processados conforme procedimento descrito na Seção 6.2.9.1, porém neste caso, os mesmos 10,00 μL dos CQs 19,44 e 96,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram adicionados a 50,00 μL de plasma.

6.2.9.2.1. Estabilidade após ciclos de congelamento/descongelamento

Neste teste, os controles passaram por três ciclos de congelamento e descongelamento. As triplicatas dos CQs foram preparadas até a etapa em que chegaram à concentração de 3,24 e 16,02 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e congeladas por um intervalo de 12 horas. Após este período, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente, novamente congeladas e assim sucessivamente por 3 ciclos. O ensaio iniciou em 27/06/16 e terminou em 30/06/16 e, neste dia, os controles foram processados conforme descrito na seção 6.1.4, resultando nas concentrações finais desejadas para o estudo: 0,90 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 4,47 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O resultado foi observado pelo coeficiente de variação percentual (CV%) entre a concentração média determinada para as triplicatas dos CQs após 3 ciclos de congelamento/descongelamento e a concentração nominal de cada CQ, sendo que a concentração de cada replicata foi determinada em uma curva de calibração previamente preparada e analisada.

6.2.9.2.2. Estabilidade de curta duração

Nesta etapa, as triplicatas dos CQs foram preparadas e mantidas à temperatura ambiente por um intervalo de 24 horas. Após este período, as amostras foram derivatizadas conforme descrito na seção 6.1.4 e injetadas no equipamento de UPLC-MSMS. O resultado foi determinado pelo coeficiente de variação percentual (CV%) entre a concentração média determinada para as triplicatas dos CQs após 24 horas em temperatura ambiente e a concentração nominal de cada CQ, sendo que a concentração de cada replicata foi determinada em uma curva de calibração previamente preparada e analisada.

6.2.9.2.3. Estabilidade de longa duração

Nesta etapa, as amostras devem ser processadas e analisadas após serem armazenadas por um período que exceda o intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra em estudo e a análise da última. Portanto, foram escolhidas amostras coletadas após a administração oral da Substância de Referência na dose de 1000 mg/kg a dois animais no dia 07/06/16. As amostras de sangue foram coletadas no mesmo dia da administração nos seguintes intervalos de tempo: 0, 15, 30, 60, 120, 240, 360, 480 e 600 minutos, sendo que o plasma foi separado como descrito na Seção 6.1.3. Estas amostras de plasma foram congeladas em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e processadas e analisadas no dia 24/06/16, conforme descrito na seção 6.1.4, ficando um período de dezessete dias entre a coleta e a análise.

6.2.9.2.4. Estabilidade pós-processamento

Nesta etapa, as triplicatas dos CQs foram preparadas conforme descrito na seção 6.1.4 e mantidas dentro do amostrador do equipamento de UPLC, à temperatura de 10 °C por um intervalo de 20 horas e 36 minutos. Após este período, as amostras foram analisadas e a sua concentração foi determinada em uma curva de calibração previamente preparada e analisada. O resultado foi determinado pelo coeficiente de variação percentual (CV%) entre a concentração média determinada para as triplicatas dos CQs após aproximadamente 21 horas no amostrador e a concentração nominal de cada CQ.

6.3 Aplicação do método analítico validado

O método proposto utilizando a técnica de UPLC-MSMS foi aplicado na determinação do perfil farmacocinético da Substância Teste e de Referência em ratos após administração oral e intravenosa das mesmas (estudo 021-PKB-023-15) e que será descrito em relatório específico. Todas as amostras foram processadas de acordo com o procedimento descrito na Seção 6.1.4. Neste caso, 50 µL de amostra de plasma coletada de cada animal foram individualmente e imediatamente submetidas ao processo de extração e analisadas. Ressalvas devem ser feitas nos casos em que se obteve volume de plasma inferior a 50 µL.

6.4 Eutanásia

A eutanásia dos animais utilizados na obtenção do plasma foi realizada através de punção cardíaca terminal, conforme POP-E.06/versão atual.

6.5 Estatística

Os dados referentes às replicatas de preparo dos calibradores e dos controles de qualidade dos procedimentos de validação do método e quantificação das amostras foram expressos como média, desvio padrão e coeficiente de variação percentual (CV%) da área do pico. A avaliação estatística da linearidade foi realizada através da análise da regressão e do ajuste do modelo linear, assim como por testes de hipótese de linearidade *a priori*, com intervalo de confiança de 95%. A comparação estatística entre os resultados da média das áreas do pico, quando relevante, foi efetuada através do teste *t*: valores de *p* bi-caudal maiores que 0,05 e o $t_{\text{calculado}}$ menor que o $t_{\text{crítico}}$ na comparação das áreas, foram considerados não significativos com um intervalo de confiança de 95%. A análise estatística foi processada no software Microsoft Excel® 2013.

7. RESULTADOS

7.1 Desenvolvimento do método analítico

7.1.1. Extração da Substância Teste do plasma

Apesar de parecer que a Substância Teste Fosfoetanolamina USP (ST 021.3) e a Substância de Referência Fosfoetanolamina da Sigma são exatamente o mesmo composto, a Substância Teste apresenta algumas outras substâncias em sua composição que são insolúveis na maioria dos solventes orgânicos utilizados no preparo de amostra comumente utilizados na extração de compostos do plasma. No presente estudo, foi avaliada a solubilidade da Substância Teste Fosfoetanolamina USP, em diferentes solventes, por inspeção visual. Para isso, foi pesado, aproximadamente, 10 mg da Substância Teste em tubos de ensaio distintos e ao primeiro deles foi adicionado 5,0 mL de água, ao segundo 5,0 mL de metanol, ao terceiro 5,0 mL de etanol, ao quarto 5,0 mL de Acetonitrila e ao quinto 5,0 mL de Acetato de Etila. A Substância Teste não se dissolveu nos tubos que continham solvente orgânico, ela se solubilizou somente em água. Então, aos tubos com os solventes foi adicionado também 5,0 mL de água (Tabela 5). Com o solvente mais apolar (Acetato de Etila) a baixa solubilidade já era esperada para um composto altamente polar. Entretanto, o fato é que, embora tenha ocorrido naturalmente a separação entre as fases orgânica e aquosa, após a adição de água foi observada a solubilização acentuada do precipitado. Porém, mesmo em água pura a solubilização do corpo de fundo não foi total, pois foi preciso filtrar a solução antes de utilizá-la para evitar o entupimento da coluna cromatográfica e/ou do equipamento de UPLC-MSMS.

Tabela 5. Solubilidade da Substância Teste Fosfoetanolamina USP, em diferentes solventes, por inspeção visual.

Fosfo USP ST-021.1 (mg)	Solvente (mL)	Presença de precipitado
13,4	água	*
17,3	Metanol	**
24,7	etanol	**
12,2	Acetonitrila	***
19,8	Acetato de Etila	****

* pouco visível, ** razoavelmente visível, *** acentuadamente visível, **** muito visível.

Além da diferença entre a solubilidade da Substância de Referência (Fosfoetanolamina Sigma) e a da Substância Teste (Fosfoetanolamina USP), a Fosfoetanolamina, por si só, possui algumas características que dificultam a sua análise por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, entre elas:

- Ausência de grupo cromóforo que absorva a radiação ultravioleta ou que permita que a molécula emita fluorescência, impossibilitando a sua detecção por detectores de fotodiodos ou de fluorescência;
- Composto muito polar, zwitteriônico, com grande caráter iônico que não interage com a fase estacionária de colunas cromatográficas comumente utilizadas em fase reversa, ou seja, polímeros do tipo C18 ou C8 e, este fato, impossibilita a separação adequada do composto de interesse de outras substâncias presentes na matriz da amostra; além disso, a falta de partição com a fase estacionária faz com que o analito elua no volume morto da coluna e isto acarreta em falta de reprodutibilidade de área do pico cromatográfico, fato que prejudica diretamente os resultados obtidos;
- Moléculas de forte polaridade, frequentemente, exigem o uso de pareadores iônicos ou colunas trocadoras de íons para serem analisadas por cromatografia líquida, o que leva a um preparo de amostra complicado, necessitando de um grande volume de amostra e estes métodos, geralmente, levam a corridas analíticas mais longas.

As características citadas acima fazem surgir como alternativa para possibilitar a análise de compostos como a Fosfoetanolamina, o processo de derivatização química que consiste em introduzir na molécula de interesse, através de uma reação química, uma outra porção, gerando uma nova molécula com características físico-químicas distintas da original.

No presente estudo, foi utilizado o isotiocianato de fenila (Pitc) como agente derivatizante para a Fosfoetanolamina, pois o Pitc é um composto largamente utilizado para a derivatização de aminoácidos e bifosfonatos, que assim como a Fosfoetanolamina, também possuem um grupo N-terminal em sua estrutura (Molnár-Perl, 2005; Lapko et al., 2014).

Para realizar a reação de derivatização entre o Pitc e a Fosfoetanolamina foi seguido o protocolo de derivatização da empresa Thermo Scientific que utiliza uma solução de acoplamento como meio reacional que consiste em Acetonitrila: Piridina: Trietilamina: H₂O nas proporções 10:5:2:3 (Thermo, 2008). Entretanto, a água foi substituída por etanol absoluto na mesma proporção para melhorar a eficiência de precipitação das proteínas do plasma; e esta substituição foi mais conveniente para o composto derivatizado, uma vez que o Pitc é

muito solúvel em etanol, trietilamina e piridina. Além de garantir a solubilidade do Pitc, o uso de piridina e trietilamina favorecem a desprotonação do grupo amino, necessária para a derivatização, fato que ocorre em $\text{pH} > 12$. Baseado no que se sabe sobre a reação com aminoácidos, espera-se que o produto formado seja um feniltiocarbamil de Fosfoetanolamina (Figura 2) (Sparidans, 1997).

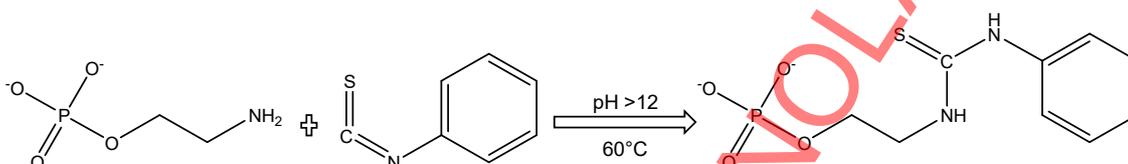


Figura 2. Reação de derivatização da Fosfoetanolamina com Pitc em feniltiocarbamil-Fosfoetanolamina.

Para se obter melhor rendimento no processo de derivatização e manter o método e o procedimento de preparo de amostra o mais rápido possível, o tempo e a temperatura de reação foram estipulados em 10 minutos e $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ em estufa. Nas condições experimentais utilizadas, a porcentagem de conversão foi de 88%, o qual foi determinado diretamente pelo monitoramento da área do pico de Fosfoetanolamina não derivatizada. Para terminar a reação, o meio reacional foi colocado em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos.

Em relação aos volumes de solução de acoplamento e de plasma (ou solvente, quando foi o caso) utilizou-se a mesma proporção que a utilizada comumente para a precipitação de proteínas com Acetonitrila, ou seja, 3:1; por isso, o volume de $150\text{ }\mu\text{L}$ de solução de acoplamento para $50\text{ }\mu\text{L}$ de plasma.

7.1.2. Caracterização da Substância Teste por Espectrometria de Massas e Condições Cromatográficas

As características físico-químicas da Fosfoetanolamina não tornaram difícil somente a sua extração do plasma, mas também à sua caracterização e ionização por espectrometria de massas devido a sua baixa detectabilidade.

Foi necessária a infusão da Substância Teste Fosfoetanolamina USP no espectrômetro de massas com uma concentração de $13,40\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ para se obter um sinal razoavelmente alto no modo de ionização positivo e essa concentração é muito elevada para os padrões de sensibilidade desta técnica (Figura 3). Na tentativa de melhorar a sensibilidade, foram testados os modos de ionização positivo e negativo, além de vários

aditivos que são notórios em amplificar o sinal de compostos que são pobremente ionizáveis, como ácido fórmico e hidróxido de amônio, mas sem sucesso.

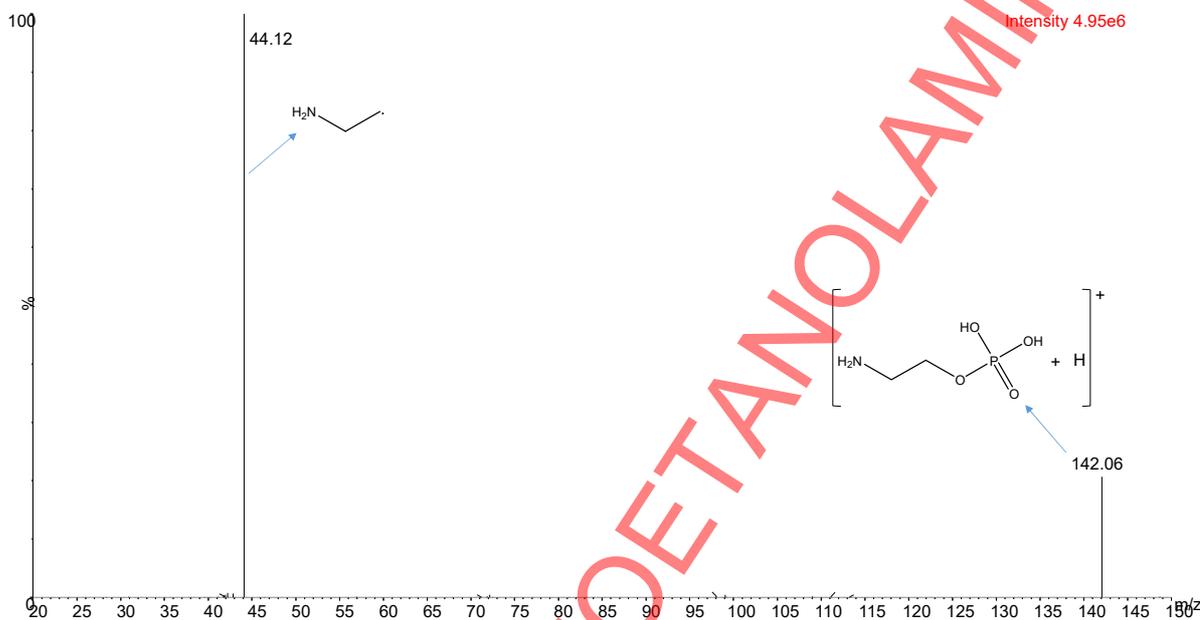


Figura 3. Espectro de massas da Substância Teste Fosfoetanolamina USP não derivatizada infundida a $13,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ em modo de ionização positivo e modo de escaneamento de massas *Product ion MS2* em analisador de massas tipo triploquadropolo.

Por outro lado, a concentração da Substância de Referência Fosfoetanolamina Sigma não derivatizada infundida foi de $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ e com esta concentração obteve-se um sinal satisfatório tanto no modo de ionização negativo quanto no positivo (Figuras 4 e 5). Assim, a diferença nas concentrações necessárias para se obter um sinal relevante na infusão no espectrômetro de massas corrobora a baixa porcentagem de Fosfoetanolamina determinada pelo Relatório de Caracterização do Conteúdo das Cápsulas de Fosfoetanolamina (FOS) para o MCTI por Análise de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H , ^{13}C e ^{31}P elaborado pelo Laboratório de Química Orgânica Sintética (LQOS) no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA PRODUZIDA PELA USP-SÃO CARLOS E A FOSFOETANOLAMINA PADRÃO SIGMA EM PLASMA DE RATO

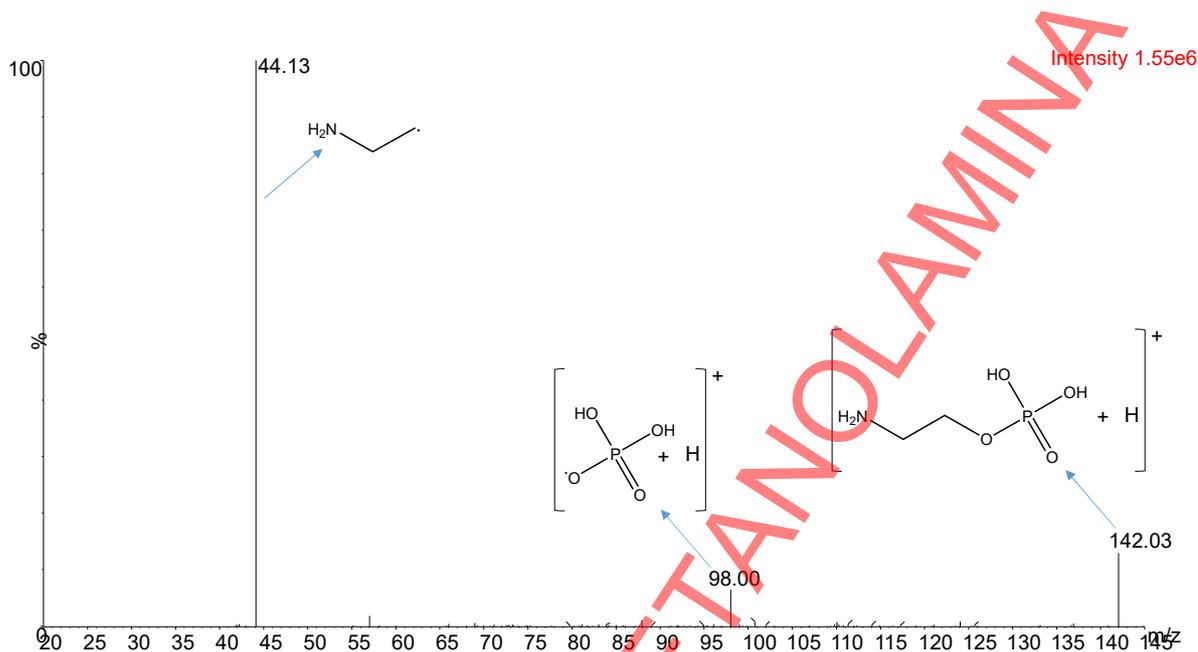


Figura 4. Espectro de massas da Substância de Referência Fosfoetanolamina Sigma não derivatizada infundida a $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ em modo de ionização positivo e modo de escaneamento de massas *Product ion MS2* em analisador de massas tipo triploquadrupolo.

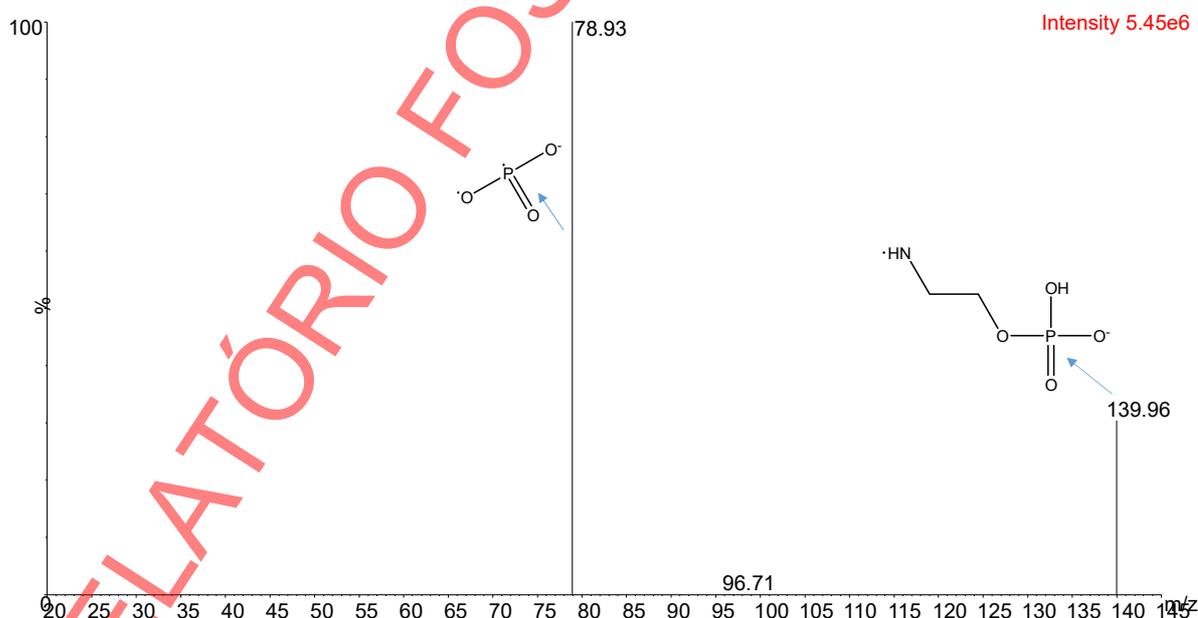


Figura 5. Espectro de massas da Substância de Referência Fosfoetanolamina Sigma não derivatizada infundida a $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ em modo de ionização negativo e modo de escaneamento de massas *Product ion MS2* em analisador de massas tipo triploquadrupolo.

Com a concentração da Substância de Referência Fosfoetanolamina Sigma derivatizada de $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ obteve-se um sinal bastante adequado no modo de ionização negativo para prosseguimento na caracterização da molécula, sendo que este foi amplificado pela infusão combinada de acetato de amônio 10 mmol L^{-1} e Acetonitrila, solventes que foram escolhidos como componentes da fase móvel para as corridas cromatográficas. Cabe ressaltar que, para a infusão do derivatizado no espectrômetro de massas, foi aplicado o mesmo procedimento descrito na Seção 6.1.4.

Assim, a derivatização da Substância de Referência e da Substância Teste melhorou a eficiência de ionização e aumentou significativamente a sensibilidade na detecção e, isto é altamente desejável para métodos bioanalíticos em que os compostos de interesse estão presentes em baixas concentrações.

O presente estudo foi realizado em um espectrômetro de massas que permite monitorar o íon precursor, assim como, os íons produto de um determinado composto. Isto se deve ao fato de que este equipamento possui uma cela de colisão entre dois analisadores de massas distintos, ou seja, no primeiro analisador é identificado o íon precursor que é fragmentando na cela de colisão e seus fragmentos ou íons produto são analisados no segundo analisador de massas. Esta característica faz com que os métodos analíticos desenvolvidos com esta técnica sejam muito mais seletivos e específicos, uma vez que, nenhuma molécula tem o mesmo perfil de fragmentação de uma outra.

Outra vantagem desta técnica é a possibilidade de se utilizar o modo de varredura de massas MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas) que, em se tratando de análises quantitativas, é o modo mais adequado por ser mais sensível e seletivo. Neste modo, como foi dito anteriormente, o terceiro quadrupolo trabalha com o monitoramento de um ou mais íons produto de m/z específica provenientes da fragmentação de um íon precursor de interesse.

Utilizando as condições cromatográficas selecionadas para análise das Substâncias Teste e de Referência, na sua condição não derivatizada, o íon precursor encontrado foi o íon com m/z 142, enquanto que entre os fragmentos gerados, o mais abundante foi o m/z 44. No caso da Fosfoetanolamina (ST e SR) derivatizada, o íon precursor encontrado foi o íon com m/z 275, mas a modificação com um elemento estrutural definido como o Pitc favoreceu a produção de reações de fragmentação específicas no MSMS, pois o produto da fragmentação foi a porção do analito intacto (m/z 140), isto é, após a incidência da energia

de colisão o fragmento gerado foi a própria Fosfoetanolamina, o que salienta a especificidade do método, como é apresentado no espectro de massas da Figura 6.

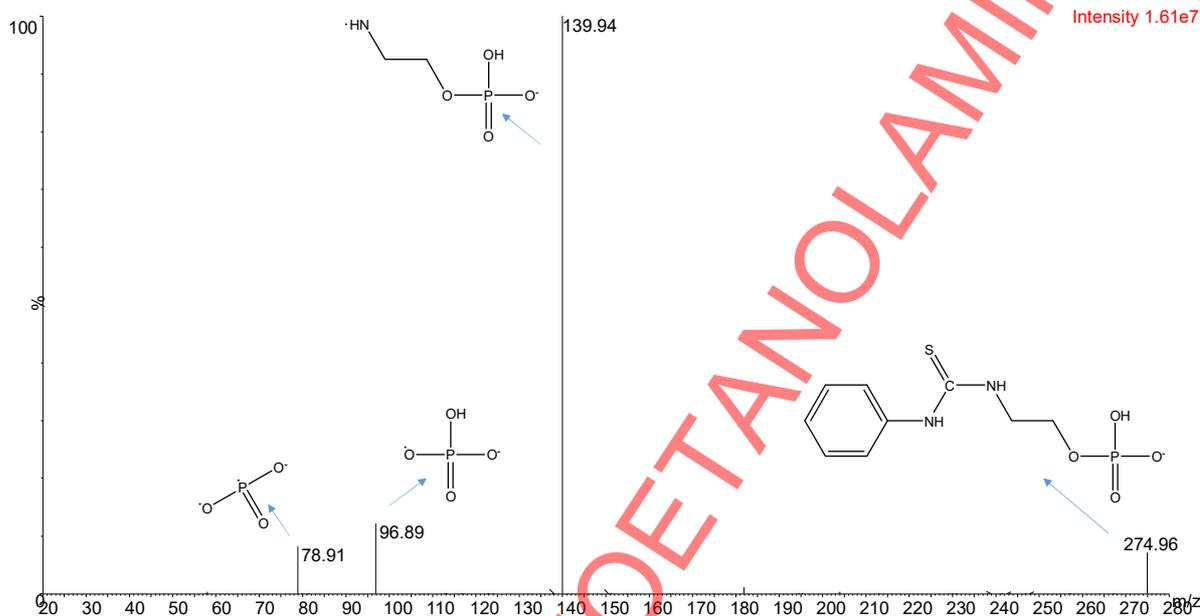


Figura 6. Espectro de massas da Substância de Referência Fosfoetanolamina Sigma derivatizada infundida a $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ em modo de ionização negativa e modo de escaneamento de massas *Product ion* MS2 em analisador de massas tipo triploquadrupolo.

Em relação ao método cromatográfico, a Fosfoetanolamina (ST e SR) não derivatizada apresentou fraca retenção em mais de 15 colunas cromatográficas testadas com vários tipos de fases estacionárias, sendo que o seu tempo de retenção foi de 0,40 minutos, aproximadamente, em quase todas as colunas. No entanto, após a derivatização, a estrutura da Fosfoetanolamina mudou, como mostra a Figura 2. A Fosfoetanolamina (ST e SR) derivatizada se tornou um composto mais lipofílico, desse modo, a sua capacidade de retenção na coluna cromatográfica melhorou significativamente e isto ajudou a diminuir os efeitos de matriz resultantes da co-eluição de componentes oriundos do plasma. O t_0 (tempo de retenção de um composto não retido) da coluna cromatográfica escolhida para a análise da Fosfoetanolamina não derivatizada é 0,22 minutos, enquanto que a da Fosfoetanolamina derivatizada é 0,75 minutos.

Nas Figuras 7 e 8 são apresentados os cromatogramas da Substância de Referência derivatizada na concentração de $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ em solvente e em plasma, respectivamente. A confirmação de que se trata do mesmo composto tanto em plasma quanto em solvente foi

realizada por adição de uma amostra padrão da SR derivatizada em solvente, em uma amostra de plasma que também havia sido enriquecida com a Substância de Referência e derivatizada. Pode ser observado que não houve variação no tempo de retenção do analito no solvente ou na matriz e também é possível notar que a reação de derivatização não foi total (88%) pela área da Fosfoetanolamina não derivatizada remanescente, monitorada pela transição de massa m/z 140 \rightarrow 79, enquanto que a transição determinada para a Fosfoetanolamina derivatizada foi a de m/z 275 \rightarrow 140. Também pode ser observado, na Figura 7, a presença de um pico cromatográfico em 3,45 minutos de um composto desconhecido, mas que aparece em todas as amostras de plasma, acredita-se que seja algum composto inerente à matriz que tenha a mesma massa da Fosfoetanolamina e que também foi derivatizada, mas como elui em tempo de retenção diferente da Fosfoetanolamina derivatizada, não compromete a seletividade do método.

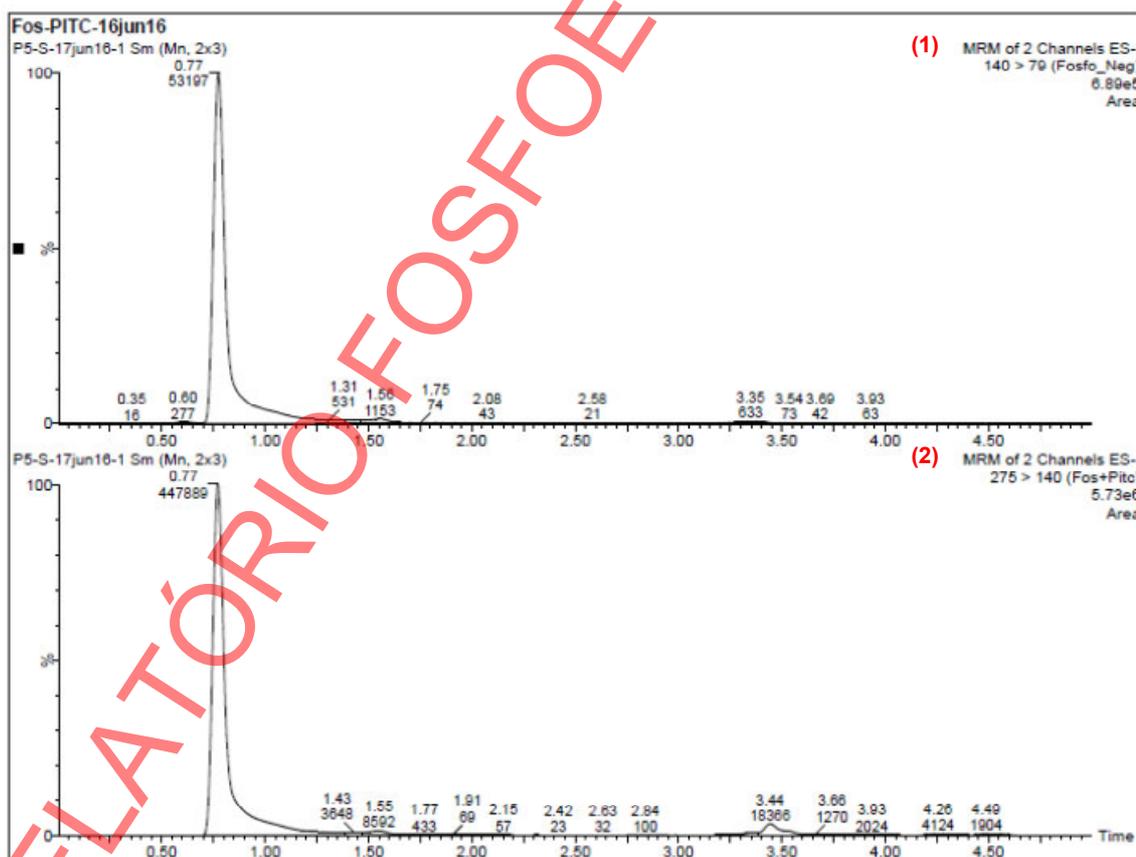


Figura 7. Cromatogramas no modo MRM da Fosfoetanolamina derivatizada $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ em solvente na transição de massa 140 \rightarrow 79 (1) e derivatizada 275 \rightarrow 140 (2), nas condições cromatográficas otimizadas.

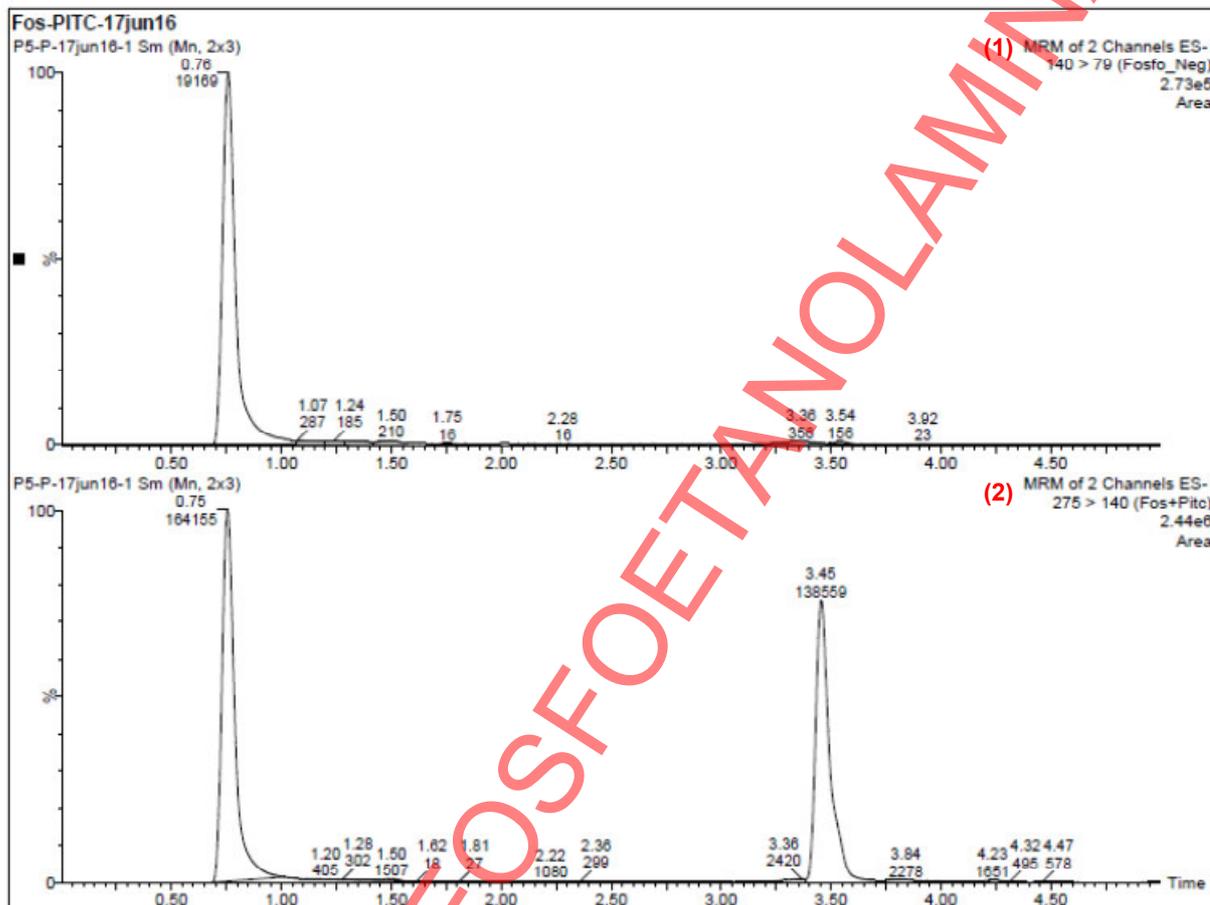


Figura 8. Cromatogramas no modo MRM da Fosfoetanolamina derivatizada $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ em plasma na transição de massa $140 \rightarrow 79$ (1) e derivatizada $275 \rightarrow 140$ (2), nas condições cromatográficas otimizadas.

7.2 Validação da metodologia

Como dito anteriormente, este método foi desenvolvido e validado com o padrão analítico de Fosfoetanolamina (SR-92) da marca Sigma Aldrich. Porém, antes de validar o método foi preciso garantir que a Substância Teste Fosfoetanolamina sintética fabricada pelo IQ-USP, poderia ser quantificada de maneira correta utilizando a Substância de Referência Fosfoetanolamina Sigma como referência.

A avaliação dos resultados foi baseada na quantificação das soluções da ST nas concentrações de $0,23$; $0,50$; $1,01$; $2,02$; $3,07$; $4,08 \mu\text{g mL}^{-1}$, preparadas a partir da solução ST-021.3-32%, em uma curva de calibração preparada com a SR (da Sigma).

A curva de calibração com a Substância de Referência Fosfoetanolamina Sigma foi construída em Metanol:água 50% (v/v) em seis níveis de concentração (Figura 9), seguindo os procedimentos descritos nas Seções 6.1.4 e 6.2.4 referentes ao preparo de amostra e a determinação da linearidade, respectivamente. As soluções da Substância Teste Fosfoetanolamina USP (ST-021.3-32%) foram preparadas em água desionizada e também seguiram o mesmo procedimento descrito na Seção 6.1.4.

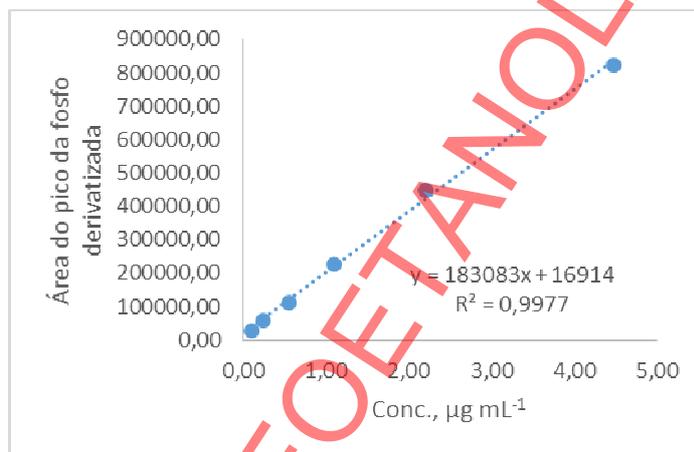


Figura 9. Curva de calibração da Substância de Referência Fosfoetanolamina Sigma utilizada na quantificação das concentrações preparadas com a ST-021.3-32%.

Para atestar a equivalência entre as concentrações preparadas com a Substância Teste, ditas nominais, com as concentrações calculadas pela equação da reta gerada pela curva de calibração com a fosfo Sigma foi utilizado o teste *t*-pareado com ambas as concentrações e os valores para o parâmetro *p* bi-caudal, $t_{\text{calculado}}$ e $t_{\text{crítico}}$ são apresentados na Tabela 6.

O teste resultou em valores de *p* bi-caudal maiores que 0,05 e o $t_{\text{calculado}}$ menor que o $t_{\text{crítico}}$ na comparação das concentrações. Sendo assim, pode-se dizer que não há diferença significativa entre as concentrações calculadas pela curva com Substância de Referência Fosfoetanolamina Sigma e as concentrações nominais da Substância Teste Fosfoetanolamina USP, com um intervalo de confiança de 95%.

Tabela 6. Dados da curva de calibração da Substância de Referência Fosfoetanolamina Sigma e o resultado do teste *t*-pareado utilizado na comparação das concentrações preparadas com a ST-021.3-32% quantificadas na curva de calibração com a fosfo Sigma.

<i>p</i> bi-caudal	<i>t</i>_{calculado}	<i>t</i>_{crítico}
0,178	1,57	2,57

7.2.1. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

A tabela 7 apresenta os valores do Limite de Detecção e do Limite de Quantificação do método analítico desenvolvido. O limite de detecção (LD) foi determinado pelo método baseado na relação sinal ruído, enquanto que o menor ponto da curva de calibração foi considerado como parâmetro validado para o limite de quantificação (LQ).

Tabela 7. Dados relativos aos limites de detecção e quantificação.

Parâmetro	Valor
Limite de detecção (ng mL ⁻¹)	2,74
Limite de quantificação (ng mL ⁻¹)	110,00

7.2.2. Seletividade

Na Figura 8 são apresentados, para efeito de comparação e avaliação da seletividade, os cromatogramas de uma amostra de plasma branco e uma amostra de plasma adicionado de fosfoetanolmina (Substância de Referência Fosfoetanolamina Sigma). Como pode ser observado no cromatograma da amostra de plasma branco sem adição da Substância de Referência, não existem interferentes próximo ao tempo de retenção (*t_R*) de 0,75 minutos, que corresponde ao *t_R* da Substância de Referência, a não ser o pico da própria Fosfoetanolamina endógena, cuja área corresponde a aproximadamente 50% da área da Substância de Referência adicionada, mas como se trata do mesmo composto é possível dizer que o método é seletivo e que a presença da Fosfoetanolamina endógena não compromete a quantificação, uma vez que, ela aparece em qualquer amostra ou controle de qualidade feito em plasma analisado.

Também pode ser observado, na Figura 10, a presença de um pico cromatográfico em 3,45 minutos de um composto desconhecido, mas que aparece em todas as amostras de plasma, acredita-se que seja algum composto inerente à matriz que tenha a mesma

massa da Fosfoetanolamina e que também foi derivatizada, mas como elui em tempo de retenção diferente da Fosfoetanolamina (SR e ST) derivatizada, não há comprometimento da seletividade do método. Cabe ressaltar que estas amostras foram preparadas seguindo os procedimentos descritos na Seção 6.1.4 referente ao preparo de amostra.

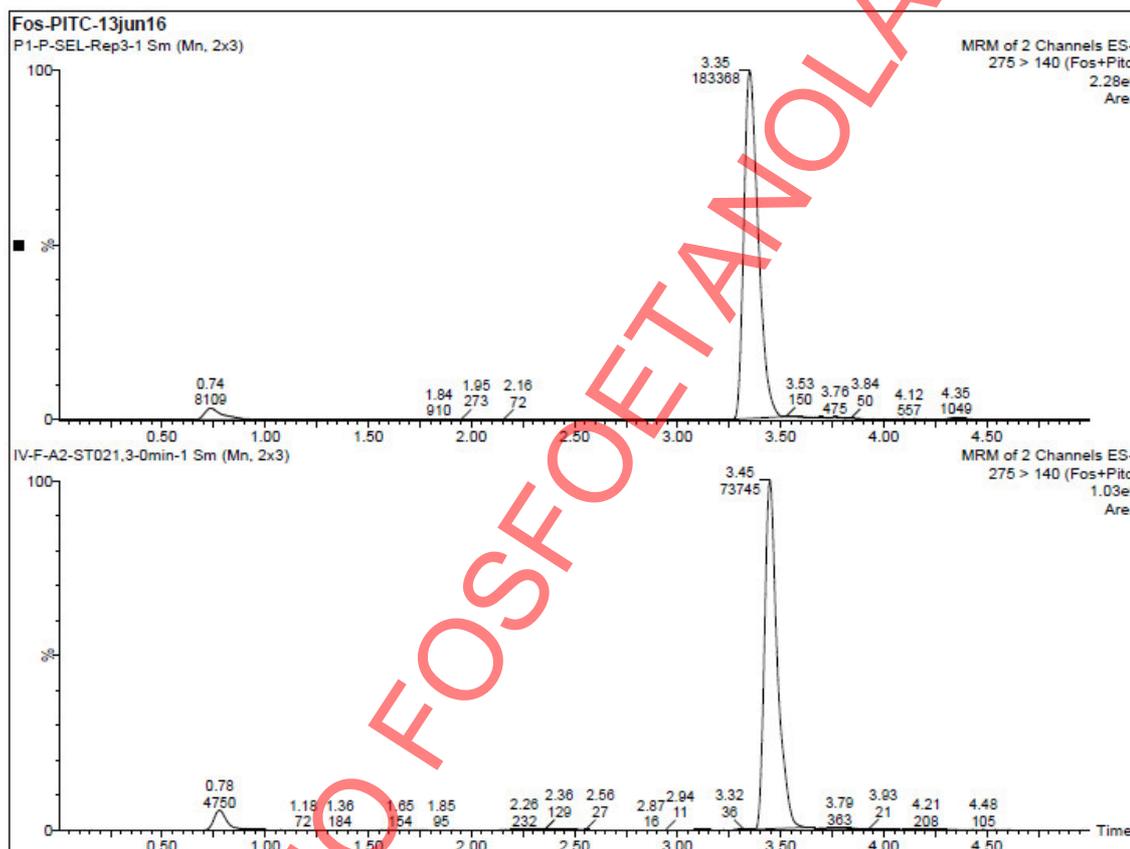


Figura 10. Cromatogramas de uma amostra de plasma branco (inferior) e de uma amostra de plasma branco adicionada da Substância de Referência Fosfoetanolamina Sigma na concentração de $100,00 \text{ ng mL}^{-1}$ (superior), para avaliação da seletividade. Cromatogramas no modo MRM da Fosfoetanolamina derivatizada na transição de massa $275 \rightarrow 140$, nas condições cromatográficas otimizadas.

7.2.3. Efeito de Matriz

No presente estudo, o efeito de matriz foi avaliado pela comparação entre a resposta de amostras de plasma branco (6 replicatas), processadas conforme descrito nas Seções 6.1.4 e 6.2.3, adicionadas da Substância de Referência Fosfoetanolamina Sigma na

concentração de 0,10 µg mL⁻¹, com a resposta fornecida por outras 6 réplicas na mesma concentração preparadas em solvente (Tabela 8).

A razão da resposta instrumental, neste estudo a área do pico cromatográfico, entre as amostras de plasma processadas e as amostras preparadas em solvente, determinou o grau do efeito de matriz (FM). Todas as amostras foram analisadas de acordo com as condições cromatográficas propostas e injetadas uma única vez.

O efeito de matriz foi expresso por um fator denominado fator matriz (FM) calculado a partir da equação abaixo:

$$FM = \frac{\text{resposta do analito na presença da matriz}}{\text{resposta do analito na ausência da matriz}}$$

Para FM igual a 1, nenhum efeito de matriz é observado.

Como pode ser observado nos dados apresentados na Tabela 8, existe um efeito de supressão de sinal provocado pela matriz, representado pelo FM igual a 0,57 ± 0,03. Entretanto, o que influencia na precisão e exatidão do método é a variabilidade do FM e este se encontra em um valor abaixo (5,43%) do que é sugerido pela ANVISA (15%).

Tabela 8. Resultados do efeito de matriz no método analítico desenvolvido para a determinação da Substância Teste Fosfoetanolamina USP e Substância de Referência Fosfoetanolamina Sigma no plasma.

CQs em solvente	Área	Plasma Branco	Área	FM
Solvente 1	20089	Branco 1-AddPD-Pós-ext.	10827	0,53
Solvente 2	19923	Branco 2-AddPD-Pós-ext.	11348	0,56
Solvente 3	21473	Branco 3-AddPD-Pós-ext.	12558	0,62
Solvente 4	18921	Branco 4-AddPD-Pós-ext.	11554	0,57
Solvente 5	21170	Branco 5-AddPD-Pós-ext.	11631	0,57
MÉDIA	20315,20	MÉDIA	11583,60	0,57
DP	1027,13	DP	628,60	0,03
CV%	5,06	CV%	5,43	5,43

CQs: Controles de Qualidade; DP: Desvio Padrão; CV%: Coeficiente de Variação;

AddPD-Pós-ext.: Adição de padrão pós-extração; FM: Fator Matriz.

7.2.4. Recuperação

A recuperação se destina a avaliar a eficiência do método de tratamento das amostras. Este parâmetro é calculado comparando-se a resposta obtida para o analito adicionado na matriz biológica antes da extração com a resposta obtida para o analito em amostras preparadas em solvente e, conseqüentemente, não extraídas, as quais representam 100%.

Na avaliação deste parâmetro foram utilizadas concentrações em três níveis: baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA), de acordo com a curva de calibração. As Tabelas 9 e 10 apresentam os dados experimentais das corridas analíticas dos controles de qualidade em solvente e em plasma, respectivamente, para a avaliação da recuperação. Observando-se os baixos valores do CV% entre as replicatas, tanto em plasma quanto em solvente, é possível verificar que todos apresentaram valores concordantes entre si e isto demonstra a robustez do procedimento de preparo de amostra aplicado, à exceção do CQB em solvente cujo CV foi maior que 20%. Este alto valor pode ser atribuído a algum erro na manipulação deste controle.

Apesar da boa repetibilidade, a metodologia resultou em baixos valores de recuperação, com uma recuperação média para os três CQs de 45,44% e uma das hipóteses para explicar este resultado é que a Fosfoetanolamina é constituinte da membrana plasmática e pode ter muita afinidade por substâncias presentes no plasma ou no sangue, tornando difícil a sua extração da matriz biológica; outra hipótese é que substâncias inerentes à matriz competiram com a fosfo pelo derivatizante e, uma prova disso, é o pico presente em 3,45 minutos existente em todas as amostras de plasma analisadas (Figuras 7 e 8). Além da extração, foi preciso adicionar uma etapa a mais no processo de preparo das amostras que foi a reação de derivatização e, por mais que ela tenha tido um bom rendimento (88%), é necessário que a Fosfoetanolamina esteja no livre no meio para poder reagir.

No entanto, embora altos valores de recuperação sejam desejáveis para maximizar a sensibilidade do método, não é necessário que este valor seja de 100% e, sim, que a recuperação seja consistente, precisa e reprodutiva. Sendo assim, o procedimento de preparo de amostra utilizado na extração da substância teste do plasma, descrito na Seção 6.1.4, demonstrou uma boa eficiência, como pode ser observado pelos percentuais de recuperação obtidos para os três controles de qualidade: CQB = 49,23%, CQM = 42,50% E CQA = 44,60%.

Tabela 9. Dados experimentais das corridas analíticas dos controles de qualidade em solvente para a avaliação da recuperação.

CQ, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Média	DP	CV%
CQB - 0,30	38136,00	71123,00	58406,00	55888,33	16636,99	29,77
CQM - 2,86	534143,00	525384,00	560887,00	540138,00	18495,16	3,42
CQA - 4,47	915905,00	812154,00	846154,00	858071,00	52892,14	6,16

CQ: Controle de Qualidade; CQB: Controle de Qualidade Baixo; CQM: Controle de Qualidade Médio; CQA: Controle de Qualidade Alto; DP: Desvio Padrão; CV%: Coeficiente de Variação %.

Tabela 10. Dados experimentais das corridas analíticas dos controles de qualidade em plasma para a avaliação da recuperação.

CQ, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Replicata 4	Replicata 5
CQB - 0,30	27287,00	26424,00	27689,00	28458,00	27718,00
CQM - 2,86	212206,00	232626,00	247341,00	243587,00	211945,00
CQA - 4,47	377750,00	401754,00	363341,00	395052,00	375594,00
CQ, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Média	DP	CV%		
CQB - 0,30	27515,20	742,13	2,70		
CQM - 2,86	229541,00	16835,74	7,33		
CQA - 4,47	382698,20	15535,41	4,06		

CQ: Controle de Qualidade; CQB: Controle de Qualidade Baixo; CQM: Controle de Qualidade Médio; CQA: Controle de Qualidade Alto; DP: Desvio Padrão; CV%: Coeficiente de Variação %.

7.2.5. Linearidade

Em relação à construção das curvas de calibração para avaliar a linearidade do método, pode-se verificar pelos dados da Tabela 11 que, com exceção do menor ponto da curva, todos os demais níveis ficaram com CV% aceitável entre 7,76 e 16,53%, considerando-se que as curvas foram obtidas em matriz biológica complexa, construídas em momentos distintos e com um processo de preparo elaborado. A partir do gráfico do sinal (neste caso, a área do pico) em função da concentração (Figura 11), foi possível estimar os coeficientes das curvas de calibração pelo método matemático conhecido como regressão linear. A partir dos dados experimentais, o coeficiente de correlação r foi calculado, sendo que quanto mais próximo de 1,0 for este valor, considera-se evidência de que existe um ajuste ideal dos dados usados na construção da curva de regressão linear, obtida por meio do método dos mínimos quadrados. Neste trabalho, o coeficiente de correlação r médio para

as três curvas foi de 0,9972, valor que se aproxima do ideal, o CV% tanto para r quanto para a inclinação se mostraram satisfatórios (Tabela 12).

Tabela 11. Dados relativos às curvas de calibração utilizadas na avaliação da linearidade do método.

Ponto	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	17jun16 –	17jun16 –	06/jul/16	Média	DP	CV%
		curva 1	curva 2				
*P1	0,11	9965,00	6032,00	8266,00	8087,67	1972,56	24,39
P2	0,55	33538,00	43832,00	44957,00	40775,67	6293,19	15,43
P3	1,11	82401,00	77126,00	94520,00	84682,33	8918,59	10,53
P4	2,21	164155,00	187171,00	190396,00	180574,00	14310,41	7,92
P5	3,37	272485,00	242791,00	334557,00	283277,67	46825,32	16,53
P6	4,47	380113,00	389774,00	438406,00	402764,33	31242,28	7,76
P7	5,53	464315,00	459343,00	585262,00	502973,33	71307,42	14,18

*P – Ponto da Curva; DP – Desvio Padrão; CV% – Coeficiente de Variação Percentual.

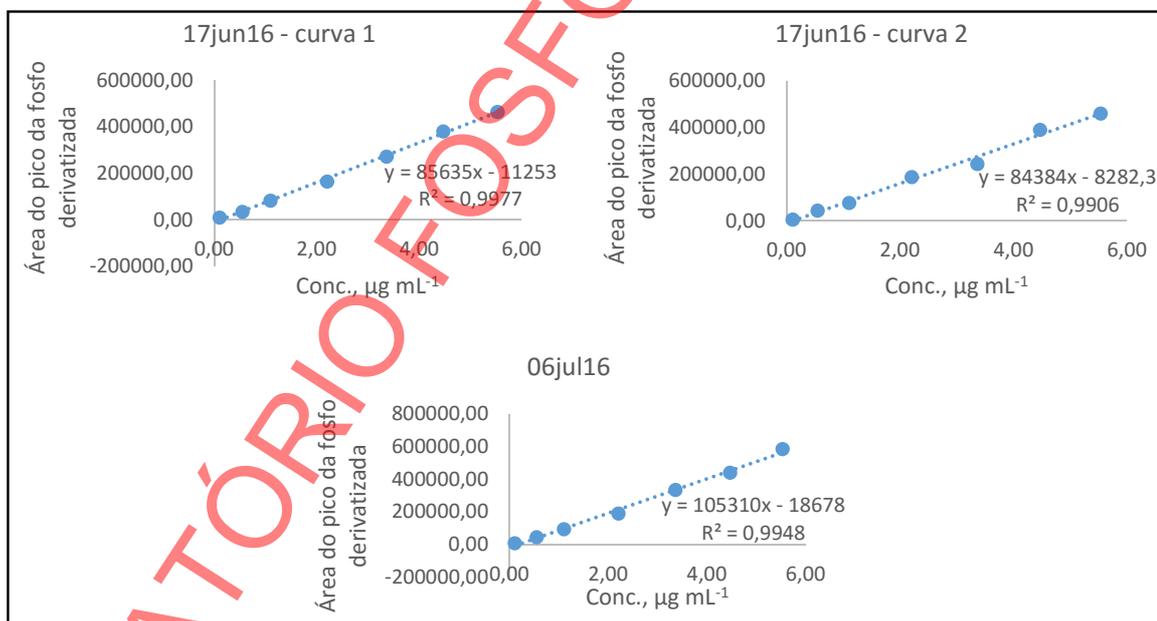


Figura 11. Curvas de calibração da Substância de Referência Fosfoetanolamina Sigma utilizadas na avaliação da linearidade do método analítico proposto.

Neste trabalho, além do coeficiente de correlação r , a linearidade também foi avaliada pela aplicação do teste de hipótese de linearidade *a priori* na avaliação das áreas provenientes das três curvas de calibração utilizadas no estudo. O teste foi realizado por meio da comparação entre o $F_{\text{calculado}}$ e o $F_{\text{crítico}}$ e, neste caso, o $F_{\text{calculado}}$ foi maior do que o $F_{\text{crítico}}$ indicando que a regressão é significativa para o modelo linear aplicado. Outro teste F foi realizado para verificar a falta de ajuste e os resultados não mostraram falta de ajuste no modelo, uma vez que $F_{\text{calculado}}$ foi inferior ao $F_{\text{crítico}}$, com intervalo de confiança de 95%. A Tabela 12 apresenta os valores dos coeficientes da regressão linear, os coeficientes de correlação e os testes estatísticos utilizados para validar a linearidade do método.

Tabela 12. Avaliação da linearidade do método analítico desenvolvido para a Substância Teste Fosfoetanolamina USP e Substância de Referência Fosfoetanolamina Sigma.

Parâmetro	17jun16 curva 1	17jun16 curva 2	06jul16	Média	DP	CV%
Linearidade – Inclinação (L μg^{-1}) ^a	85635	84384	105310	91776	11737	12,79
Linearidade – Intercepto ^a	11253	8283	18678	12738	5354	42,03
Linearidade – Coeficiente de determinação (R ²) ^a	0,9977	0,9906	0,9948	0,9944	0,0036	0,36
Linearidade – Coeficiente de correlação (r) ^a	0,9988	0,9953	0,9974	0,9972	0,0018	0,18
*F para a regressão ^b				2233,91		
*F para a falta de ajuste ^c				0,01035		

DP – Desvio Padrão; CV% – Coeficiente de Variação Percentual.

^aPara os testes estatísticos foram consideradas as áreas das três curvas.

^b $F_{\text{crítico}} = 4,38$; ^c $F_{\text{crítico}} = 2,96$.

7.2.6. Precisão

Os resultados referentes à precisão instrumental da metodologia analítica desenvolvida são apresentados na Tabela 13 e demonstram que o erro instrumental é mínimo na determinação da Substância Teste e para a Substância de Referência tanto no controle de qualidade em solvente quanto em plasma. Como pode ser observado, o valor de CV% para o tempo de retenção da Fosfoetanolamina foi 0,92% e 1,76% em solvente e em plasma, respectivamente. Em relação à área do pico da substância teste, o valor de CV foi igual a 2,96% e 4,10% em solvente e em plasma, respectivamente, após dez injeções consecutivas dos mesmos vials.

Apesar da substância teste possuir características físico-químicas que comprometeram diversas condições de análise, seja do ponto de vista cromatográfico ou da própria extração da matriz; o método demonstrou coeficientes de variação percentual bastante satisfatórios em relação à precisão instrumental; então, foi decidido validar a metodologia sem o uso de um padrão interno porque seria mais um possível interferente ou variável a ser ajustada em um procedimento já bastante complexo, pois teria que ser um composto que também tivesse um grupo amino terminal e que reagisse com o Pitc nas condições estabelecidas e a inclusão de um composto que competisse com a Fosfoetanolamina pelo derivatizante poderia diminuir ainda mais a porcentagem de recuperação.

Tabela 13. Dados relativos à precisão instrumental do método proposto.

Injeção	Área em solvente	Área no plasma	t _R (min)	t _R (min)
1	21973,00	8041,00	0,77	0,76
2	22128,00	7606,00	0,76	0,74
3	22807,00	7519,00	0,76	0,73
4	22632,00	7982,00	0,76	0,72
5	23504,00	8054,00	0,77	0,72
6	22181,00	8279,00	0,76	0,72
7	23881,00	8438,00	0,78	0,73
8	22675,00	8252,00	0,76	0,72
9	21808,00	8455,00	0,76	0,72
10	23144,00	8415,00	0,76	0,73
Média	22751,11	8104,10	0,76	0,73
DP	673,03	332,60	0,01	0,01
CV%	2,96	4,10	0,92	1,76

*t_R – Tempo de Retenção; DP – Desvio Padrão; CV% – Coeficiente de Variação Percentual.

As Tabelas 14 e 15 apresentam os dados referentes à repetibilidade ou precisão intraensaio, sendo que esta foi avaliada pela variação da área do pico cromatográfico gerado pela Fosfoetanolamina e do tempo de retenção para os mesmos três CQs utilizados no ensaio de determinação da recuperação. Como pode ser observado o CV% da área variou de 2,70% para o CQB a 7,33% para o CQM e para o tempo de retenção o CV% flutuou entre 0,72% para o CQA a 0,93% para o CQM. Estes valores estão abaixo do que é preconizado pela ANVISA (15 %) e, sendo assim, é possível dizer que o método é repetitivo.

Tabela 14. Dados relativos à determinação da precisão intra-ensaio do método analítico em relação à área do pico cromatográfico da Fosfoetanolamina.

CQ, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Replicata 4	Replicata 5
CQB - 0,30	27287,00	26424,00	27689,00	28458,00	27718,00
CQM - 2,86	212206,00	232626,00	247341,00	243587,00	211945,00
CQA - 4,47	377750,00	401754,00	363341,00	395052,00	375594,00
CQ, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Média	DP	CV%		
CQB - 0,30	27515,20	742,13	2,70		
CQM - 2,86	229541,00	16835,74	7,33		
CQA - 4,47	382698,20	15535,41	4,06		

CQ: Controle de Qualidade; CQB: Controle de Qualidade Baixo; CQM: Controle de Qualidade Médio; CQA: Controle de Qualidade Alto; DP: Desvio Padrão; CV%: Coeficiente de Variação %.

Tabela 15. Dados relativos à determinação da precisão intra-ensaio do método analítico em relação ao tempo de retenção do pico cromatográfico da Fosfoetanolamina.

CQ, $\mu\text{g mL}^{-1}$	t1	t2	t3	t4	t5	Média	DP	CV%
CQB - 0,30	0,75	0,75	0,76	0,76	0,75	0,754	0,005	0,73
CQM - 2,86	0,75	0,76	0,76	0,76	0,77	0,760	0,007	0,93
CQA - 4,47	0,75	0,76	0,76	0,76	0,75	0,756	0,005	0,72

CQ: Controle de Qualidade; CQB: Controle de Qualidade Baixo; CQM: Controle de Qualidade Médio; CQA: Controle de Qualidade Alto; t: tempo de retenção; DP: Desvio Padrão; CV%: Coeficiente de Variação %.

Os dados relativos à precisão intermediária ou interensaio são apresentados na Tabela 16 onde constam as informações das corridas analíticas. Os resultados deste ensaio são apresentados na Tabela 17 e analisando os valores de CV% para todos os CQs podemos dizer que o método analítico desenvolvido possui precisão, pois o CV% variou de 3,96 a 10,20% para a área e de 0,66 a 0,83% para o tempo de retenção.

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA PRODUZIDA PELA USP-SÃO CARLOS E A FOSFOETANOLAMINA PADRÃO SIGMA EM PLASMA DE RATO

Tabela 16. Dados relativos à determinação da precisão intermediária do método analítico em relação à área e ao tempo de retenção do pico cromatográfico da Fosfoetanolamina.

ÁREA - DIA 1								
CQ, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Replicata 4	Replicata 5	Média	DP	CV%
CQB - 0,30	27287,00	26424,00	27689,00	28458,00	27718,00	27515,20	742,13	2,70
CQM - 2,86	212206,00	232626,00	247341,00	243587,00	211945,00	229541,00	16835,74	7,33
CQA - 4,47	377750,00	401754,00	363341,00	395052,00	375594,00	382698,20	15535,41	4,06
ÁREA - DIA 2								
CQ, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Replicata 4	Replicata 5	Média	DP	CV%
CQB - 0,30	25907,00	23824,00	ND	19961,00	25074,00	23691,50	2630,20	11,10
CQM - 2,86	219299,00	241022,00	219415,00	246202,00	234147,00	232017,00	12322,73	5,31
CQA - 4,47	352977,00	392485,00	372656,00	381030,00	390180,00	377865,60	15984,11	4,23
TEMPO DE RETENÇÃO – DIA 1								
CQ, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Replicata 4	Replicata 5	Média	DP	CV%
CQB - 0,30	0,750	0,75	0,76	0,76	0,75	0,754	0,005	0,73
CQM - 2,86	0,75	0,76	0,76	0,76	0,77	0,760	0,007	0,93
CQA - 4,47	0,75	0,76	0,76	0,76	0,75	0,756	0,005	0,72
TEMPO DE RETENÇÃO – DIA 2								
CQ, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Replicata 4	Replicata 5	Média	DP	CV%
CQB - 0,30	0,76	0,76	ND	0,76	0,76	0,760	0,0000	0,0000
CQM - 2,86	0,77	0,76	0,76	0,76	0,77	0,764	0,0055	0,7169
CQA - 4,47	0,76	0,76	0,76	0,77	0,76	0,762	0,0045	0,5869

CQ: Controle de Qualidade; CQB: Controle de Qualidade Baixo;
CQM: Controle de Qualidade Médio; CQA: Controle de Qualidade Alto;
ND: Não Detectado; DP: Desvio Padrão; CV%: Coeficiente de Variação %.

Tabela 17. Determinação da precisão intermediária do método analítico.

REPETIBILIDADE - ÁREA			
CQ, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Média	DP	CV
CQB - 0,30	25815,78	2632,66	10,20
CQM - 2,86	230779,00	13970,18	6,05
CQA - 4,47	380281,90	15076,65	3,96
REPETIBILIDADE - TEMPO DE RETENÇÃO			
CQ, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Média	DP	CV
CQB - 0,30	0,76	0,01	0,66
CQM - 2,86	0,76	0,01	0,83
CQA - 4,47	0,76	0,01	0,75

CQ: Controle de Qualidade; CQB: Controle de Qualidade Baixo; CQM: Controle de Qualidade Médio; CQA: Controle de Qualidade Alto; DP: Desvio Padrão; CV%: Coeficiente de Variação%.

7.2.7. Exatidão

Assim como a precisão, a exatidão também é um parâmetro que permite julgar a confiabilidade do método bioanalítico. Neste trabalho, a exatidão foi verificada através da quantificação das médias das áreas dos controles de qualidade empregados no procedimento experimental adotado na determinação da precisão interensaio. Portanto, os dados das corridas analíticas são os mesmos apresentados na Tabela 16; enquanto que os dados das curvas de calibração são apresentados nas Tabelas 11 e 12. A Tabela 18 apresenta os resultados referentes à exatidão dos controles de qualidade e, com exceção do CQB, que apresentou um CV% alto (137%), os outros dois controles avaliados obtiveram CV% bastante satisfatórios, entre 98 e 103%, aproximadamente. Sendo assim pode-se dizer que o método é exato.

Tabela 18. Resultados relativos à exatidão do método proposto em relação aos controles de qualidade.

CQ	DETERMINAÇÃO NO DIA 1			DETERMINAÇÃO NO DIA 2		
	Conc. Nominal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Conc. Experimental ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% BIAS	Conc. Experimental ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% BIAS	% BIAS MÉDIA
CQB	0,30	0,45	150,21	0,38	125,72	137,96
CQM	2,86	2,81	98,21	2,85	99,46	98,83
CQA	4,47	4,60	102,90	4,58	102,36	102,63

CQ: Controle de Qualidade; CQB: Controle de Qualidade Baixo; CQM: Controle de Qualidade Médio; CQA: Controle de Qualidade Alto; DP: Desvio Padrão; CV%: Coeficiente de Variação %; Conc.: Concentração.

7.2.8. Robustez

A Tabela 19 apresenta os dados experimentais obtidos no ensaio para a determinação da robustez.

Tabela 19. Áreas da curva de calibração nas duas colunas utilizadas na avaliação da robustez do método.

Coluna 1		Coluna 2	
Conc. Nominal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área	Conc. Nominal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área
0,12	23437,50	0,10	22751,00
0,24	51756,00	0,25	50846,00
0,48	98541,33	0,55	110267,00
0,95	195094,67	1,11	233169,00
1,45	305341,33	2,21	458338,00
1,92	396571,67	3,37	685180,00
2,40	520791,33	4,47	922009,00
2,87	595378,00	5,58	1129791,00

Conc.: Concentração.

Uma vez que as curvas independentes não apresentaram discrepâncias em relação à sua própria linearidade, como pode ser observado nos dados da Tabela 20, em que são apresentados o coeficiente de determinação (R^2) e o coeficiente de correlação (r) de cada curva, fez-se a quantificação das áreas obtidas pela curva analisada na coluna 1 na equação de reta gerada pela curva analisada na coluna 2 e vice-versa (Tabela 21).

Tabela 20. Avaliação da linearidade das curvas utilizadas na determinação da robustez.

Curvas	Inclinação ($\text{mL}/\mu\text{g}$)	R^2	r
Curva na coluna 1	210751	0,9987	0,9993
Curva na coluna 2	203559	0,9906	0,9953
Média	207155	0,9947	0,9973
DP	5085	0,0057	0,0029
CV%	2,45	0,58	0,29

DP: Desvio Padrão; CV%: Coeficiente de Variação %;

R^2 : coeficiente de determinação; r : coeficiente de correlação.

Tabela 21. Quantificação das curvas de calibração substituindo a coluna 1 pela coluna 2.

Conc. Experimental ($\mu\text{g mL}^{-1}$) da curva da coluna 1 quantificada na coluna 2	Conc. Experimental ($\mu\text{g mL}^{-1}$) da curva da coluna 2 quantificada na coluna 1
0,10	0,11
0,24	0,25
0,47	0,53
0,94	1,11
1,49	2,18
1,93	3,26
2,54	4,38
2,91	5,37

Conc.: Concentração.

Para atestar a equivalência entre as concentrações ditas nominais da curva analisada na coluna 1 com as concentrações calculadas pela equação da reta gerada pela curva de calibração analisada na coluna 2, foi realizado um teste t -pareado com ambas as concentrações. O mesmo raciocínio foi empregado para a curva analisada na coluna 2 em relação à coluna 1. Os valores para o parâmetro p bi-caudal, $t_{\text{calculado}}$ e $t_{\text{crítico}}$ são apresentados na Tabela 22.

O teste resultou em valores de p bi-caudal maiores que 0,05 e o $t_{\text{calculado}}$ menor que o $t_{\text{crítico}}$ na comparação das concentrações. Sendo assim, pode-se dizer que não há diferença significativa entre as concentrações calculadas tanto pela curva analisada na coluna 1 quanto na coluna 2, com um intervalo de confiança de 95%.

Tabela 22. Resultado do teste t -pareado utilizado na comparação das concentrações nominais e experimentais quantificadas em colunas diferentes para avaliação da robustez.

Curvas	p bi-caudal	$t_{\text{calculado}}$	$t_{\text{crítico}}$
Curva 1 na coluna 2	0,22	1,35	2,36
Curva 2 na coluna 1	0,079	2,05	2,36

A avaliação da robustez por meio da sensibilidade, realizada através da comparação dos coeficientes angulares das equações de reta obtidos com as duas colunas, mostrou a robustez do método, pois o coeficiente de variação percentual foi de 2,45%. Em relação à comparação da linearidade, o método também se mostrou robusto, pois o CV% para os coeficientes R^2 e r foram de 0,58 e 0,29%, respectivamente, para as duas colunas.

7.2.9. Estabilidade

7.2.9.1. Estabilidade em solução

O teste de estabilidade da Fosfoetanolamina (Substância de Referência Fosfoetanolamina Sigma) em solução foi avaliado pelo coeficiente de variação percentual (%) entre a média das áreas dos picos cromatográficos das triplicatas dos CQs preparadas antes e depois das 12 horas como descrito na Seção 6.2.9.1, sendo que os controles foram preparados conforme o procedimento descrito na Seção 6.1.4.

Na Tabela 23 são apresentados os dados das áreas obtidas para os CQs neste ensaio e pode ser observado pelo CV%, que com exceção do CQB preparado antes das 12 horas do ensaio, todos os outros foram reproduzíveis entre si.

Tabela 23. Dados dos controles de qualidade utilizados na avaliação da estabilidade da Fosfoetanolamina em solução.

	Replicata1	Replicata2	Replicata3	Média	DP	CV%
CQB-F	117732,00	121879,00	112677,00	117429,33	4608,46	3,92
CQB-E	102939,00	142117,00	132499,00	125851,67	20417,37	16,22
CQA-F	560841,00	558955,00	546536,00	555444,00	7771,98	1,40
CQA-E	611230,00	573493,00	529633,00	571452,00	40836,77	7,15

CQB-F: Controle de Qualidade Baixo preparado após 12 horas;
CQB-E: Controle de Qualidade Baixo preparado antes das 12 horas;
CQA-F: Controle de Qualidade Alto preparado após 12 horas;
CQA-E: Controle de Qualidade Alto preparado antes das 12 horas;
DP: Desvio Padrão; CV%: Coeficiente de Variação.

Na Tabela 24 são apresentados os dados estatísticos que comprovam que a Fosfoetanolamina se manteve estável em solução durante o período do estudo, pois os valores do CV% obtidos foram menores do que 15%, valor limite preconizado pela ANVISA.

Tabela 24. Dados analíticos que comprovam a estabilidade da Fosfoetanolamina em solução.

	Média	DP	CV%
CQB-S	121640,50	5955,49	4,90
CQA-S	563448,00	11319,37	2,01

CQB-S: Controle de Qualidade Baixo em Solução; CQA-S: Controle de Qualidade Alto em Solução; DP: Desvio Padrão; CV%: Coeficiente de Variação.

7.2.9.2. Estabilidade na matriz biológica

7.2.9.2.1. Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

Neste teste, os controles passaram por três ciclos de congelamento e descongelamento como descrito na Seção 6.2.9.2.1, sendo que os controles foram preparados conforme o procedimento descrito na Seção 6.1.4. O resultado foi observado pelo coeficiente de variação percentual (CV%) entre a concentração média determinada para as triplicatas dos CQs preparadas antes dos ciclos de congelamento/descongelamento e a concentração nominal de cada CQ, sendo que a concentração de cada replicata foi determinada em uma curva de calibração previamente preparada e analisada. Esta curva de calibração teve a faixa de aplicação de 0,30 a 5,58 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e originou a equação $y = 80605x - 6957,4$ e um valor de $R^2 = 0,9950$.

As áreas dos picos cromatográficos das amostras controle são apresentadas na Tabela 25. Em relação à comparação entre a concentração média experimental e a concentração nominal de cada CQ, a concentração experimental dos CQs deveria ser o mais próximo possível da concentração nominal. Para o CQB a concentração experimental foi 0,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e para o CQA 1,38 $\mu\text{g mL}^{-1}$, estes valores discrepantes da concentração nominal levaram a CVs de 106,90% e 74,50% para o CQB e para o CQA, respectivamente, o que sugere que a Fosfoetanolamina não se mantém estável no plasma após três ciclos de congelamento e descongelamento, pois a ANVISA orienta que o CV% não ultrapasse 15%.

Tabela 25. Dados relativos aos controles utilizados na determinação da estabilidade da Fosfoetanolamina em plasma após três ciclos de congelamento e descongelamento.

CQ, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Replicata1	Replicata2	Replicata3	Média	DP	CV%
CQB - 0,90	2972,00	3134,00	3274,00	3126,67	151,13	4,83
CQM – 4,47	105025,00	98495,00	110686,00	104735,33	6100,66	5,82

CQ: Controle de Qualidade; CQB: Controle de Qualidade Baixo;
CQM: Controle de Qualidade Médio; CQA: Controle de Qualidade Alto;
DP: Desvio Padrão; CV%: Coeficiente de Variação %;

7.2.9.2.2. Estabilidade de curta duração

Nesta etapa, as triplicatas dos CQs foram preparadas e mantidas à temperatura ambiente por um intervalo de 24 horas, como descrito na Seção 6.2.9.2.2. Os controles foram preparados conforme o procedimento descrito na Seção 6.1.4 após este período. O resultado foi determinado pelo coeficiente de variação percentual (CV%) entre a concentração média determinada para as triplicatas dos CQs preparadas antes das 24

horas e a concentração nominal de cada CQ, considerando que a concentração de cada replicata foi determinada pela mesma curva de calibração empregada na determinação da estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento.

As áreas dos picos cromatográficos dos controles de qualidade são apresentadas na Tabela 26 e pelo baixo CV% das replicatas pode-se notar que não houve diferença significativa entre eles. Em relação à comparação entre a concentração média experimental e a concentração nominal de cada CQ, a concentração experimental dos CQs deveria, novamente, ser o mais próximo possível da concentração nominal. Para o CQB a concentração experimental foi 0,098 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e para o CQA 0,43 $\mu\text{g mL}^{-1}$, estes valores, muito inferiores à concentração nominal dos CQs, geraram CVs de 113,67% e 116,60% para o CQB e para o CQA, respectivamente, o que sugere que a Fosfoetanolamina não se mantém estável no plasma à temperatura ambiente por 24 horas.

Tabela 26. Dados relativos aos controles utilizados na determinação da estabilidade de curta duração da Fosfoetanolamina em plasma.

CQ, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Replicata1	Replicata2	Replicata3	Média	DP	CV%
CQB - 0,90	959,00	838,00	1005,00	934,00	86,26	9,24
CQA - 4,47	31074,00	23572,00	28460,00	27702,00	3808,01	13,75

CQ: Controle de Qualidade; CQB: Controle de Qualidade Baixo;
CQA: Controle de Qualidade Alto; DP: Desvio Padrão; CV%: Coeficiente de Variação %;

7.2.9.2.3. Estabilidade de longa duração

Conforme descrito na Seção 6.2.9.2.3, neste ensaio, as amostras devem ser processadas e analisadas após serem armazenadas por um período que exceda o intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra em estudo e a análise da última. Portanto, foram escolhidas amostras coletadas após a administração por via oral da Substância Teste Fosfoetanolamina USP na dose de 1000 mg/kg a dois animais no dia 07/06/16.

As amostras de sangue foram coletadas no mesmo dia do tratamento nos seguintes intervalos de tempo: 0, 15, 30, 60, 120, 240, 360, 480 e 600 minutos, sendo que o plasma foi separado como descrito na Seção 6.1.3. Estas amostras de plasma foram congeladas em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e processadas e analisadas no dia 24/06/16, conforme descrito na seção 6.1.4, ficando um período de dezessete dias entre a coleta e a análise (Tabela 27).

Como não foi detectada Fosfoetanolamina em nenhuma das amostras analisadas pode-se inferir que ela não é estável por um período longo como dezessete dias, o que vai de encontro aos resultados demonstrados nas Seções 7.2.9.2.1 e 7.2.9.2.2.

Tabela 27. Dados das amostras utilizadas na determinação da estabilidade de longa duração da Fosfoetanolamina em plasma.

SUBSTÂNCIA TESTE:	FOSFO SIGMA	
DOSE:	1.000 mg/kg	
VIA:	ORAL	
DATA DA COLETA DO PLASMA:	07/06/2016	
DATA DA ANÁLISE DO PLASMA:	24/06/2016	
TEMPO DE COLETA	ANIMAL 1	ANIMAL 2
0min	NÃO DETECTADO	NÃO DETECTADO
15min	NÃO DETECTADO	NÃO DETECTADO
30min	NÃO DETECTADO	NÃO DETECTADO
60min	NÃO DETECTADO	NÃO DETECTADO
120min	NÃO DETECTADO	NÃO DETECTADO
240min	NÃO DETECTADO	NÃO DETECTADO
360min	NÃO DETECTADO	NÃO DETECTADO
480min	NÃO DETECTADO	NÃO DETECTADO
600min	NÃO DETECTADO	NÃO DETECTADO

7.2.9.2.4. Estabilidade pós-processamento

Nesta etapa, as triplicatas dos CQs foram preparadas conforme descrito na seção 6.1.4 e mantidas dentro do amostrador do equipamento de UPLC, à temperatura de 10 °C por um intervalo de aproximadamente 20 horas. Após este período, as amostras foram analisadas e a sua concentração foi determinada em uma curva de calibração previamente preparada e analisada. O resultado foi determinado pelo coeficiente de variação percentual (CV%) entre a concentração média determinada para as triplicatas dos CQs e a concentração nominal de cada CQ.

As áreas dos picos cromatográficos dos controles de qualidade são apresentadas na Tabela 28 e pelo baixo CV% das replicatas pode-se notar que não houve variação significativa entre eles. Em relação à comparação entre a concentração média experimental e a concentração nominal de cada CQ, a concentração experimental dos CQs deveria, novamente, ser o mais próximo possível da concentração nominal. Para o CQB a concentração experimental foi 0,98 µg mL⁻¹ e para o CQA 5,22 µg mL⁻¹, estes valores são bastante semelhantes à concentração nominal dos CQs e levaram a CVs de 5,89% e

10,94% para o CQB e para o CQA, respectivamente, o que sugere que a Fosfoetanolamina se manteve estável após ser processada por aproximadamente 20 horas quando mantida à temperatura de 10 °C.

Tabela 28. Dados relativos aos controles utilizados na determinação da estabilidade de pós-processamento da Fosfoetanolamina (Substância de Referência) em plasma.

CQ, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Replicata1	Replicata2	Replicata3	Média	DP	CV%
CQB - 0,90	64891,00	68406,00	82381,00	71892,67	9251,63	12,87
CQM – 4,47	371157,00	450942,00	419261,00	413786,67	40173,22	9,71

CQ: Controle de Qualidade; CQB: Controle de Qualidade Baixo;
CQM: Controle de Qualidade Médio; CQA: Controle de Qualidade Alto;
DP: Desvio Padrão; CV%: Coeficiente de Variação %.

8. CONCLUSÃO

O desenvolvimento do método analítico para determinação da Fosfoetanolamina no plasma foi complexo, pois além da diferença de solubilidade entre a Substância Teste Fosfoetanolamina USP e a Substância de Referência (Fosfoetanolamina Sigma), a Fosfoetanolamina, por si só, possui algumas características físico-químicas que dificultam a sua análise por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. Tais características comprometeram diversas condições de análise, seja do ponto de vista cromatográfico ou da própria extração da matriz; além da dificuldade da caracterização e ionização por espectrometria de massas.

O método precisou ser validado sem o uso de um padrão interno pois esse seria mais um possível interferente ou variável a ser ajustada em um procedimento já bastante trabalhoso, uma vez que teria que ser um composto que também tivesse um grupo amino terminal e que reagisse com o derivatizante nas condições estabelecidas para a Fosfoetanolamina. Além disso, a inclusão de um composto que competisse com a Fosfoetanolamina por este reagente poderia diminuir ainda mais a % de recuperação. Entretanto, o método demonstrou coeficientes de variação percentual bastante satisfatórios em relação à precisão instrumental o que viabilizou a sua aplicação.

Não obstante às dificuldades, a metodologia analítica descrita neste relatório se mostrou robusta, linear, precisa, reprodutível e com sensibilidade adequada para os níveis de concentração a serem detectados no plasma. Este método foi testado em todos os parâmetros de validação preconizados pela ANVISA e todos apresentaram $CV \leq 20\%$ como

é o recomendado, com exceção de um controle de baixa concentração que se apresentou superior ao valor preconizado para o parâmetro exatidão.

Apesar da metodologia ter apresentado valores para os parâmetros validados bastante satisfatórios, a mesma resultou em baixos valores de recuperação, com uma recuperação média para os três controles de qualidade de aproximadamente 45%. Apesar de baixo, não é necessário que este valor seja de 100% e, sim, que a recuperação seja consistente, precisa e reprodutiva e essas condições foram atingidas pelo método aqui reportado.

Sendo assim, concluiu-se que o método analítico foi validado com sucesso e disponível para ser aplicado para a quantificação das Substâncias Teste (Fosfoetanolamina USP) e de Referência (Fosfoetanolamina Sigma) em amostras de plasma de ratos. Porém, cabe ressaltar que a Fosfoetanolamina não se mostrou estável no plasma nos ensaios de estabilidade de curta e longa duração, nem após três ciclos de congelamento e descongelamento. Portanto, é recomendável que o processamento e análise das amostras da matriz biológica sejam realizadas logo após a coleta.

9. REGISTRO DE DADOS BRUTOS

Todos os dados brutos e observações relacionadas ao estudo foram registrados em formulário adequado onde ficarão arquivadas por 5 anos.

10. ARQUIVAMENTO

Uma cópia original do Plano de Estudo, Dados Brutos e Relatório Final foram arquivados no CIEnP, onde serão mantidos por 5 anos. A Substância Teste foi armazenada, em local apropriado, no CIEnP e será mantida até a expiração de sua validade.

11. REFERÊNCIAS

BRASIL, **Resolução da ANVISA (RDC) nº 27**, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos.

CASS, Q. B. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, p. 1021-1030, 2009.

Food and Drug Administration (FDA) Guide for Industry: **Bioanalytical Method Validation**, 2001.

International Conference on Harmonisation (ICH): **Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology**, Q2A (CPMP/ICH/381/95), 1995.

International Conference on Harmonisation (ICH): **Validation of Analytical, Procedures: Methodology**, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.

LAPKO, V. N. et al. Quantitative analysis of bisphosphonates in biological samples. **Bioanalysis**, v. 6 (21), p. 2931-2950, 2014.

MOLNÁR-PERL, I. (Editor) HPLC of Amino Acids as Phenylthiocarbamoyl Derivatives. In: **Quantitation of Amino Acids and Amines by Chromatography**. Journal of Chromatography Library, p. 137-162, 2005.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

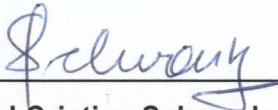
SPARIDANS, R. W. et al. The determination of pamidronate in pharmaceutical preparations by ion-pair liquid chromatography after derivatization with phenylisothiocyanate. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 16, p. 491-497, 1997.

TS-26922. Phenylisothiocyanate (PITC) – Instructions. Thermo Scientific, 2008. Disponível em: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/D00382~.pdf>

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

DECLARAÇÃO DO DIRETOR DE ESTUDO

Eu, abaixo assinado, declaro que este estudo foi realizado sob a minha supervisão, conforme os procedimentos nele descritos. Os resultados apresentados referem-se à Substância Teste utilizada.



Dra. Raquel Cristina Schwanke
Diretora do Estudo

08/08/16

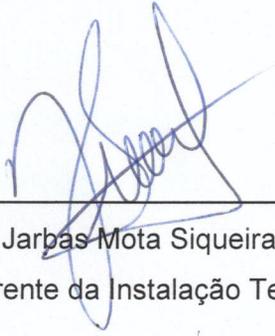
Data

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

DECLARAÇÃO DO GERENTE DA INSTALAÇÃO TESTE E DIRETOR-PRESIDENTE

Nós, abaixo assinados, declaramos que este estudo representa o registro preciso e verdadeiro dos resultados obtidos.

Este documento não deve ser reproduzido parcialmente.



Dr. Jarbas Mota Siqueira Júnior
Gerente da Instalação Teste

08/08/2016

Data



Dr. João Batista Calixto
Diretor-Presidente do CIEnP

08/08/2016

Data

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA