

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**VINICIUS FREIRE FAGUNDES**

**DETERMINAÇÃO DE ESTATINAS EM PLASMA HUMANO EMPREGANDO  
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM COLUNAS DE MEIO DE ACESSO RESTRITO**

**Belo Horizonte – MG**

**2013**

**VINICIUS FREIRE FAGUNDES**

**DETERMINAÇÃO DE ESTATINAS EM PLASMA HUMANO EMPREGANDO  
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM COLUNAS DE MEIO DE ACESSO RESTRITO**

Dissertação, como requisito parcial, para obter o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti, UFMG

Coorientador: Prof. Dr. Christian Fernandes, UFMG

**Belo Horizonte – MG**

**2013**

T156d Fagundes, Vinicius Freire.  
Determinação de estatinas em plasma humano empregando cromatografia líquida com colunas de meio de acesso restrito / Vinicius Freire Fagundes. – 2013.  
175 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti.  
Coorientador: Prof. Dr. Christian Fernandes.

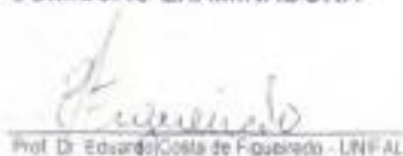
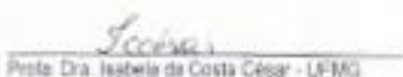
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Estatinas – Teses. 2. Cromatografia líquida – Teses. 3. Preparo de amostras – Teses. 4. Validação de método – Teses. 5. Tecnologia farmacêutica – Teses. I. Pianetti, Gerson Antônio. II. Fernandes, Christian. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 615.4

**FOLHA DE APROVAÇÃO****VINÍCIUS FREIRE FAGUNDES****"Determinação de estatinas em plasma humano empregando cromatografia líquida com colunas de meio de acesso restrito"**

Dissertação, como requisito parcial para obter o título de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais e aprovada em primeiro de março de 2013.

**COMISSÃO EXAMINADORA**  
Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo - UNIFAL  
Profa. Dra. Isabela de Costa César - UFMG  
Prof. Dr. Christian Fernandes - UFMG  
Prof. Dr. Gerson Antônio Pinheiro - UFMG

Dedico esse trabalho à minha avó Lélia,  
meu grande exemplo de vida.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Christian Fernandes pela coorientação, dedicação e paciência admiráveis, além do excelente exemplo de pesquisador e docente.

Ao Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti pela orientação e por oferecer todas as condições para a realização deste trabalho possibilitando meu crescimento científico e intelectual.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina Duarte Vianna Soares pela grande contribuição para o meu amadurecimento acadêmico.

Aos colegas do LCQ, Betânia, Fernando, Flávia, Iara, Isabela, Ju Brêtas, Laura, Mariana, Paula Chellini, Paula Enéas, Ricardo, Taízia e Tiago pelo bom convívio e contribuições científicas diárias.

À Edna, Geovani, Luciano, Leo, Lúcia e Márcia, pelo apoio e disposição em ajudar sempre que se fez necessário.

À minha avó Lélia, ao meu pai e aos irmãos, Caique, Geninho e Thaís, pelo amor e incentivo que me fazem caminhar.

À minha mãe e avô Saul que apesar da distância nunca se ausentam.

Ao Ado, Bianca, Gali, Maria, Tia Enilce e demais familiares pelo carinho de sempre.

À Tia Carminha que sempre me apoia e incentiva. Obrigado pelo seu amor, sua alegria e pela presença constante na minha vida.

Ao casal Renan e Dinha pelo carinho, amizade e pela boa companhia durante esses dois anos e sempre.

À Cacá, Juninho, Letivan, Luana e Lucas, aos colegas de república e aos demais amigos pelo companheirismo e pelas alegrias de tantos momentos.

Ao Ramon pelas contribuições em inglês prestadas ao decorrer do mestrado.

À CAPES/REUNI pelo apoio financeiro e pela bolsa concedida.

## RESUMO

O presente trabalho apresenta o preparo de coluna de Meio de Acesso Restrito (RAM) com albumina sérica bovina (BSA) imobilizada por meio de ligações cruzadas com glutaraldeído. A coluna RAM *homemade* foi comparada com coluna RAM comercial do tipo sílica alquil-diol (ADS) quanto à exclusão de proteínas do plasma humano por meio do método de determinação de proteínas totais de Bradford. Essas colunas foram ainda avaliadas e comparadas quanto à capacidade e qualidade de retenção de micromoléculas determinando os fatores de retenção e de assimetria de nove fármacos com características ácida (cetoprofeno, diclofenaco e pravastatina), neutra (bromazepam, omeprazol e teofilina) ou básica (mebendazol, propranolol e trimetoprima) alterando-se o pH da fase móvel. Foram também desenvolvidos métodos cromatográficos para determinação simultânea de quatro estatinas, fármacos hipolipemiantes, em plasma humano empregando colunas RAM como fases extratoras em sistema *column-switching* automatizado. As condições cromatográficas como composição e vazão da fase móvel, tempo de viragem da válvula, temperatura do forno e comprimento de onda de detecção na faixa do ultravioleta foram otimizadas para os dois modos de eluição da cromatografia bidimensional: *backflush* e *foreflush*. O método empregando o modo *backflush*, cujo tempo total da corrida analítica foi cerca da metade do tempo necessário no modo *foreflush*, foi então selecionado para a determinação de lovastatina, pravastatina, rosuvastatina e sinvastatina em plasma utilizando atorvastatina como padrão interno e foi completamente validado segundo a RDC 27 de 2012 da ANVISA. A coluna RAM-BSA possui preparo simples e, assim como a RAM-ADS comercial se mostrou eficiente para a exclusão de proteínas do plasma humano e propiciou retenção adequada para os diferentes compostos avaliados, sendo então uma alternativa viável para a substituição da coluna comercial. O método bioanalítico desenvolvido e validado demonstrou ser simples, rápido, preciso e exato na determinação simultânea de estatinas em plasma humano na faixa de 125 a 876 ngmL<sup>-1</sup> para lovastatina, rosuvastatina e sinvastatina e 500 a 2000 ngmL<sup>-1</sup> para pravastatina.

Palavras-chave: meio de acesso restrito (RAM) – *column switching* – preparo de amostras – estatinas.

## ABSTRACT

This study presents the preparation of a Restricted Access Media (RAM) column with immobilized bovine serum albumin (BSA) by crosslinking with glutaraldehyde. The homemade RAM column was compared with commercial alkyl-diol silica (ADS) RAM column regarding human plasma proteins exclusion using the total protein determination method of BRADFORD. These columns were also evaluated and compared in terms of the quality and capacity retention of micromolecules, determining the retention factor and asymmetry of nine acidic (ketoprofen, diclofenac and pravastatin), neutral (bromazepam, omeprazole and theophylline) or basic drugs (mebendazole, propranolol and trimethoprim), changing the mobile phase pH. It was also developed chromatographic methods for statins determination, lipid-lowering drugs, in human plasma using RAM columns as extracting phases in an automated column-switching system. The chromatographic conditions such as mobile phase flow-rate and composition, turning valve time, oven temperature and detection wavelength in the ultraviolet range were optimized for both modes of column-switching chromatography elution: backflush and foreflush. The method employing the backflush mode, whose total time of the analytical run was about a half of the time required in foreflush mode, was then selected for the determination of lovastatin, pravastatin, rosuvastatin and simvastatin in human plasma using atorvastatin as internal standard. This method was fully validated according to RDC 27 of ANVISA. The RAM-BSA column had simple preparation and, as well as ADS-RAM commercial, has shown capacity for excluding human plasma proteins and presented retention suitable for the different compounds evaluated. Thereby, the RAM-BSA column is a viable alternative for replacing the commercial column. The developed and validated bioanalytical method proved to be simple, rapid, precise and accurate for simultaneous determination of statins in human plasma in the range 125-876 ngmL<sup>-1</sup> for lovastatin, simvastatin and rosuvastatin and 500-2000 ngmL<sup>-1</sup> for pravastatin.

Key-word: restricted access material (RAM) – column switching – sample preparation – statins.



## LISTA DE FIGURAS

1 Distribuição do tempo consumido na análise de amostras biológicas .....	25
2 Distribuição de erros gerados durante a análise de amostras biológicas .....	25
3 Principais etapas empregadas em SPE visando o isolamento de um analito (ou classe de analitos) .....	28
4 Princípio da extração por SPME. (1) introdução da agulha no frasco que contém a amostra, (2) exposição da fibra para extração dos analitos, (3) retração da fibra e remoção do dispositivo após a extração. (D) dispositivo de extração, (F) fibra extratora, (A) amostra .....	30
5 Representação esquemática da barra de agitação SBSE .....	31
6 Representação esquemática da retenção seletiva de micromoléculas e exclusão de proteínas pelas partículas da coluna RAM .....	32
7 Número de artigos publicados até o ano de 2013 relacionados ao uso de fases RAM em análise on-line de amostras biológicas. Palavras-chave utilizadas: <i>internal surface reversed-phase, alkyl-diol-silica, semipermeable surface, protein-coated silica, shielded hydrophobic phase e mixed-function phase</i> . Pesquisa realizada no banco de dados <i>Directy Science</i> no dia 23/07/2013 .....	34
8 Representação esquemática das fases ISRP com grupos GFF e ADS com cadeias alquílicas .....	36
9 Representação esquemática das fases SPS e proteínas imobilizadas .....	37
10 Representação esquemática das fases SHP .....	39
11 Representação esquemática das fases MFP .....	40
12 Prevalência (%) da hipercolesterolemia em indivíduos de ambos os sexos com idade maior ou igual a 25 anos no ano de 2008 .....	41
13 Estrutura da HMG-CoA (a) e do grupo farmacofórico das estatinas (b) .....	42
14 Representação simplificada da biossíntese do colesterol .....	43
15 Estruturas das estatinas .....	44
16 Estrutura de lactona (a) e hidroxiácida (b) das estatinas .....	46
17 Esquema das etapas para o preparo da coluna RAM-BSA .....	61
18 Esquema do procedimento realizado para avaliar a eficiência da exclusão de proteínas do plasma humano pelas colunas RAM-BSA e RAM-ADS .....	64
19 Cromatograma representando a assimetria ( <i>As</i> ) do pico .....	70
20 Esquema de reações para a estabilização da BSA imobilizada: (1) formação das	

bases de Schiff entre a BSA e o glutaraldeído; (2) redução das bases de Schiff e dos grupos aldeídos residuais .....	73
<b>21</b> Fotografia do sistema montado para a percolação das soluções durante o preparo da coluna RAM-BSA .....	74
<b>22</b> Estrutura do corante azul brilhante de Coomassie G-250 .....	75
<b>23</b> Espectros de absorção do corante azul brilhante e do complexo corante-proteína da primeira fração coletada (0-2 min) após eluição do plasma humano na coluna RAM-BSA. Volumes de plasma injetado: 50, 100, 200 e 500 $\mu\text{L}$ . Fase móvel: água e vazão: 1,0 $\text{mLmin}^{-1}$ .....	77
<b>24</b> Espectros de absorção do corante azul brilhante e do complexo corante-proteína da primeira fração coletada (0-2 min) após eluição do plasma humano na coluna RAM-ADS. Volumes de plasma injetado: 50, 100, 200 e 500 $\mu\text{L}$ . Fase móvel: água e vazão: 1,0 $\text{mLmin}^{-1}$ .....	77
<b>25</b> Espectros de absorção do corante azul brilhante e do complexo corante-proteína da segunda fração coletada (2-4 min) após eluição do plasma humano na coluna RAM-BSA. Volumes de plasma injetado: 50, 100, 200 e 500 $\mu\text{L}$ . Fase móvel: água e vazão: 1,0 $\text{mLmin}^{-1}$ .....	78
<b>26</b> Espectros de absorção do corante azul brilhante e do complexo corante-proteína da segunda fração coletada (2-4 min) após eluição do plasma humano na coluna RAM-ADS. Volumes de plasma injetado: 50, 100, 200 e 500 $\mu\text{L}$ . Fase móvel: água e vazão: 1,0 $\text{mLmin}^{-1}$ .....	79
<b>27</b> Porcentagem de proteínas do plasma humano excluídas em 2 min pelas colunas RAM-BSA e RAM-ADS. Fase móvel: água e vazão: 1,0 $\text{mLmin}^{-1}$ .....	80
<b>28</b> Cromatograma do plasma humano na coluna RAM-BSA. Condições cromatográficas: Fase móvel: água, vazão: 1,0 $\text{mLmin}^{-1}$ , volume de injeção: 100 $\mu\text{L}$ e $\lambda$ : 280 nm .....	83
<b>29</b> Cromatograma do plasma humano na coluna RAM-ADS. Condições cromatográficas: Fase móvel: água, vazão: 1,0 $\text{mLmin}^{-1}$ , volume de injeção: 100 $\mu\text{L}$ e $\lambda$ : 280 nm .....	83
<b>30</b> Esquema do procedimento realizado para avaliar a retenção e assimetria de fármacos ácidos, neutros e básicos nas colunas RAM-BSA e RAM-ADS .....	87
<b>31</b> Retenção dos fármacos ácidos em função do pH da fase móvel nas colunas RAM-C18-BSA (30 x 4,6 mm, 15 $\mu\text{m}$ ) e RAM-C18-ADS (25 x 4,0 mm, 25 $\mu\text{m}$ ) .....	88
<b>32</b> Retenção dos fármacos neutros em função do pH da fase móvel nas colunas RAM-C18-BSA (30 x 4,6 mm, 15 $\mu\text{m}$ ) e RAM-C18-ADS (25 x 4,0 mm, 25 $\mu\text{m}$ ) .....	88
<b>33</b> Retenção dos fármacos básicos em função do pH da fase móvel nas colunas RAM-C18-BSA (30 x 4,6 mm, 15 $\mu\text{m}$ ) e RAM-C18-ADS (25 x 4,0 mm, 25 $\mu\text{m}$ ) .....	89

<b>34</b> Fator de assimetria ( <i>As</i> ) dos fármacos ácidos em função do pH da fase móvel nas colunas RAM-C18-BSA (30 x 4,6 mm, 15 µm) e RAM-C18-ADS (25 x 4,0 mm, 25 µm) .....	90
<b>35</b> Fator de assimetria ( <i>As</i> ) dos fármacos neutros em função do pH da fase móvel nas colunas RAM-C18-BSA (30 x 4,6 mm, 15 µm) e RAM-C18-ADS (25 x 4,0 mm, 25 µm) .....	91
<b>36</b> Fator de assimetria ( <i>As</i> ) dos fármacos básicos em função do pH da fase móvel nas colunas RAM-C18-BSA (30 x 4,6 mm, 15 µm) e RAM-C18-ADS (25 x 4,0 mm, 25 µm) .....	91
<b>37</b> Esquema das etapas para o preparo dos padrões e amostras de calibração e amostras de controle de qualidade .....	106
<b>38</b> Espectros de absorção da atorvastatina, lovastatina, pravastatina, rosuvastatina e sinvastatina a 20 µg mL <sup>-1</sup> em acetonitrila:solução fosfato de potássio 0,1 M pH 2,5 (40:60) .....	122
<b>39</b> Esquema da configuração do sistema <i>column-switching</i> no modo de eluição <i>backflush</i> .....	123
<b>40</b> Esquema da configuração do sistema de <i>column-switching</i> no modo de eluição <i>foreflush</i> .....	124
<b>41</b> Fotografia do sistema <i>column-switching</i> montado .....	125
<b>42</b> Fotografia do sistema de <i>column-switching</i> montado com destaque da válvula e das colunas RAM e analítica .....	126
<b>43</b> Cromatograma típico de plasma branco fortificado com estatinas a 2,0 µg mL <sup>-1</sup> obtido com o método bidimensional no modo <i>backflush</i> . (1) PRA, (2) ROS, (3) ATO, (4) LOV e (5) SIN .....	127
<b>44</b> Cromatograma típico de plasma branco fortificado com estatinas a 2,0 µg mL <sup>-1</sup> obtido com o método bidimensional no modo <i>foreflush</i> . (1) PRA, (2) ROS, (3) ATO, (4) LOV e (5) SIN .....	128
<b>45</b> Altura dos picos de estatinas na concentração de CQM em função do volume de injeção das amostras .....	131
<b>46</b> Aumento da altura dos picos de estatinas na concentração de CQM comparando-se volumes de injeção crescentes da amostra .....	132
<b>47</b> Fator de assimetria de estatinas na concentração de CQM em função do volume de injeção das amostras .....	133
<b>48</b> Cromatograma típico de plasma branco fortificado com estatinas na concentração de CQM. (1) PRA, (2) ROS, (3) ATO, (4) LOV e (5) SIN .....	134
<b>49</b> Cromatograma típico do plasma branco de estatinas .....	135
<b>50</b> Cromatograma de estatinas em metanol na concentração de CQB. (1) PRA, (2)	

<b>ROS, (3) ATO, (4) LOV e (5) SIN .....</b>	<b>138</b>
<b>51 Curva de calibração para a LOV em plasma utilizando ATO como padrão interno</b>	<b>143</b>
<b>52 Curva de calibração para a PRA em plasma utilizando ATO como padrão interno</b>	<b>144</b>
<b>53 Curva de calibração para a ROS em plasma utilizando ATO como padrão interno</b>	<b>144</b>
<b>54 Curva de calibração para a SIN em plasma utilizando ATO como padrão interno</b>	<b>145</b>

## LISTA DE TABELAS

1 Condições para análise de fármacos avaliados nas fases RAM-BSA e RAM-ADS ..	69
2 Porcentagem de proteínas do plasma humano excluídas em 2 min pelas colunas RAM-BSA e RAM-ADS e respectivos coeficientes de variação das injeções. Método de Bradford .....	80
3 Estatística $R_{eq}$ do teste de normalidade de <i>Ryan-Joyner</i> para as porcentagens de exclusão obtidas nas colunas RAM-BSA e RAM-ADS .....	81
4 Estatísticas $F$ de <i>Snedecor</i> e $t$ de <i>Student</i> para a comparação da eficiência de exclusão ente as colunas RAM-BSA e RAM-ADS .....	81
5 Porcentagem de proteínas do plasma humano excluídas em 2 min pelas colunas RAM-BSA e RAM-ADS. Cálculo pela área sob a curva do pico relativa .....	84
6 Fármacos avaliados nas fases RAM-BSA e RAM-ADS .....	86
7 Condições de gradiente para a fase móvel (B) no modo <i>backflush</i> de eluição .....	98
8 Condições de gradiente para a fase móvel (B) no modo <i>foreflush</i> de eluição .....	98
9 Volume de solução estoque de estatinas ( $\mu\text{L}$ ) para o preparo das soluções de trabalho de calibração e de controle de qualidade .....	103
10 Preparo dos padrões e amostras de calibração e amostras de controle de qualidade .....	105
11 ANOVA: Regressão e Desvio da linearidade .....	115
12 ANOVA: Precisão intra e inter corrida .....	118
13 ANOVA: Estimativa de $\text{DPR}_r$ e $\text{DPR}_R$ .....	118
14 Parâmetros cromatográficos das estatinas nos modos de eluição <i>backflush</i> e <i>foreflush</i> empregando colunas RAM-BSA e RAM-ADS .....	129
15 Valores das estatísticas $d_{calc}$ , $d_u$ e $4 - d_u$ do teste de independência dos resíduos de <i>Durbin-Watson</i> .....	140
16 Concentrações (C) em $\text{ngmL}^{-1}$ e desvio (%) em relação ao valor da concentração nominal das triplicatas dos sete padrões do estudo da linearidade para a lovastatina .....	141
17 Concentrações (C) em $\text{ngmL}^{-1}$ e desvio (%) em relação ao valor da concentração nominal das triplicatas dos sete padrões do estudo da linearidade para a pravastatina .....	141
18 Concentrações (C) em $\text{ngmL}^{-1}$ e desvio (%) em relação ao valor da concentração nominal das triplicatas dos sete padrões do estudo da linearidade para a rosuvastatina .....	142

<b>19</b> Concentrações (C) em ngmL <sup>-1</sup> e desvio (%) em relação ao valor da concentração nominal das triplicatas dos sete padrões do estudo da linearidade para a sinvastatina .....	142
<b>20</b> Valores de coeficiente angular (b) e coeficiente linear (a) das equações de calibração das estatinas .....	143
<b>21</b> Valores de coeficiente de determinação (R <sup>2</sup> ) e de correlação (r) das equações de calibração das estatinas .....	146
<b>22</b> Precisão e Exatidão intra e inter corrida para a lovastatina (n=6) .....	147
<b>23</b> Precisão e Exatidão intra e inter corrida para a pravastatina (n=6) .....	147
<b>24</b> Precisão e Exatidão intra e inter corrida para a rosuvastatina (n=6) .....	148
<b>25</b> Precisão e Exatidão intra e inter corrida para a sinvastatina (n=6) .....	148
<b>26</b> Média e desvio em relação ao valor nominal das concentrações das amostras analisadas após o preparo (n=3) .....	150
<b>27</b> Média e desvio em relação ao valor nominal das concentrações das amostras analisadas após ciclos de congelamento e descongelamento (n=3) .....	151
<b>28</b> Média e desvio em relação ao valor nominal das concentrações das amostras analisadas após estabilidade de curta duração, 2h (n=3) .....	151
<b>29</b> Média e desvio em relação ao valor nominal das concentrações das amostras analisadas após estabilidade de longa duração (n=3) .....	152
<b>30</b> Média e desvio em relação ao valor nominal das concentrações das amostras analisadas após estabilidade pós-processamento (n=3) .....	152

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A	Intercepto da curva de calibração
ACN	acetonitrila
ADS	<i>Alkyl-Diol Silica</i>
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
As	Fator de assimetria
ATO	atorvastatina
AUC	Área sob a curva
B	Inclinação da curva de calibração
BSA	albumina sérica bovina
CG	Cromatografia gasosa
CEDAFAR-BIO	Laboratório de Bioequivalência do Centro de Estudos e Desenvolvimento Analítico Farmacêutico
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
C <sub>máx</sub>	Concentração plasmática máxima
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CQ	Controle de qualidade
CQA	Controle de qualidade de alta concentração
CQB	Controle de qualidade de baixa concentração
CQD	Controle de qualidade de diluição
CQM	Controle de qualidade de média concentração
DAD	Detector de arranjo de diodos
DPR	Desvio padrão relativo
EPR	Erro padrão relativo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FM	Fase móvel
FMN	Fator de matriz normalizado por PI
GFF	glicina-L-fenilalanina-L-fenilalanina
HAS	albumina sérica humana
HDL-C	Lipoproteína de alta densidade-colesterol

HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
ICF	Instituto de Ciências Farmacêuticas
ISRP	<i>Internal Surface Reversed-Phase</i>
K	Fator de retenção
LCQ	Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos
LDL-C	Lipoproteína de baixa densidade-colesterol
LIQ	Limite inferior de quantificação
LLE	Extração líquido-líquido
LOV	lovastatina
LSQ	Limite superior de quantificação
MFP	<i>Mixed-Function Phase</i>
MS	Espectrometria de massas
N	Número de pratos teóricos
o-HATO	orto-hidroxiatorvastatina
P	Padrão de calibração
PA	Para análise
PDMS	polidimetilsiloxano
PI	Padrão Interno
PRA	pravastatina
R	Coeficiente de correlação
R <sup>2</sup>	Coeficiente de determinação
RAM	Meio de acesso restrito
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
Res	Resolução
ROS	rosuvastatina
RP	Fase reversa
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
SBSE	Extração por sorção em barra de agitação
SE	Solução estoque
SHP	<i>Shielded Hydrophobic Phase</i>
SIN	sinvastatina



SINA	hidroxiácido de sinvastatina
SPE	Extração em fase sólida
SPME	Microextração em fase sólida
SPS	<i>Semi-Permeable Surface</i>
SRQ	Substância química de referência
ST	Solução de trabalho
$t_R$	Tempo de retenção
$t_0$	Tempo morto
USP	<i>United States Pharmacopeial Convention</i>
UV	Ultravioleta
$UV_{máx}$	Absorção máxima na região do ultravioleta
UV-vis	Ultravioleta e visível
v/v	Volume por volume

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 .....	20
1 INTRODUÇÃO .....	21
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	24
2.1 Amostras biológicas e preparo de amostras .....	24
2.2 Técnicas para preparo de amostras biológicas .....	26
2.2.1 <u>Técnicas convencionais</u> .....	26
2.2.1.1 <u>Precipitação de proteínas</u> .....	26
2.2.1.2 <u>Extração líquido-líquido (LLE)</u> .....	26
2.2.1.3 <u>Extração em fase sólida (SPE)</u> .....	27
2.2.2 <u>Técnicas não convencionais</u> .....	29
2.2.2.1 <u>Microextração em fase sólida (SPME)</u> .....	29
2.2.2.2 <u>Extração por sorção em barra de agitação (SBSE)</u> .....	31
2.2.2.3 <u>Extração em fase sólida com meio de acesso restrito (RAM)</u> .....	32
2.2.2.3.1 Fases ISRP (Internal Surface Reversed-Phase) .....	35
2.2.2.3.2 Fases ADS (Alkyl-Diol Silica) .....	36
2.2.2.3.3 Fases SPS (Semi-Permeable Surface) .....	36
2.2.2.3.4 Fases hidrofóbicas com proteína imobilizada (Protein-Coated Silica) .....	37
2.2.2.3.5 Fases SHP (Shielded Hydrophobic Phase) .....	38
2.2.2.3.6 Fases MFP (Mixed-Function Phase) .....	39
2.3 Colesterol, hipercolesterolemia e estatinas .....	40
2.4 Determinação de estatinas em plasma humano .....	46
2.5 RDC nº 27 – Validação de métodos bioanalíticos .....	47
2.5.1 <u>Ensaio de validação</u> .....	48
2.5.1.1 <u>Seletividade</u> .....	48
2.5.1.2 <u>Efeito residual</u> .....	49
2.5.1.3 <u>Efeito matriz</u> .....	49
2.5.1.4 <u>Curva de calibração</u> .....	50
2.5.1.5 <u>Precisão</u> .....	51
2.5.1.6 <u>Exatidão</u> .....	51
2.5.1.7 <u>Estabilidade do analito em matriz biológica</u> .....	52
2.5.1.7.1 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento .....	52
2.5.1.7.2 Estabilidade de curta duração .....	53
2.5.1.7.3 Estabilidade de longa duração .....	53
2.5.1.7.4 Estabilidade pós-processamento .....	53
2.5.1.8 <u>Estabilidade do analito e PI em solução</u> .....	54
2.5.2 <u>Aplicação do método validado</u> .....	54

3 OBJETIVOS .....	56
3.1 Objetivo Geral .....	56
3.2 Objetivos Específicos .....	56
<b>CAPÍTULO 2 – DESENVOLVIMENTO DE COLUNA CROMATOGRÁFICA DE MEIO DE ACESSO RESTRITO PROTEÍNA-IMOBILIZADA E SUA AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO COM COLUNA COMERCIAL SÍLICA ALQUIL-DIOL .....</b>	<b>57</b>
1 MATERIAIS E MÉTODOS .....	58
1.1 Materiais .....	58
1.1.1 <u>Substâncias químicas de referência (SQR)</u> .....	58
1.1.2 <u>Reagentes e vidrarias</u> .....	58
1.1.3 <u>Equipamentos e materiais</u> .....	59
1.2 Métodos .....	60
1.2.1 <u>Preparo da coluna RAM-BSA – imobilização de BSA na fase hidrofóbica</u> .....	60
1.2.2 <u>Avaliação e comparação da exclusão de proteínas do plasma humano pelas colunas RAM-BSA e RAM-ADS – método de Bradford</u> .....	61
1.2.2.1 <u>Preparo do reagente de Bradford</u> .....	62
1.2.2.2 <u>Obtenção das amostras excluídas das colunas RAM-BSA e RAM-ADS e preparo das soluções de plasma</u> .....	62
1.2.2.3 <u>Medidas espectrofotométricas das amostras excluídas e das soluções de plasma</u> .....	63
1.2.3 <u>Avaliação dos fatores de retenção e de assimetria de fármacos ácidos, neutros ou básicos nas colunas RAM-BSA e RAM-ADS</u> .....	68
2 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	72
2.1 Preparo da coluna RAM-BSA – imobilização de BSA na fase hidrofóbica .....	72
2.2 Avaliação e comparação da exclusão de proteínas do plasma humano pelas colunas RAM-BSA e RAM-ADS .....	74
2.3 Avaliação dos fatores de retenção e de assimetria de fármacos ácidos, neutros ou básicos nas colunas RAM-BSA e RAM-ADS .....	85
3 CONCLUSÃO .....	92
<b>CAPÍTULO 3 – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE LOVASTATINA, PRAVASTATINA, ROSUVASTATINA E SINVASTATINA EM PLASMA HUMANO EMPREGANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM COLUNAS DE MEIO DE ACESSO RESTRITO .....</b>	<b>93</b>
1 MATERIAIS E MÉTODOS .....	94
1.1 Materiais .....	94
1.1.1 <u>Substâncias químicas de referência (SQR) e amostras</u> .....	94
1.1.2 <u>Reagentes e vidrarias</u> .....	95
1.1.3 <u>Equipamentos e materiais</u> .....	95

---

1.2 Métodos .....	96
1.2.1 <u>Ajuste do pH das amostras biológicas</u> .....	96
1.2.2 <u>Medidas espectrofotométricas de soluções padrão de estatinas</u> .....	97
1.2.3 <u>Desenvolvimento e comparação de métodos empregando os modos de eluição <i>backflush</i> e <i>foreflush</i> do sistema de <i>column-switching</i></u> .....	97
1.2.4 <u>Avaliação dos volumes de injeção de amostras de estatinas</u> .....	100
1.2.5 <u>Condições cromatográficas para validação do método</u> .....	101
1.2.6 <u>Preparo das amostras e padrões de validação do método</u> .....	102
1.2.6.1 <u>Preparo das soluções estoque de estatinas</u> .....	102
1.2.6.2 <u>Preparo das soluções de trabalho de calibração e de controle de qualidade</u> ..	102
1.2.6.3 <u>Preparo de padrões e amostras de calibração e amostras de controle de qualidade</u> .....	103
1.2.7 <u>Crterios de desempenho para validação bioanalítica</u> .....	107
1.2.7.1 <u>Seletividade</u> .....	107
1.2.7.2 <u>Efeito residual</u> .....	107
1.2.7.3 <u>Efeito matriz</u> .....	108
1.2.7.4 <u>Curva de calibração</u> .....	109
1.2.7.5 <u>Precisão e Exatidão</u> .....	116
1.2.7.6 <u>Limite inferior de quantificação (LIQ)</u> .....	119
1.2.7.7 <u>Estabilidade dos analitos em matriz biológica</u> .....	120
1.2.7.7.1 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento .....	120
1.2.7.7.2 Estabilidade de curta duração .....	121
1.2.7.7.3 Estabilidade de longa duração .....	121
1.2.7.7.4 Estabilidade pós-processamento .....	121
<b>2 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	122
2.1 <b>Medidas espectrofotométricas de soluções padrão de estatinas</b> .....	122
2.2 <b>Desenvolvimento e comparação de métodos empregando os modos de eluição <i>backflush</i> e <i>foreflush</i> do sistema de <i>column-switching</i></b> .....	123
2.3 <b>Avaliação dos volumes de injeções de amostras de estatinas</b> .....	130
2.4 <b>Condições cromatográficas para validação do método</b> .....	133
2.5 <b>Crterios de desempenho para validação bioanalítica</b> .....	135
2.5.1 <u>Seletividade</u> .....	135
2.5.2 <u>Efeito residual</u> .....	136
2.5.3 <u>Efeito matriz</u> .....	137
2.5.4 <u>Curva de calibração</u> .....	138
2.5.5 <u>Precisão e Exatidão</u> .....	146
2.5.6 <u>Limite inferior de quantificação (LIQ)</u> .....	149
2.5.7 <u>Estabilidade dos analitos em matriz biológica</u> .....	149
<b>3 CONCLUSÃO</b> .....	154

<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>155</b>
<b>APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido para o grupo 1 – indivíduos não usuários de fármacos da classe das estatinas .....</b>	<b>165</b>
<b>APÊNDICE B – Termo de consentimento livre e esclarecido para o grupo 2 – indivíduos usuários de fármacos da classe das estatinas .....</b>	<b>168</b>
<b>ANEXO A – Carta de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG .....</b>	<b>171</b>
<b>ANEXO B – Apresentações em congresso decorrentes do trabalho .....</b>	<b>173</b>

## **CAPÍTULO 1**

## 1 INTRODUÇÃO

A determinação de fármacos e seus metabólitos em amostras biológicas é de fundamental importância em diversas áreas analíticas, tais como: análises farmacêuticas, de antidoping e toxicológicas. Contudo, matrizes complexas estão associadas a alguns problemas como, por exemplo, a grande diversidade de interferentes endógenos – proteínas em plasma, soro, tecidos e leite e sais inorgânicos em urina – e a baixa concentração do analito na amostra.<sup>1,2</sup>

Métodos cromatográficos têm sido largamente utilizados para tal propósito, principalmente aqueles por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC, do inglês: *High Performance Liquid Chromatography*). Geralmente as amostras são submetidas a processos de purificação e concentração antes da análise propriamente dita. Esta etapa de preparo de amostras objetiva principalmente a eliminação de interferentes endógenos, os quais são incompatíveis com sistemas cromatográficos. As técnicas mais utilizadas para o preparo de amostras biológicas são: precipitação de proteínas, extração líquido-líquido e extração em fase sólida. Tais técnicas, apesar de consagradas na área, consomem a maior parte do tempo empregado em uma análise, geram mais erros, necessitam de maior manipulação da amostra e requerem alto consumo de solventes orgânicos.<sup>1,2</sup>

Ultimamente, tem-se utilizados mecanismos automatizados para injeção direta (*on-line*) de fluidos biológicos em CLAE utilizando pré-colunas que permitem a extração do analito de interesse, descartando os demais componentes da matriz biológica. Os suportes constituídos de Meio de Acesso Restrito (RAM) são um exemplo deste tipo de preparo de amostras. Colunas RAM unem os princípios de cromatografia de exclusão e da cromatografia de fase reversa, suas partículas apresentam uma região hidrofóbica no interior de seus poros responsável pela retenção de micromoléculas ao mesmo passo que sua superfície externa recoberta por ligantes polares impedem a adsorção de macromoléculas.<sup>1-5</sup>

Há, atualmente, seis principais tipos de suportes RAM, os quais podem ser classificados em fases de superfície bimodal (*Internal Surface Reversed-Phase*, *Alkyl-Diol Silica*, *Semi-Permeable Surface* e *Protein-Coated Silica*) ou fases de superfície unimodal (*Shielded Hydrophobic Phase* e *Mixed-Function Phase*). As

fases de superfície bimodal apresentam a região externa da sílica hidrofílica e a região interna hidrofóbica, enquanto que as fases de superfície unimodal possuem tanto a superfície externa quanto a interna com características hidrofílica e hidrofóbica. Extração em fase sólida com meio de acesso restrito é uma técnica de preparo de amostras simples, rápida e de baixo erro analítico que pode ser utilizada no sistema automatizado *column-switching* permitindo a injeção direta de amostras biológicas no cromatógrafo.

A hiperlipidemia, caracterizada por níveis plasmáticos elevados de triglicerídeos ou de colesterol, é a manifestação de um distúrbio na síntese e degradação de lipoproteínas plasmáticas. É a principal causa de aterosclerose e outras patologias a ela relacionadas, como doença cardíaca coronariana, doença vascular cerebral isquêmica e doença vascular periférica. Apesar de haver uma queda nos índices desses eventos, essas continuam sendo protagonistas da maior parte da morbidade e mortalidade entre adultos de meia-idade e de idade mais avançada em países desenvolvidos. Segundo o Ministério da Saúde 30% da população apresenta hipercolesterolemia e, de acordo com dados da Sociedade Brasileira de Cardiologia, a cada ano são registradas 320 mil mortes por causas cardiovasculares.<sup>6-10</sup>

A principal classe farmacológica utilizada no controle de dislipidemias é a das estatinas. Algumas estatinas têm origem natural como a lovastatina (LOV), pravastatina (PRA) e sinvastatina (SIN, derivado semi-sintético), outras são compostos totalmente sintéticos como a fluvastatina, atorvastatina (ATO) e rosuvastatina (ROS). Todas estas moléculas são capazes de inibir a HMG-CoA redutase, enzima que cataliza a etapa limitante da produção do colesterol endógeno.<sup>9</sup>

Atualmente, a determinação de estatinas em fluidos biológicos é realizada empregando técnicas de preparo de amostras convencionais para posterior separação cromatográfica; entretanto, até o presente momento, não há nenhum trabalho descrito na literatura que trata da análise simultânea de estatinas em plasma empregando colunas RAM, uma técnica moderna.

Diante do exposto, este estudo propôs o uso do sistema automatizado *column-switching* com colunas RAM para a extração de estatinas e sua determinação em plasma humano o que permitiu a injeção direta da amostra em cromatógrafo a



líquido. O método foi validado quanto aos critérios de precisão, exatidão, curva de calibração, efeito residual, efeito matriz, seletividade e estabilidade, em consonância com a RDC 27 de 2012 da ANVISA. Contudo, a curva de calibração foi ainda estatisticamente avaliada em relação à presença de *outliers* entre os dados experimentais por meio do teste de *Jackknife* e quanto a normalidade, homocedasticidade e independência dos resíduos, aplicando, respectivamente, os testes de *Ryan-Joiner*, *Brown-Forsythe* e *Durbin-Watson*. O ajuste ao modelo matemático proposto foi então determinado por meio da avaliação do desvio da linearidade por ANOVA.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Amostras biológicas e preparo de amostras

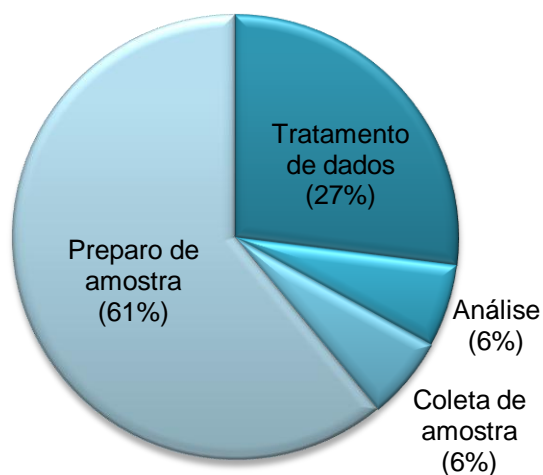
Fármacos e metabólitos são determinados em diversos tipos de amostras biológicas. Apesar das amostras alternativas estarem sendo utilizadas para a determinação de compostos endógenos e exógenos no organismo humano, as matrizes convencionais ainda são muito empregadas na área analítica. Assim, matrizes não convencionais, como, por exemplo, saliva, suor, cabelo, unha e outras tem grande destaque em análises toxicológicas.<sup>11</sup> Contudo, em estudos biofarmacêuticos, analitos são identificados e quantificados majoritariamente em fluidos convencionais como o sangue, suas frações e urina.<sup>12</sup>

As matrizes biológicas possuem algumas peculiaridades que lhes conferem algumas vantagens e desvantagens em termos analíticos. Por exemplo, a concentração analítica de compostos no sangue e em suas frações (plasma ou soro) apresenta alta correlação com o efeito destas substâncias no organismo; tal propriedade possibilita a monitorização de fármacos com estreita margem terapêutica. Em contrapartida, esta amostra apresenta como principal desvantagem sua grande complexidade. A coexistência de muitos compostos, endógenos e exógenos, nesta matriz geralmente acarreta interferência na análise. Além disto, há uma alta concentração de proteínas no sangue, as quais apresentam significativa incompatibilidade com sistemas cromatográficos.<sup>1,11</sup>

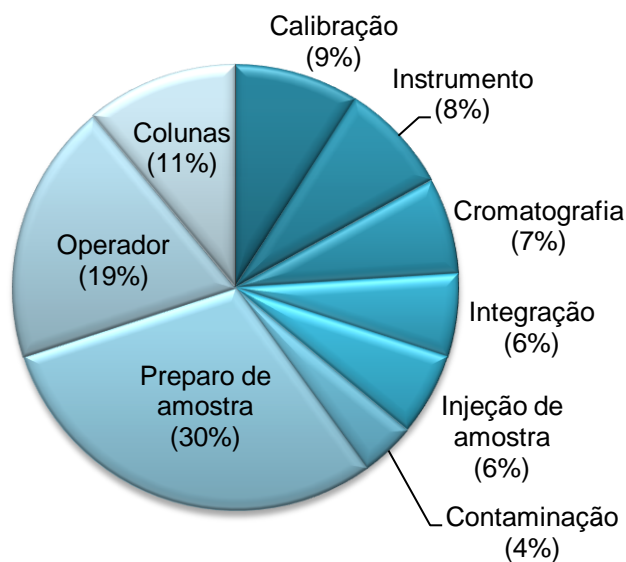
Assim sendo, é necessário o pré-tratamento de fluidos biológicos, anteriormente à etapa analítica. A etapa de preparo de amostras tem como objetivo a eliminação de interferentes, facilitando a separação dos compostos por cromatografia, o que propicia o prolongamento da vida útil das colunas e do sistema cromatográfico. Além disso, esta etapa possibilita a concentração dos analitos na amostra, quando naturalmente se encontram em concentrações muito baixas. Porém, a inclusão desta etapa à determinação analítica eleva significativamente os erros do processo e o tempo gasto na análise.<sup>13-15</sup>

Aproximadamente 60% do tempo empregado na determinação analítica (**Figura 1**) e 30% do erro total da análise (**Figura 2**) se correlacionam à etapa de preparo de amostras. Ainda, cerca de 20% do erro origina-se de falhas humanas na operação. Dessa forma, evidencia-se que a utilização de uma técnica de preparo de amostras automatizada pode diminuir a ocorrência de erros pela metade, além de reduzir sensivelmente o tempo gasto em uma análise.<sup>13,15</sup>

**Figura 1** – Distribuição do tempo consumido na análise de amostras biológicas.<sup>13</sup>



**Figura 2** – Distribuição de erros gerados durante a análise de amostras biológicas.<sup>13</sup>



## **2.2 Técnicas para preparo de amostras biológicas**

### **2.2.1 Técnicas convencionais**

#### **2.2.1.1 Precipitação de proteínas**

Os fármacos e/ou metabólitos, em sua cinética no organismo humano, são biodistribuídos pela corrente sanguínea, transportados principalmente ligados a proteínas plasmáticas. Esta interação fármaco-proteína pode ser rompida pela técnica de precipitação de proteínas, aumentando a concentração livre do analito para análise. A precipitação pode ser realizada por diferentes técnicas: aquecimento, tratamento com ácidos, bases e solventes orgânicos miscíveis em água, como o metanol, acetonitrila (ACN) e etanol. As proteínas são separadas por centrifugação da mistura e o sobrenadante é, então, injetado no cromatógrafo para análise do composto de interesse. Apesar de ser simples, barata e rápida, a precipitação de proteínas muitas vezes não produz uma amostra suficientemente limpa, necessitando executar uma segunda técnica complementar. Além disso, ocorre uma diluição do material biológico, com conseqüente redução da concentração do analito, acarretando uma baixa detectabilidade do método analítico.<sup>16</sup>

#### **2.2.1.2 Extração líquido-líquido (LLE)**

A LLE é considerada uma técnica clássica de preparo de amostras biológicas e é muito utilizada na análise de diversos compostos, pois extratos altamente limpos podem ser obtidos devido à razoável seletividade por alguns analitos.<sup>17</sup>

Na extração líquido-líquido o analito é isolado em função de sua partição entre duas fases idealmente imiscíveis, uma orgânica e a outra aquosa. Esta técnica é dependente da afinidade do fármaco pelos solventes utilizados, pela proporção

deles na mistura e pelo número total de extrações, fatores estes determinantes para a eficiência da extração.<sup>11,17</sup>

A técnica se baseia na adição do solvente ou mistura de solventes à amostra biológica, extração do analito sob agitação e tempo otimizados, separação das fases orgânica e aquosa, geralmente por centrifugação, coleta e evaporação da fase orgânica e, por fim, ressuspensão do resíduo. A extração pode ainda ser otimizada com o ajuste de pH para uma faixa em que ácidos e bases estejam na forma não ionizada; com a formação de par iônico com analitos ionizáveis; com a formação de complexos lipofílicos analito-íons metálicos ou com a adição de sais, efeito denominado de *salting out*, o qual objetiva reduzir a solubilidade do composto de interesse na fase aquosa, aumentando assim a recuperação do analito na extração. O principal desafio da técnica é a obtenção de adequada recuperação do fármaco com o mínimo possível de interferentes provenientes da matriz.<sup>11,17,18</sup>

Apesar da LLE proporcionar uma limpeza satisfatória das amostras, a técnica é relativamente demorada, de difícil automação, apresenta alto consumo de solventes orgânicos, pode ocorrer formação de emulsões, intensificando ainda mais o tempo gasto na etapa de preparo da amostra, e de pequena repetitividade/reprodutibilidade em decorrências das várias etapas envolvidas.<sup>11,17,19</sup>

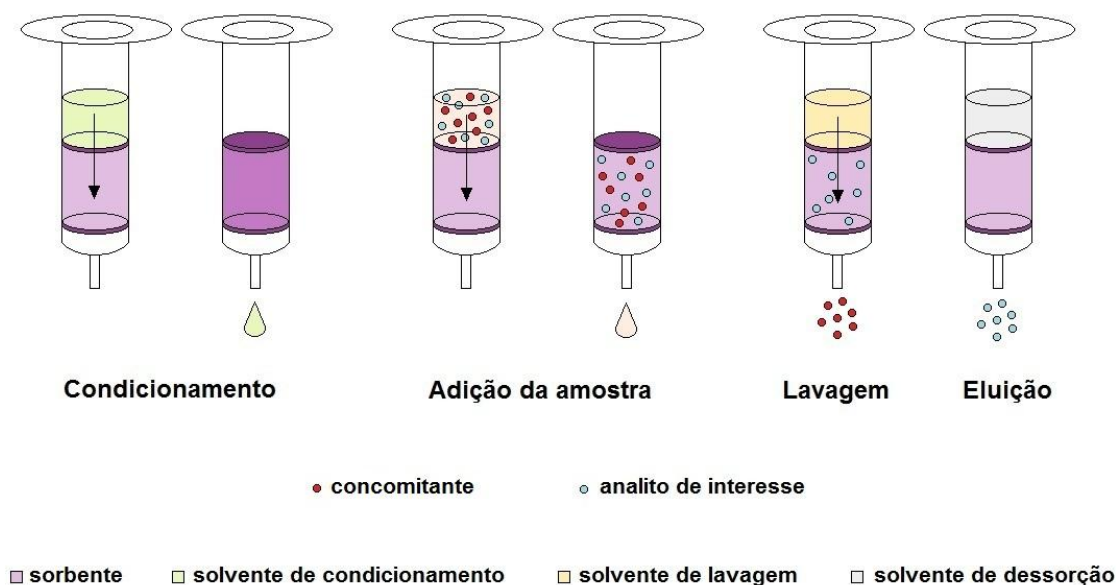
### **2.2.1.3 Extração em fase sólida (SPE)**

Atualmente, a extração em fase sólida é a técnica mais empregada na extração e/ou concentração de analitos em matrizes complexas. A SPE é uma técnica de separação líquido-sólido e se assemelha à cromatografia líquida clássica: emprega materiais sorventes empacotados em cartuchos na forma de seringa ou discos e os mecanismos de retenção são idênticos aos utilizados em cromatografia líquida em coluna.<sup>17,19</sup>

De forma geral, a extração nestes suportes envolve quatro etapas principais: condicionamento do cartucho para ativar os sítios de ligação existentes no material sorvente, adição da amostra (retenção do analito e, às vezes, alguns interferentes),

limpeza da coluna por meio de remoção de interferentes e, finalmente, recuperação do analito (**Figura 3**).<sup>17,19,20</sup>

**Figura 3** – Principais etapas empregadas em SPE visando o isolamento de um analito (ou classe de analitos).<sup>19</sup>



No intuito de otimizar o método, além da escolha do solvente de eluição adequado é comum a utilização de fases duplas em SPE, que podem ser do tipo misto, em camadas ou em série. No modo misto, duas fases distintas são misturadas em um mesmo cartucho. No modo em camadas, as duas fases também são colocadas no mesmo cartucho, mas uma sobre a outra e não misturadas. Na forma em série utilizam-se sucessivos cartuchos com recheios distintos e a amostra elui por estes suportes de modo sequencial.<sup>17,21</sup>

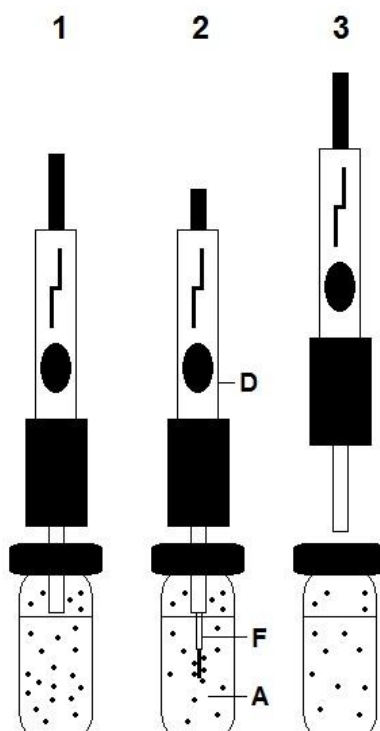
A extração em fase sólida possui como principais vantagens em relação à LLE a alta recuperação do analito, tempo reduzido, economia de solventes orgânicos, ausência da formação de espumas ou emulsões, execução mais simples e facilidade para automação. Uma das desvantagens da SPE é a possibilidade do fármaco eluir do cartucho durante o processo de lavagem, além do alto custo desses suportes.<sup>20,22</sup>

## **2.2.2 Técnicas não convencionais**

### **2.2.2.1 Microextração em fase sólida (SPME)**

ARTHUR e PAWLISZYN<sup>23</sup> desenvolveram fibras para microextração em fase sólida para extração de analitos voláteis em matrizes complexas. Nesta técnica é utilizada uma fibra ótica, composta por sílica fundida, recoberta por um filme de um polímero, como, por exemplo, polidimetilsiloxano (PDMS), poliacrilato e carbowax ou de um adsorvente sólido como o carvão ativado microparticulado. A fibra ótica, que exerce a função extratora, encontra-se acondicionada no interior da agulha de uma microseringa. A extração pode ser realizada de duas maneiras: uma delas é mergulhando a fibra diretamente na solução da amostra. Neste processo de sorção dos analitos, a amostra é constantemente agitada e, após certo tempo, a fibra é recolhida para dentro da agulha. A outra forma é por *headspace*, na qual a fibra e a amostra não entram em contato direto. A fibra é inserida em um recipiente fechado, o sistema é então aquecido e os compostos voláteis são sorvidos pela fibra.<sup>17,23</sup> A **Figura 4** ilustra o princípio básico da extração por SPME.

**Figura 4** – Princípio da extração por SPME. (1) introdução da agulha no frasco que contém a amostra, (2) exposição da fibra para extração dos analitos, (3) retração da fibra e remoção do dispositivo após a extração. (D) dispositivo de extração, (F) fibra extratora, (A) amostra.<sup>24</sup>



Após a extração, os analitos sorvidos na fibra são termicamente dessorvidos com a introdução direta da fibra no injetor do cromatógrafo a gás ou no interior de uma interface apropriada para o acoplamento com o cromatógrafo a líquido. A dessorção pode ainda ocorrer de modo *off-line* com o uso de solventes adequados para posterior injeção cromatográfica.<sup>17,20</sup>

As vantagens da SPME são: obtenção de extratos mais limpos e redução, ou até eliminação, do uso de solventes orgânicos. Porém, a técnica se limita a analitos voláteis e termoestáveis para dessorção e determinação por cromatografia gasosa (CG).<sup>17</sup> Além disso, muitas vezes a SPME é mais demorada e trabalhosa que a LLE e SPE.

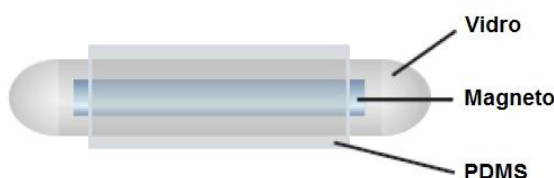


Outro formato de SPME realiza a extração no interior de um tubo (*in tube* SPME), neste caso, a superfície interna de um capilar de sílica fundida é revestida pelo material extrator. A amostra é aspirada e ejetada sucessivamente por diversas vezes através do capilar garantindo assim uma maior eficiência na extração. Em seguida, o sistema pode ser lavado e os analitos dessorvidos para análise.<sup>17,19,20</sup>

### 2.2.2.2 Extração por sorção em barra de agitação (SBSE)

A extração por sorção em barra de agitação é uma técnica de preparo de amostras recente. Esta técnica apresenta analogia com a microextração em fase sólida. No entanto, em SBSE, o analito é sorvido na fase extratora que recobre uma barra de agitação magnética (**Figura 5**). Como a superfície de contato da fase extratora da SBSE é muito maior que a superfície da fibra da SPME, a SBSE permite recuperação dos analitos mais satisfatória.<sup>20,25</sup>

**Figura 5** – Representação esquemática da barra de agitação SBSE.<sup>26</sup>



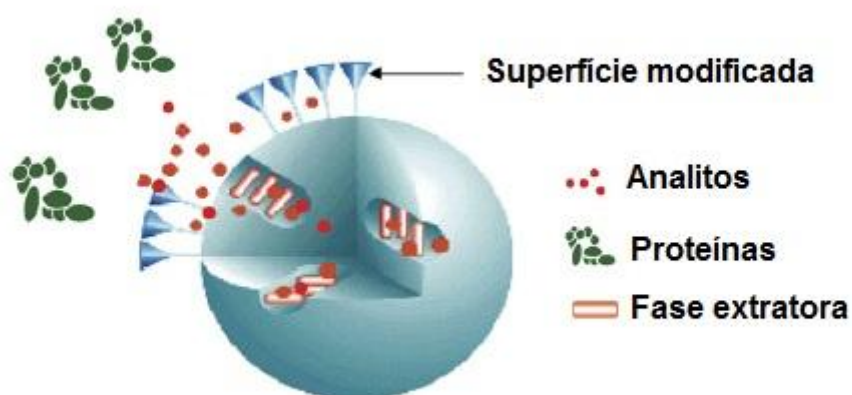
A extração na SBSE também pode ser realizada pela agitação da barra no interior da amostra ou no modo *headspace*. A dessorção do analito pode ser feita de modo direto, por um dispositivo térmico apropriado adaptado no injetor do cromatógrafo a gás ou de forma indireta, pela dessorção em fase líquida adequada com consequente aplicação em CG ou CLAE. A dessorção direta é mais precisa em relação à dessorção indireta, porém requer que o fármaco seja volátil e termicamente estável, além de apresentar alto custo de implementação.<sup>25,27</sup>

Uma limitação desta técnica é que, no momento, existem poucos materiais comercializados para a SBSE: PDMS e PDMS com etilenoglicol, o que compromete sua aplicação para alguns tipos de analitos.

### 2.2.2.3 Extração em fase sólida com meio de acesso restrito (RAM)

O termo meio de acesso restrito, do inglês: *restricted access material*, foi introduzido por DESILETS<sup>28</sup> *et al.* em 1991. Esta denominação refere-se a uma família de pré-colunas que permitem a injeção direta de amostras biológicas no cromatógrafo a líquido. As colunas RAM são compostas por uma matriz física e quimicamente elaborada a fim de limitar a retenção em seu material interno hidrofóbico a moléculas de tamanho reduzido. Por outro lado, macromoléculas, como as proteínas do plasma sanguíneo, são excluídas do sistema por meio da repulsão eletrostática sofrida com a superfície externa hidrofílica das partículas nesses suportes.<sup>1,2</sup> A **Figura 6** ilustra a retenção de micromoléculas e exclusão de proteínas pelas fases RAM.

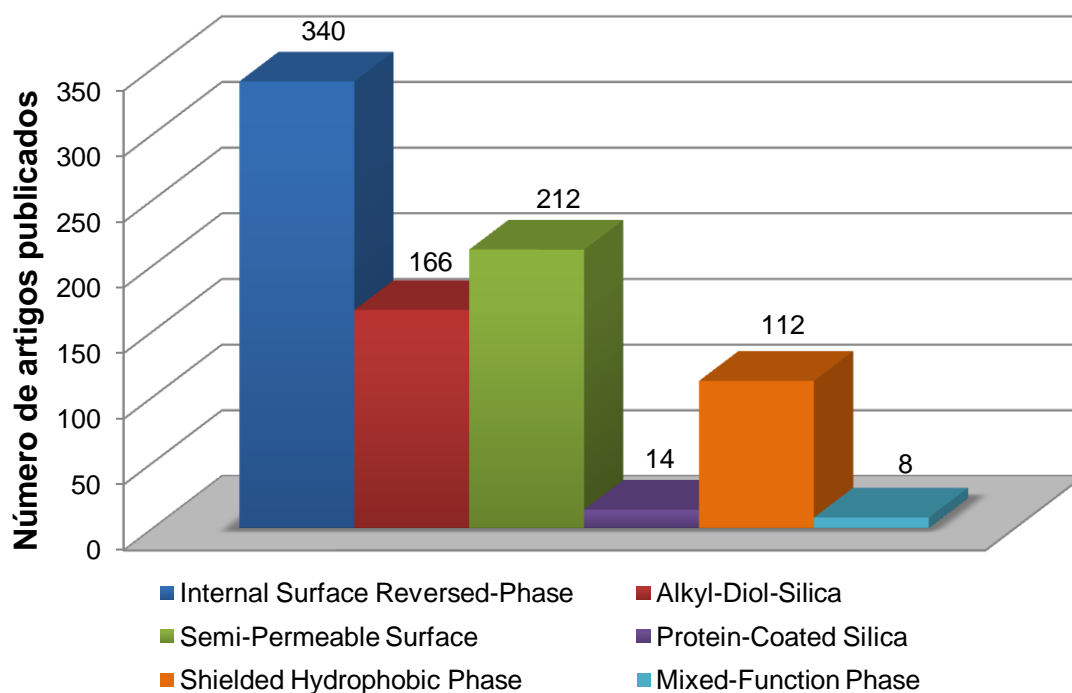
**Figura 6** – Representação esquemática da retenção seletiva de micromoléculas e exclusão de proteínas pelas partículas da coluna RAM.<sup>29</sup>



As fases RAM foram classificadas de acordo com o mecanismo de exclusão das macromoléculas. Assim, as fases RAM podem formar uma barreira de difusão física, representada pelo pequeno diâmetro dos poros da sílica utilizada, o que impede o acesso de grandes moléculas; e/ou uma barreira de difusão química, a qual é formada pela ligação ou adsorção de grupamentos polares à superfície da sílica levando à repulsão eletrostática de macromoléculas.<sup>1</sup>

Contudo, essa classificação foi expandida por BOOS e RUDOLPHI<sup>5</sup>. Segundo esses autores, as fases RAM podem se dividir em fases de superfície bimodal ou unimodal, estas duas com barreiras de difusão física e/ou química. As fases de superfície bimodal caracterizam-se por apresentar uma região externa hidrofílica e uma região interna hidrofóbica, fazem parte desta categoria as fases ISRP (*Internal Surface Reversed-Phase*), ADS (*Alkyl-Diol Silica*), SPS (*Semi-Permeable Surface*) e as fases hidrofóbicas imobilizadas com proteínas (*Protein-Coated Silica*). Em contrapartida, as fases de superfície unimodal possuem tanto a região interna da sílica quanto a externa com propriedade hidrofílica e hidrofóbica simultaneamente. Nesse caso, podem ser subclassificadas como fases SHP (*Shielded Hydrophobic Phase*) e fases MFP (*Mixed-Function Phase*). Todos os tipos de fases RAM têm sido amplamente estudados e empregados na análise de amostras biológicas. A **Figura 7** apresenta o número de artigos publicados até o ano de 2013 com os diferentes tipos de suportes RAM.

**Figura 7** – Número de artigos publicados até o ano de 2013 relacionados ao uso de fases RAM em análise on-line de amostras biológicas. Palavras-chave utilizadas: *internal surface reversed-phase*, *alkyl-diol-silica*, *semipermeable surface*, *protein-coated silica*, *shielded hydrophobic phase* e *mixed-function phase*. Pesquisa realizada no banco de dados *Directy Science* no dia 23/07/2013.



As colunas RAM podem ser acopladas ao sistema cromatográfico em dois modos de eluição cromatográfica: simples ou bidimensional. No modo simples, a amostra biológica é injetada na fase RAM, as proteínas são excluídas e, sequencialmente, os analitos são eluídos pela fase móvel (FM) para o detector. Dessa forma, têm-se apenas uma coluna com dupla propriedade, extratora e analítica.<sup>2,29-32</sup>

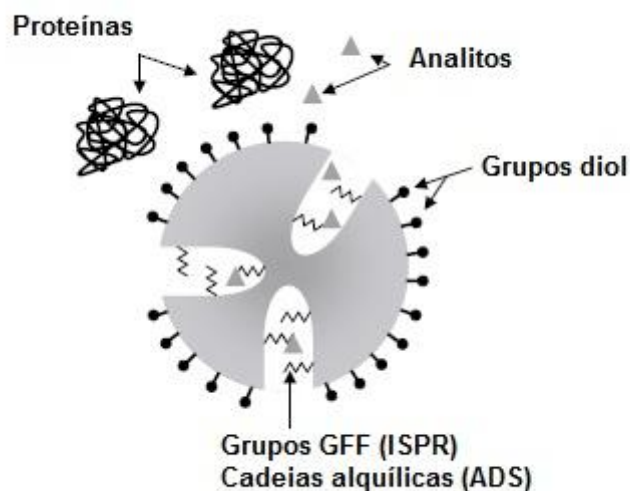
Porém, grande parte dos métodos de análise lança mão do modo bidimensional de eluição, o qual emprega duas colunas: a coluna RAM com função extratora e a coluna analítica, responsável pela separação cromatográfica. Assim, em um primeiro momento, a amostra é aplicada na coluna RAM, as macromoléculas são excluídas e os analitos retidos. Posteriormente, os analitos são transferidos pela fase móvel para uma segunda coluna (analítica) em seguida, ao detector. A transferência dos analitos da primeira para a segunda coluna pode ser feita manualmente ou no modo automatizado (*column-switching*). Nesse caso, utiliza-se uma válvula comutadora para alterar o sentido e direção do fluxo.

Em geral, as técnicas de preparo de amostras automatizadas, *on-line*, oferecem diversas vantagens em relação às técnicas *off-line*: elevada redução do tempo de análise; menor manipulação da amostra, conseqüentemente, melhores resultados de precisão e exatidão; uso reduzido de solventes orgânicos, portanto, um menor risco de intoxicação ocupacional e ambiental; e uma maior segurança operacional do analista frente ao grande potencial de risco de contaminação biológica que as amostras oferecem.<sup>1,32,33</sup>

#### 2.2.2.3.1 Fases ISRP (*Internal Surface Reversed-Phase*)

HAGESTAM e PINKERTON<sup>34</sup> são reconhecidos como os criadores das fases de meio de acesso restrito, já que em 1985 introduziram o conceito de *internal surface reversed-phase* para análise de fármacos em matriz biológica. Estes pesquisadores cobriram a superfície interna dos poros da sílica com um tripeptídeo hidrofóbico, a glicina-L-fenilalanina-L-fenilalanina (GFF), e na superfície externa acoplaram resíduos de glicina hidrofílicos (**Figura 8**). Estas fases apresentaram pouca retenção para alguns compostos, uma vez que os poros não ficaram suficientemente recobertos pelo tripeptídeo. Então, foram produzidas as fases denominadas GFF II, que, por alterações de síntese, possuem maior extensão da superfície interna dos poros recoberta de polipeptídeos. Assim, estas fases apresentaram resultados de seletividade, capacidade e eficiência de retenção mais satisfatórios.<sup>5, 34</sup>

**Figura 8** – Representação esquemática das fases ISRP com grupos GFF e ADS com cadeias alquílicas.<sup>2</sup>



#### 2.2.2.3.2 Fases ADS (*Alkyl-Diol Silica*)

As fases ADS foram desenvolvidas por BOOS<sup>35</sup> *et al.* em 1991. Elas se caracterizam pela presença de grupamentos hidrofílicos (grupos dióis) na superfície externa da sílica e cadeias alquílicas (butila, octila, octadecila) na superfície interna dos poros, tornando hidrofóbica esta região (**Figura 8**). Sua estrutura se assemelha às partículas de HAGESTAM e PINKERTON<sup>34</sup>, porém possuem maior eficiência de retenção de analitos se comparada às ISRP GFF II. As fases ADS são encontradas com o nome comercial LiChrospher ADS<sup>®</sup> e são produzidas pela empresa Merck.

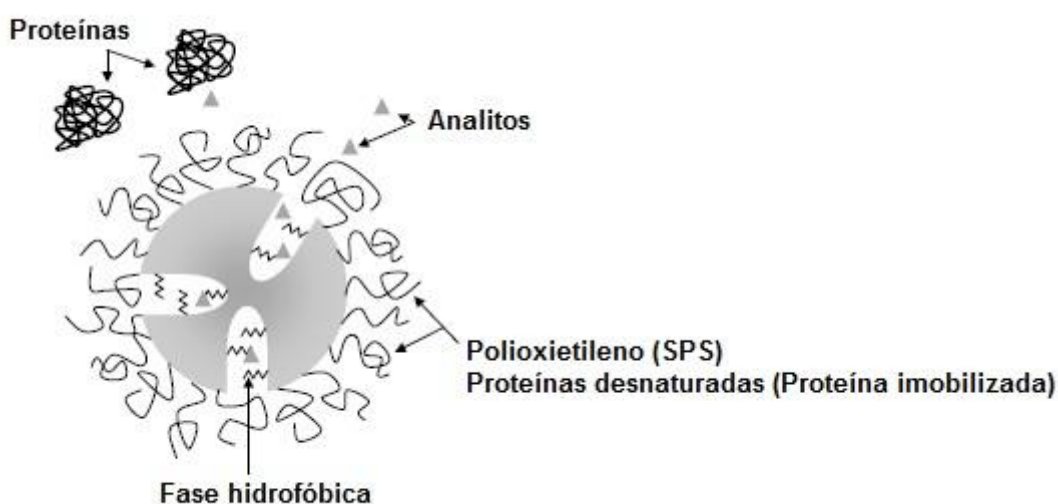
#### 2.2.2.3.3 Fases SPS (*Semi-Permeable Surface*)

As fases SPS, desenvolvidas por DESILETS<sup>28</sup> e colaboradores e comercializadas atualmente pela Regis Technologies, apresentam grupamentos do polímero

polioxietileno (hidrofílico) na superfície externa das partículas e grupamentos alquílicos na superfície interna dos poros. A **Figura 9** ilustra a fase SPS.

Os polímeros de oxietileno eram, inicialmente, adsorvidos às partículas empacotadas, caracterizando assim as fases SPS de primeira geração. Porém, ao entrar em contato com os solventes orgânicos da fase móvel, estes compostos adsorvidos se desprendiam da sílica após algumas análises. Assim, foi necessária a modificação dessas fases, dando origem às fases SPS de segunda geração, substituindo-se o processo de adsorção dos grupamentos hidrofílicos por ligações covalentes, as quais são altamente estáveis.<sup>36</sup>

**Figura 9** – Representação esquemática das fases SPS e proteínas imobilizadas.<sup>2</sup>



#### 2.2.2.3.4 Fases hidrofóbicas com proteína imobilizada (*Protein-Coated Silica*)

YOSHIDA<sup>37</sup> e colaboradores descreveram a preparação de colunas RAM cuja matriz é composta por sílica com seus sítios de adsorção externos saturados por proteínas desnaturadas (**Figura 9**).

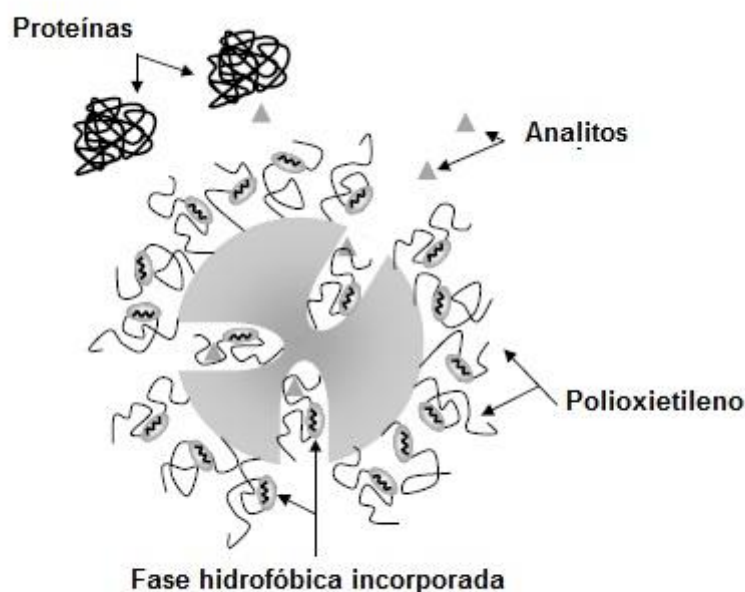
Nesta mesma categoria se inclui as fases desenvolvidas por MENEZES<sup>38</sup> *et al.* em que suportes de sílica são saturados com albumina sérica bovina (BSA) ou humana (HSA) estabilizadas por ligações cruzadas com glutaraldeído, bem como as fases de sílica ou aminopropilsílica complexada com avidina. As colunas com BSA imobilizadas ficaram conhecidas como RAM-BSA.

Outras abordagens foram descritas com o uso das fases com proteína imobilizada. FELIX e CAMPÈSE<sup>33</sup> desenvolveram uma coluna RAM-BSA que possui a superfície interna dos poros da sílica recoberta pelo seletor quiral  $\beta$ -ciclodextrina, e BSA imobilizada recobrindo a superfície externa. Esta fase RAM apresentou bons resultados para a exclusão protéica e para a enantiosseletividade dos fármacos oxazepam, lorazepam, temazepam e lormetazepam em plasma humano. Esta ideia tem sido expandida para outros seletores quirais – como  $\alpha$  e  $\gamma$ -ciclodextrinas – e para a determinação de outros compostos.

#### 2.2.2.3.5 Fases SHP (*Shielded Hydrophobic Phase*)

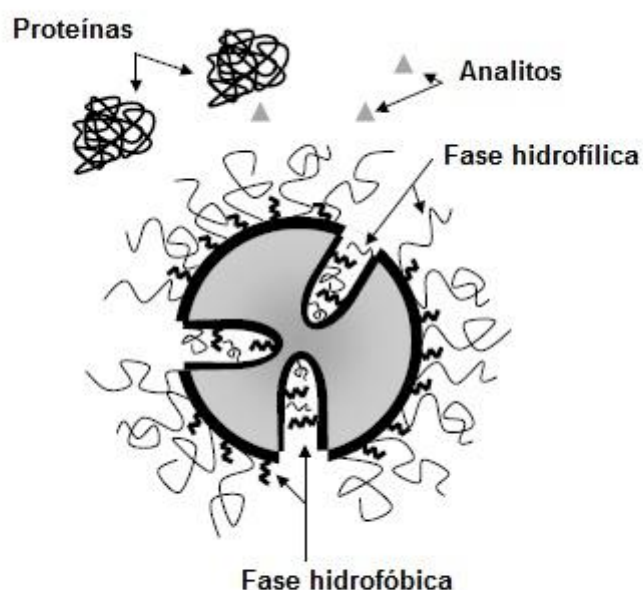
Em 1988, GISCH<sup>39</sup> *et al.* introduziram as fases SHP, que apresentam, tanto na superfície da sílica quanto em seus poros, polímeros de polioxietileno (hidrofílico) contendo anéis aromáticos (hidrofóbico) (**Figura 10**). Estas fases são disponibilizadas comercialmente pela empresa Supelco, com o nome comercial Hisep<sup>®</sup>.



**Figura 10** – Representação esquemática das fases SHP.<sup>2</sup>

#### 2.2.2.3.6 Fases MFP (*Mixed-Function Phase*)

HAGINAKA<sup>40,41</sup> *et al.* desenvolveram as chamadas fases MFP, as quais consistem na adição de radicais hidrofóbicos (fenila, butila ou octila) juntamente com radicais hidrofílicos (diol) tanto na superfície externa dos poros das partículas do suporte quanto na superfície interna (**Figura 11**). Por apresentarem estes dois tipos de radicais, as colunas desempenham papel de exclusão e afinidade, simultaneamente, frente às moléculas da matriz biológica e podem ser utilizadas para reter tanto fármacos e metabólitos polares quanto apolares. Tais fases, assim como as SHP, são classificadas como fases de superfície unimodal.

**Figura 11** – Representação esquemática das fases MFP.<sup>2</sup>

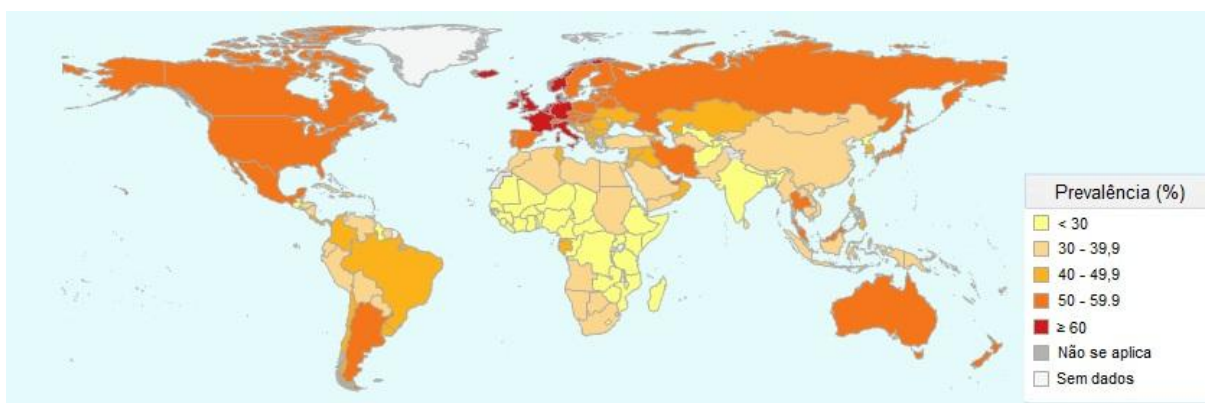
### 2.3 Colesterol, hipercolesterolemia e estatinas

O colesterol é um álcool policíclico que apresenta papel fisiológico importante no organismo humano, já que compõe a membrana celular e é precursor dos hormônios adrenocorticóides e dos sexuais como a progesterona, andrógenos e estrogênios. Esse composto existe sob duas formas principais: os complexos lipoproteína de baixa densidade-colesterol (LDL-C) e lipoproteína de alta densidade-colesterol (HDL-C).

Sabe-se que concentrações plasmáticas elevadas de LDL-C ( $\geq 160 \text{ mgdL}^{-1}$ ) e/ou triglicerídeos ( $\geq 150 \text{ mgdL}^{-1}$ ), além do baixo teor de HDL-C ( $\leq 40 \text{ mgdL}^{-1}$ ) estão associadas ao distúrbio de hiperlipidemia, que é a principal causa de aterosclerose e outras patologias a ela associadas, tais como doença cardíaca coronariana, doença cerebrovascular isquêmica, e doença vascular periférica.<sup>6-9</sup> A hiperlipidemia é uma preocupação de ordem global. Nos Estados Unidos, de acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention*, um a cada seis americanos apresentam níveis

séricos de LDL-C elevados e menos da metade dos adultos hiperlipêmicos controlam e tratam adequadamente a doença. No Brasil, o quadro não é diferente; segundo o Ministério da Saúde 30% da população apresenta hipercolesterolemia e, de acordo com a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC), a cada ano são registradas 320 mil mortes por causas cardiovasculares. A **Figura 12** ilustra a distribuição geográfica de hipercolesterolêmicos em 2008.

**Figura 12** – Prevalência (%) da hipercolesterolemia em indivíduos de ambos os sexos com idade maior ou igual a 25 anos no ano de 2008.<sup>42</sup>



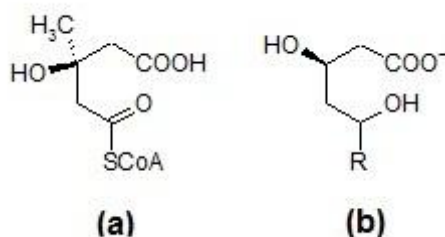
Para o tratamento da hiperlipidemia recomenda-se mudanças no estilo de vida dos pacientes, assim como dieta hipolipêmica e balanceada, prática de exercício físico regular, controle do peso e controle da pressão arterial. Entretanto, quando essas medidas se mostram ineficazes, torna-se necessário, juntamente com as mesmas, o emprego de terapia medicamentosa, a qual é realizada, principalmente, com medicamentos da classe das estatinas e dos fibratos.

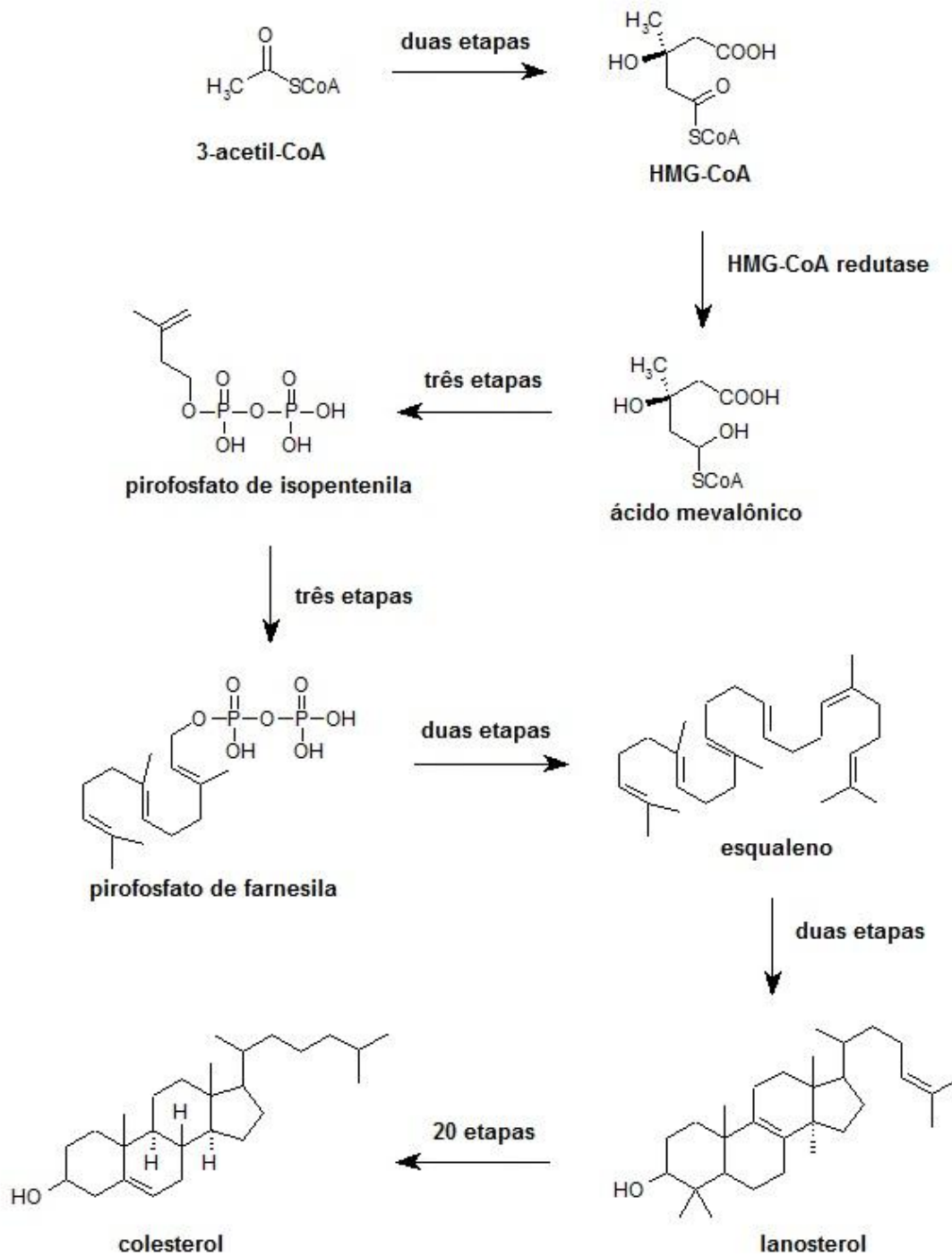
Por serem fármacos de primeira escolha na redução dos níveis séricos de colesterol e tratamento de hiperlipidemias, de uso contínuo e de grande importância para a saúde pública, cinco estatinas – atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina e sinvastatina – em diversas dosagens, fazem parte da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais, RENAME, de 2012. A RENAME é estabelecida pela política nacional de medicamentos e sua elaboração se baseia nas prioridades

nacionais de saúde, além da segurança, eficácia terapêutica comprovada, qualidade e da disponibilidade dos medicamentos considerados essenciais.<sup>43</sup>

A classe das estatinas compreende fármacos que possuem semelhança molecular com a 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA), sendo, portanto, potentes inibidores competitivos da conversão do substrato HMG-CoA em mevalonato pela enzima HMG-CoA redutase. A **Figura 13** representa a estrutura molecular da HMG-CoA e do grupo farmacofórico das estatinas. A redução catalítica de HMG-CoA a mevalonato é a etapa principal e limitante da velocidade da síntese hepática do colesterol, a qual está simplificada ilustrada na **Figura 14**.

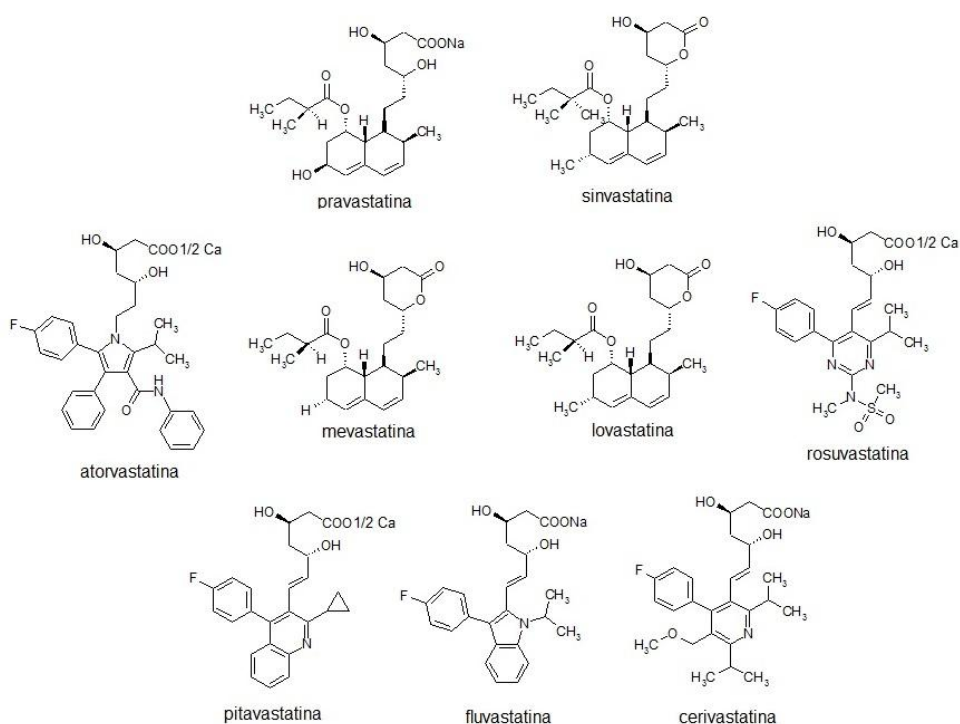
**Figura 13** – Estrutura da HMG-CoA (a) e do grupo farmacofórico das estatinas (b).



**Figura 14** – Representação simplificada da biossíntese do colesterol.

Em 1976, foi descoberto e isolado, por AKIRA ENDO<sup>44</sup>, o primeiro composto da classe das estatinas, produzido por fungos *Penicillium citrinum* e conhecido como compactina ou mevastatina. Em 1978, surgiu a segunda estatina de origem natural, a lovastatina, produto isolado de fungos *Aspergillus terreus*, a qual, em 1987, foi a primeira estatina a ser aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration) e comercializada. Mais tarde, fármacos mais potentes foram obtidos por modificações moleculares das estatinas até então conhecidas. Assim, a mevastatina e a lovastatina foram protótipos das estatinas semi-sintéticas pravastatina e sinvastatina, respectivamente. Por fim, cinco novas estatinas foram desenvolvidas e comercializadas, são elas as estatinas sintéticas: fluvastatina, cerivastatina, atorvastatina, rosuvastatina e pitavastatina. Porém, em 2001, a cerivastatina teve seu uso descontinuado por apresentar como efeito colateral quadros de miopatia.<sup>44</sup> Atualmente, são utilizados no Brasil, lovastatina, pravastatina, sinvastatina, fluvastatina, atorvastatina e rosuvastatina. Nos Estados Unidos a comercialização da pitavastatina foi aprovada pela FDA em 2009. As estruturas moleculares das estatinas estão representadas na **Figura 15**.

**Figura 15** – Estruturas das estatinas.



A atorvastatina cálcica triidratada,  $(C_{33}H_{34}FN_2O_5)_2 \cdot Ca \cdot 3H_2O$ , cujo peso molecular é 1209,42 *u*, é um pó cristalino branco ou quase branco, pouco solúvel em água e acetonitrila, ligeiramente solúvel em etanol e facilmente solúvel em metanol. Possui  $pK_a$  de 4,46 e coeficiente de partição (log P) (octanol/água) de 4,20. Sua solução em metanol ou acetonitrila apresenta absorção máxima na região do ultravioleta ( $UV_{m\acute{a}x}$ ) em 248 nm.<sup>45-47</sup>

A lovastatina,  $C_{24}H_{36}O_5$ , com peso molecular de 404,54 *u*, é um pó cristalino branco. É praticamente insolúvel em água e éter de petróleo, ligeiramente solúvel em alcoóis de baixo peso molecular como metanol, etanol e isopropanol, solúvel em acetona e acetonitrila e facilmente solúvel em clorofórmio. Possui log P (octanol/água) de 4,26. Sua solução aquosa ácida apresenta  $UV_{m\acute{a}x}$  em 231, 238 e 247 nm.<sup>45,46</sup>

A pravastatina sódica,  $C_{23}H_{35}NaO_7$ , cujo peso molecular é de 446,51 *u*, é um pó cristalino branco ou quase branco higroscópico, praticamente insolúvel em clorofórmio, éter, acetona e acetonitrila e facilmente solúvel em água e metanol. Possui  $pK_a$  de 4,70 e log P (octanol/água) de -0,23. Sua solução em metanol apresenta  $UV_{m\acute{a}x}$  em 230, 237 e 245 nm.<sup>45,46</sup>

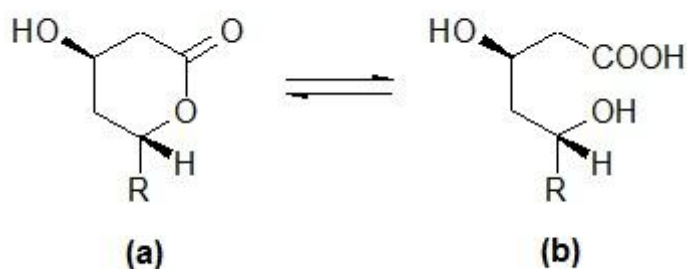
A rosuvastatina cálcica,  $(C_{22}H_{27}FN_3O_6S)_2 \cdot Ca$ , com peso molecular de 1001,14 *u*, é um pó branco amorfo, praticamente insolúvel em água e metanol e ligeiramente solúvel em etanol. Possui log P (octanol/água) de 1,46. Sua solução em metanol apresenta  $UV_{m\acute{a}x}$  em 241 nm.<sup>48</sup>

A sinvastatina,  $C_{25}H_{38}O_5$ , cujo peso molecular é de 418,57 *u*, é um pó cristalino branco, insolúvel em água, *n*-hexano e ácido clorídrico 0,1 M e solúvel em clorofórmio, metanol, etanol, polietilenoglicol, hidróxido de sódio e propilenoglicol. Possui log P (octanol/água) de 4,68. Sua solução em acetonitrila apresenta  $UV_{m\acute{a}x}$  em 231, 238 e 247 nm.<sup>45,46</sup>

As estatinas existem sob duas formas estruturais interconvertíveis: lactona e hidróxiácida (**Figura 16**). A lovastatina e a sinvastatina se encontram como lactonas nas formas farmacêuticas orais, no entanto a atorvastatina, pravastatina e rosuvastatina são comercializadas como sais de sódio ou cálcio. Lactonas de estatinas são pró-fármacos absorvidos pelo trato gastrointestinal e biotransformados a suas formas hidróxiácidas ativas pelo fígado e outros tecidos não hepáticos.

Embora a conversão da lactona de estatina à sua forma hidroxilácida correspondente ocorra naturalmente em meios aquosos como o plasma, a velocidade de conversão é dependente e modulada pelas condições intrínsecas do meio como pH e natureza do solvente e extrínsecas como temperatura e fotoexposição. Segundo PIECHA<sup>49</sup> e colaboradores a interconversão entre as formas lactônicas e hidroxilácidas das estatinas pode ser retardada em condições ácidas – com a redução do pH do meio.<sup>49-51</sup>

**Figura 16** – Estrutura de lactona (a) e hidroxilácida (b) das estatinas.



## 2.4 Determinação de estatinas em plasma humano

Diversos estudos relacionados com a determinação de estatinas em plasma humano utilizando técnicas convencionais de preparo de amostras foram desenvolvidos e publicados, contudo, até o presente momento, não há nenhum trabalho descrito na literatura que trata da análise de estatinas em plasma empregando colunas RAM.

ABDALLAH<sup>52</sup> desenvolveu e validou métodos para determinação de atorvastatina, fluvastatina e pravastatina em comprimidos e em plasma humano por cromatografia líquida de fase reversa com detecção no ultravioleta (RP-CLAE/UV). Na análise do plasma o autor preparou as amostras por precipitação de proteínas com acetonitrila e obteve recuperação média dos fármacos de 98,19 a 98,87%.



Atorvastatina e rosuvastatina foram determinadas em soro humano empregando RP-CLAE/UV por SHAH<sup>53</sup> *et al.* As amostras de soro foram preparadas por precipitação de proteínas com etanol seguida de duas etapas de LLE com os solventes éter dietílico e diclorometano. As precisões médias intra e inter-corrída foram, respectivamente, 0,38 e 0,62% para a atorvastatina e 0,44 e 0,87% para a rosuvastatina.

GUILLEN<sup>54</sup> e colaboradores determinaram atorvastatina e, seu principal metabólito, a orto-hidroxiatorvastatina (o-HATO) em plasma humano por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CLAE/MS). Neste estudo, o preparo das amostras envolveu LLE e SPE por troca iônica no modo *on-line*. Na etapa de LLE foram consumidos cerca de 30 minutos excetuando o tempo gasto na evaporação dos solventes. Esse método apresentou como precisão intra e inter-corrída valores menores que 10%, exatidão intra e inter-corrída entre 94 e 105%, limites de quantificação de 0,1 ngmL<sup>-1</sup> para a ATO e de 0,5 ngmL<sup>-1</sup> para a o-HATO e recuperação superior a 75% para ambas as moléculas.

Sinvastatina e o seu principal produto de biotransformação, o hidróxiácido de sinvastatina (SINA), foram determinados em plasma humano empregando CLAE/MS por BARRETT<sup>55</sup> e colaboradores. Neste trabalho as amostras foram preparadas por SPE. Os limites de quantificação do método foram de 0,03 ngmL<sup>-1</sup> e 0,02 ngmL<sup>-1</sup> para, respectivamente, a SIN e o SINA, a faixa linear foi estabelecida de 0,10 a 16,00 ngmL<sup>-1</sup> e a precisão intra e inter-corrída apresentou coeficiente de variação menor que 7%.

## 2.5 RDC nº 27 – Validação de métodos bioanalíticos

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 27<sup>56</sup>, 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.

Segundo a resolução, sempre que possível, métodos cromatográficos devem ser empregados como primeira escolha e, sempre que aplicável, deve ser utilizado

padrão interno (PI, substância química proveniente de uma solução padrão de concentração fixa, adicionada em uma mesma quantidade aos padrões de calibração, amostras de controle de qualidade e amostras em estudo). A validação total deve ser realizada sempre que um método bioanalítico for implementado e esta deve conter ensaios de seletividade, efeito residual, efeito matriz, curva de calibração, precisão, exatidão, estabilidade do analito e PI em matriz biológica e em solução.

## **2.5.1 Ensaio de validação**

### **2.5.1.1 Seletividade**

O estudo de seletividade é realizado por comparação das áreas de picos interferentes próximos aos tempos de retenção dos analitos em amostras branco em relação às áreas dos analitos na concentração do limite inferior de quantificação (LIQ) e do PI em sua concentração usual. Para a determinação de fármacos em plasma, o estudo deve envolver seis amostras branco de fontes distintas, das quais quatro são amostras branco normais, uma lipêmica e uma hemolisada. As respostas de picos interferentes devem ser inferiores a 20% da resposta dos analitos na amostra LIQ e 5% da resposta do PI.

A interferência de metabólitos, fármacos de uso concomitante, produtos de degradação formados durante o preparo da amostra, nicotina, cafeína e outros possíveis interferentes deve ser avaliada sempre que necessário.

Caso uma ou mais amostras analisadas apresentem interferência acima dos limites estabelecidos, novas amostras de, no mínimo, outras seis fontes distintas devem ser testadas. E caso uma ou mais amostras do segundo grupo apresentem interferência acima dos limites estabelecidos, o método deve ser alterado visando eliminá-la.

### **2.5.1.2 Efeito residual**

A avaliação do efeito residual é análogo à da seletividade. Devem ser injetadas no cromatógrafo três amostras branco de mesma procedência intercaladas por uma amostra dos analitos e PI na concentração do limite superior de quantificação (LSQ). As amostras devem então ser injetadas na seguinte ordem: uma amostra branco, a amostra LSQ e duas amostras branco. As respostas de picos interferentes nas amostras branco devem ser inferiores a 20% das respostas dos analitos nas amostras LIQ e 5% da resposta do PI.

### **2.5.1.3 Efeito matriz**

O efeito matriz é avaliado pelo fator de matriz normalizado por PI (FMN). Esse fator é determinado pela razão entre a resposta do analito normalizada por PI em matriz e a resposta do analito normalizada por PI em solução.

Devem ser analisadas amostras de matrizes biológicas processadas, posteriormente adicionadas de analito e PI, e soluções, nas mesmas concentrações das amostras de controle de qualidade de baixa concentração (CQB) e controle de qualidade de alta concentração (CQA). Além disso, quando a matriz biológica for plasma, devem ser analisadas 8 amostras de fontes distintas, sendo quatro normais, duas lipêmicas e duas hemolisadas.

O FMN deve ser calculado para cada amostra do estudo e o coeficiente de variação (CV) dos FMNs relativos a todas as amostras deve ser inferior a 15%. Caso o CV seja superior ao permitido devido ao resultado discrepante das amostras hemolisadas, novo CV dos FMNs sem estas amostras pode ser calculado e as amostras em estudo hemolisadas não poderão ser analisadas. Além disso, amostras em estudo com grau de hemólise superior ao grau de hemólise aprovado neste teste não poderão ser analisadas.

#### **2.5.1.4 Curva de calibração**

Para a curva de calibração, a qual deve ser construída e avaliada em triplicata, devem ser incluídas a análise da amostra branco (amostra sem adição do analito e PI), da amostra zero (amostra sem adição do analito e com adição do PI) e de, no mínimo, seis amostras de diferentes concentrações do padrão do analito adicionadas de PI. Entretanto, as amostras necessárias a este estudo devem ser preparadas utilizando a mesma matriz proposta para o estudo.

Na determinação da equação que representa a relação entre a resposta do instrumento e as concentrações conhecidas do analito, as amostras branco e zero não devem ser utilizadas e deve ser adotado, preferencialmente, o modelo matemático mais simples, geralmente o linear. Contudo, caso seja proposto um modelo não linear, deve ser demonstrado matematicamente que o modelo linear não é adequado e devem ser incluídas no mínimo oito amostras de diferentes concentrações na curva de calibração.

Após a elaboração da curva de calibração, caso a variância do erro não seja constante em toda a faixa de quantificação do método analítico, deve ser utilizada a ponderação que apresentar o menor valor para soma dos erros relativos dos valores nominais dos padrões de calibração versus seus valores obtidos pela equação da curva.

A equação da curva deve incluir padrões de calibração que atendam aos seguintes critérios de aprovação: desvio menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para os padrões do LIQ, desvio menor ou igual a 15% em relação à concentração nominal para os outros padrões de calibração, no mínimo 75% dos padrões de calibração devem ser aprovados conforme os dois critérios anteriores e no mínimo seis padrões de calibração de concentrações diferentes, incluindo o LIQ e o LSQ, devem ser aprovados. Quando um padrão de calibração não for aprovado, a curva de calibração deve ser recalculada sem este padrão, assim como quando um padrão de calibração atender aos critérios de aprovação, este não deve ser excluído da equação da curva.

### **2.5.1.5 Precisão**

A precisão deve ser determinada em uma mesma corrida (precisão intracorrída) e em, no mínimo, três corridas diferentes (precisão intercorridas). Contudo, em cada corrida devem ser realizadas no mínimo cinco replicatas em, pelo menos, cinco concentrações: LIQ, CQB, controle de qualidade de média concentração (CQM), CQA e controle de qualidade de diluição (CQD). Além disso, o ensaio de precisão intercorridas deve abranger corridas em dias distintos.

A precisão deve ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação, não se admitindo valores superiores a 15%, exceto para o LIQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20%.

No cálculo do DPR da precisão intracorrída e intercorrida devem ser utilizados todos os valores obtidos e caso não seja atendido os limites estabelecidos para o estudo, o ensaio deverá ser repetido.

### **2.5.1.6 Exatidão**

Assim como a precisão, a exatidão deve ser determinada em uma mesma corrida analítica (exatidão intracorrída) e em, no mínimo, três corridas diferentes (exatidão intercorridas). Em cada corrida devem ser realizadas no mínimo cinco replicatas em, pelo menos, cinco concentrações: LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD e o ensaio de exatidão intercorridas deve abranger corridas em dias distintos.

A exatidão é expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR), não se admitindo valores fora da faixa de  $\pm 15\%$  do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual não se admitem valores fora da faixa de  $\pm 20\%$ .

A exatidão intracorrída e intercorrida deve ser calculada com base em todos os valores obtidos e caso não se atenda aos limites anteriormente estabelecidos, o ensaio deverá ser repetido.

### **2.5.1.7 Estabilidade do analito em matriz biológica**

Deve ser demonstrada a estabilidade do analito na matriz biológica por meio dos seguintes estudos: estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, estabilidade de curta duração, estabilidade de longa duração e estabilidade pós-processamento de forma que as condições de realização dos estudos de estabilidade reproduzam as condições de armazenamento, preparo e análise das amostras em estudo.

Devem ser empregadas no mínimo três amostras de CQB e CQA, as quais devem ser analisadas imediatamente após sua preparação e após serem submetidas às condições de ensaio anteriormente citadas. Essas amostras devem ser adicionadas de soluções do analito, PI e o mesmo anticoagulante a ser usado nas amostras em estudo. Além do mais, as amostras podem ser empregadas apenas se o resultado da análise imediatamente após sua preparação estiver dentro de  $\pm 15\%$  do valor nominal.

A concentração das amostras deve ser determinada por meio de uma curva de calibração recém preparada e a estabilidade é demonstrada quando não se observar desvio superior a 15% da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal, entretanto, todas as concentrações obtidas devem ser incluídas no cálculo da média.

#### **2.5.1.7.1 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento**

As amostras devem ser congeladas à temperatura indicada para o armazenamento e mantidas por no mínimo 12 horas, sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas, as amostras devem ser novamente congeladas à temperatura indicada para o armazenamento por, no mínimo, mais 12 horas, e assim sucessivamente, quantificando-se o analito nas amostras após o último ciclo. O número de ciclos de congelamento e

descongelamento deve ser igual ou maior ao número de ciclos a que as amostras em estudo serão submetidas.

#### 2.5.1.7.2 Estabilidade de curta duração

As amostras do estudo de estabilidade de curta duração devem ser processadas e analisadas após permanecerem em temperatura ambiente, ou na temperatura de processamento estabelecida para o método bioanalítico, por tempo superior ao que as amostras em estudo serão mantidas nas mesmas condições durante o estudo.

#### 2.5.1.7.3 Estabilidade de longa duração

As amostras devem ser processadas e analisadas após serem armazenadas por período que exceda o intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra em estudo e a análise da última. Entretanto, a temperatura utilizada no estudo de estabilidade deve reproduzir a temperatura a que forem armazenadas as amostras em estudo.

#### 2.5.1.7.4 Estabilidade pós-processamento

As amostras devem ser processadas e mantidas sob as mesmas condições de análise das amostras em estudo por período superior ao intervalo de tempo compreendido entre o término de preparo das amostras e o final da corrida analítica mais longa. Caso seja realizado algum armazenamento além do autoinjeter, a estabilidade nessas condições também deve ser comprovada.

### **2.5.1.8 Estabilidade do analito e PI em solução**

Deve ser demonstrada a estabilidade do analito e do PI em, no mínimo, três amostras da solução primária de maior concentração e da solução de trabalho de menor concentração por tempo superior ao período de uso ou armazenamento das mesmas. Essas soluções devem ser analisadas após serem mantidas sob as mesmas condições a que serão submetidas as soluções durante seu uso e armazenamento.

A estabilidade das soluções primária e de trabalho deve ser analisada por meio de uma diluição apropriada levando-se em consideração a faixa de medição do detector.

A média das respostas instrumentais provenientes das soluções em estudo deve ser comparada com a média daquelas obtidas utilizando-se soluções recém preparadas do analito e do PI e as soluções serão consideradas estáveis quando não se observar desvio superior a 10% na comparação das respostas instrumentais. Contudo, para cálculo da média das respostas instrumentais, todas as respostas obtidas devem ser incluídas.

### **2.5.2 Aplicação do método validado**

O método aplicado à análise das amostras em estudo deve ser o mesmo método validado, incluindo a utilização do mesmo anticoagulante, técnica de extração e condições analíticas. Cada corrida analítica das amostras em estudo deve conter a curva de calibração, amostras de CQB, CQM e CQA e as amostras em estudo, todas elas processadas como um único lote.

O número de amostras de CQB, CQM e CQA a ser incorporado em cada corrida analítica não deve ser inferior a 5% do número de amostras em estudo e não deve ser inferior a seis, uma duplicata de cada concentração. Estas devem ser distribuídas entre as amostras em estudo de forma balanceada na corrida analítica.



Em caso de análise de amostras que excedem o LSQ do método, a reanálise das amostras diluídas deve ser realizada incluindo amostras de CQD na corrida.

Apenas as concentrações quantificadas entre o LIQ e o LSQ devem ser consideradas.

Para aprovação da corrida analítica, no mínimo 67% do total de CQs e no mínimo 50% dos CQs de cada concentração devem apresentar desvio menor ou igual a 15% em relação aos seus respectivos valores nominais.

Para aprovação da curva de calibração, os critérios definidos na **seção 2.5.1.4** devem ser atendidos e caso os padrões de calibração relativos ao LIQ ou LSQ forem reprovados, o LIQ ou LSQ para esta corrida analítica podem ser considerados os próximos padrões de calibração aprovados.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Desenvolvimento e validação de método para a determinação qualitativa e quantitativa de estatinas em plasma humano empregando preparo de amostras com colunas de meio de acesso restrito e cromatografia líquida de alta eficiência.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Preparo de uma coluna de meio de acesso restrito com albumina sérica bovina imobilizada em suporte octadecilsílica.
- Avaliação e comparação entre as eficiências de exclusão das proteínas do plasma humano das colunas RAM-BSA *homemade* e RAM-ADS comercial.
- Avaliação da retenção e assimetria dos picos de diferentes fármacos nas colunas RAM-BSA e RAM-ADS.
- Otimização das condições cromatográficas: composição e vazão da fase móvel, tempo de viragem da válvula, temperatura do forno e comprimento de onda de detecção na faixa do ultravioleta para a determinação de estatinas.
- Comparação dos modos *backflush* e *foreflush* do sistema de eluição bidimensional.
- Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para a determinação de estatinas em plasma humano empregando fases RAM e CLAE bidimensional.

## **CAPÍTULO 2**

### **DESENVOLVIMENTO DE COLUNA CROMATOGRÁFICA DE MEIO DE ACESSO RESTRITO PROTEÍNA-IMOBILIZADA E SUA AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO COM COLUNA COMERCIAL SÍLICA ALQUIL-DIOL**

## 1 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos analíticos foram realizados no Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos (LCQ) da Faculdade de Farmácia da UFMG.

O plasma humano utilizado foi fornecido pelo Laboratório de Bioequivalência do Centro de Estudos e Desenvolvimento Analítico Farmacêutico (CEDAFAR-BIO) da Faculdade de Farmácia da UFMG em parceria com o Instituto de Ciências Farmacêuticas (ICF), Goiânia, GO.

### 1.1 Materiais

#### 1.1.1 Substâncias químicas de referência (SQR)

- Cetoprofeno (USP Reference Standard), lote H0B216.
- Diclofenaco sódico (USP Reference Standard), lote G.
- Pravastatina sódica (USP Reference Standard), lote F11288.
- Bromazepam (PH. EUR. Reference Standard), lote 3A.
- Omeprazol (USP Reference Standard), lote H.
- Teofilina (USP Reference Standard), lote I.
- Mebendazol (USP Reference Standard), lote G.
- Propranolol (USP Reference Standard), lote G-2.
- Trimetoprima (USP Reference Standard), lote I.

#### 1.1.2 Reagentes e vidrarias

- Solventes e reagentes grau cromatográfico: acetonitrila e metanol J. T. Baker (Xalostoc, México).

- Solventes e reagentes grau analítico: ácido fórmico Labsynth (Diadema, Brasil), ácido orto-fosfórico Vetec (Duque de Caxias, Brasil), álcool etílico anidro Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha), borohidreto de sódio Vetec (Duque de Caxias, Brasil), fosfato de potássio bibásico Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha), fosfato de potássio monobásico Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) e hidróxido de potássio Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).
- Albumina sérica bovina fração V segundo Cohn (pureza mínima de 98%) Inlab (São Paulo, Brasil).
- Corante azul brilhante de Coomassie G-250 Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).
- Glutaraldeído 25% (v/v) Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).
- Água ultrapurificada em sistema Milli-Q Millipore Direct-Q3.
- Pipetas, buretas, provetas e balões volumétricos calibrados.
- Béqueres, tubos de ensaio e kit de filtração a vácuo.

### 1.1.3 **Equipamentos e materiais**

- Agitador automático Minishaker MS11KA Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).
- Aparelho de ultrassom Unique (Indaiatuba, Brasil) MaxiClean 1400.
- Balança analítica Shimadzu (Kyoto, Japão) AUW220D com precisão de 0,01 mg.
- Bomba de infusão Kd Scientific (Holliston, EUA).
- Centrífuga Jouan (Saint-Herblain, França) MR23.
- Coluna cromatográfica HPLC C18 (30 x 4,6 mm, 15  $\mu$ m) ACE (Aberdeen, Escócia).
- Coluna RAM-ADS Lichrocart 25-4 Lichrospher C18 ADS (25 x 4,0 mm, 25  $\mu$ m) Merck (Darmstadt, Alemanha).
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu (Kyoto, Japão), com controladora SCL-10A VP, duas bombas LC-10AD VP, forno CTO-10A VP,

injetor automático SIL-10AD VP e detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M10A VP.

- Espectrofotômetro de absorção no ultravioleta-visível Shimadzu (Kyoto, Japão) UV-1800.
- Filtros de membrana de celulose regenerada de 0,45 µm Millipore (Darmstadt, Alemanha).
- Freezer Revco (Garden Grove, EUA) com temperatura de -70°C.
- Micropipetas Brand (Wertheim, Alemanha) Transferpette 10-100 e 100-1000 µL.
- Potenciômetro Metrohm (São Paulo, Brasil) 827 pH Lab.
- Refrigerador GELOPAR (Araucária, Brasil) com temperatura de 2°C.
- Sistema de purificação de água Milli-Q Millipore (Darmstadt, Alemanha) Direct-Q3.
- Válvula de 6 vias e 2 posições VICI (Brockville, Canadá) Cheminert.

## 1.2 Métodos

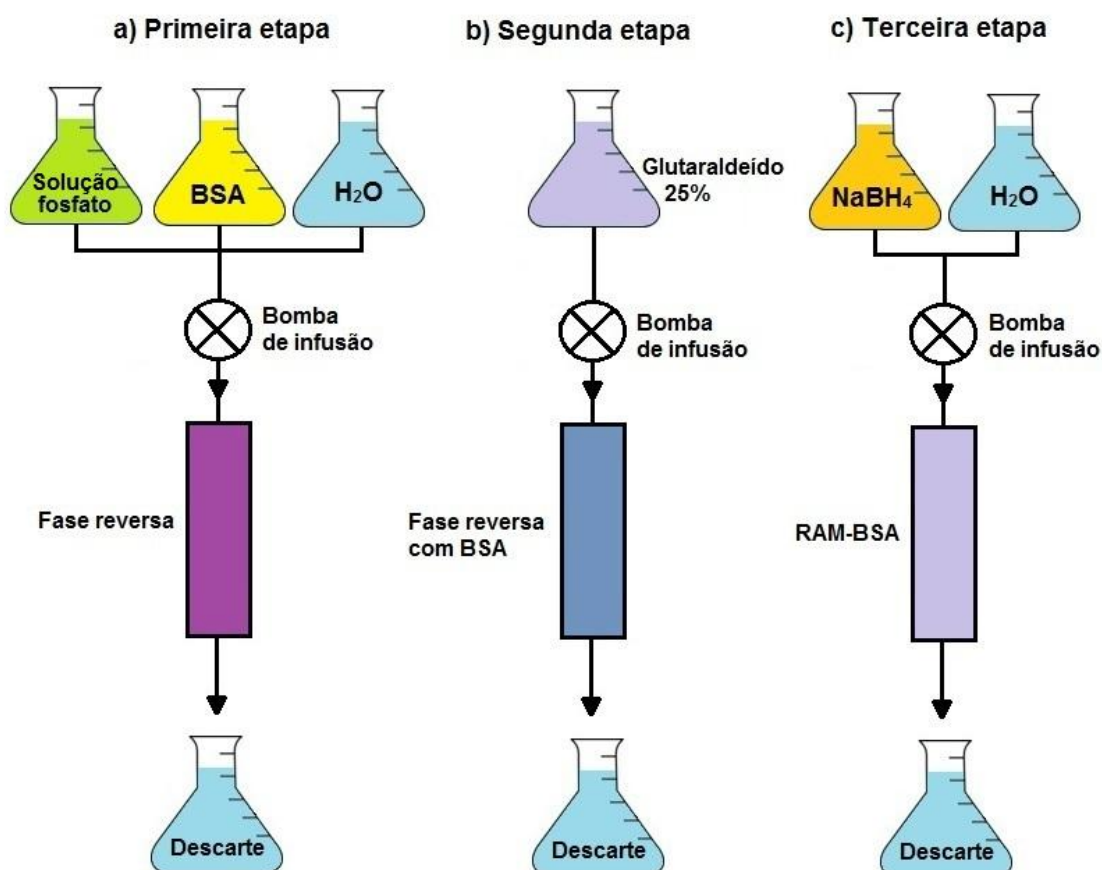
### 1.2.1 Preparo da coluna RAM-BSA – imobilização de BSA na fase hidrofóbica

A coluna RAM-BSA foi preparada imobilizando albumina sérica bovina em um suporte octadecilsilica (30 x 4,6 mm de dimensões e 15 µm de tamanho de partículas) adquirido comercialmente.

A imobilização das proteínas foi realizada segundo o procedimento estabelecido por MENEZES e FÉLIX<sup>57</sup>. Com o auxílio de uma bomba de infusão a 1,0 mLmin<sup>-1</sup> de vazão, o suporte foi eluído com solução fosfato de potássio 0,05 M (pH 6,0) durante 20 min, solução de albumina sérica bovina 1,0 mgmL<sup>-1</sup>, preparada na mesma solução fosfato, por 30 min, água deionizada por 2 min e com 15 mL de solução de glutaraldeído 25% (v/v). Após repouso de 6 h, a coluna foi percolada com solução de borohidreto de sódio 1,0 mgmL<sup>-1</sup> até o eluato apresentar pH 10. Após mais 2 h de repouso, o suporte foi lavado com água deionizada durante 1 h. A **Figura 17**

apresenta as etapas envolvidas no preparo da coluna RAM-BSA. A coluna RAM-BSA preparada foi mantida em água e armazenada em refrigerador a 2°C após o preparo e uso.

**Figura 17** – Esquema das etapas para o preparo da coluna RAM-BSA.



### **1.2.2 Avaliação e comparação da exclusão de proteínas do plasma humano pelas colunas RAM-BSA e RAM-ADS – método de Bradford**

A eficiência de exclusão de proteínas do plasma humano pelas colunas RAM-BSA *homemade* e RAM-ADS comercial foram avaliadas e comparadas. As proteínas excluídas pelos suportes foram quantificadas por meio do método espectrofotométrico de determinação de proteínas totais de BRADFORD<sup>58</sup>.

### **1.2.2.1 Preparo do reagente de Bradford**

O reagente de Bradford foi preparado na concentração de  $100 \text{ mgL}^{-1}$ . Em béquer, 50 mg do corante azul brilhante de Coomassie foram dissolvidos em 25 mL de etanol PA, em seguida, 50 mL de ácido fosfórico PA foram adicionados à mistura e a mesma foi transferida para balão volumétrico de 500 mL e o volume foi completado com água deionizada. O reagente de Bradford foi mantido em frasco de vidro âmbar em refrigerador a  $2^{\circ}\text{C}$  após o preparo e uso.

### **1.2.2.2 Obtenção das amostras excluídas das colunas RAM-BSA e RAM-ADS e preparo das soluções de plasma**

As amostras de proteínas excluídas pelas colunas RAM foram obtidas em sistema cromatográfico no modo unidimensional de eluição.

O plasma humano foi centrifugado a 5000 rpm durante 15 minutos ( $2711,15 \times g$ ) à temperatura ambiente. Após o condicionamento da coluna RAM-BSA com água a  $1,0 \text{ mLmin}^{-1}$  durante 10 min, 50  $\mu\text{L}$  de plasma foram injetados e eluídos com o mesmo solvente na mesma vazão. Duas frações de 2,0 mL do eluato foram coletadas em tubos de ensaio, a primeira nos dois primeiros minutos de eluição e a segunda entre os minutos 2 e 4. A coluna foi eluída com água até o tempo de 10 min. Em seguida, a coluna foi lavada com metanol a  $1,0 \text{ mLmin}^{-1}$  durante 10 min para remoção de compostos endógenos possivelmente retidos e recondicionada com água na mesma vazão por mais 10 min. O procedimento foi realizado em triplicata e repetido para os volumes de injeção de 100, 200 e 500  $\mu\text{L}$  de plasma humano. O mesmo procedimento foi realizado para a coluna RAM-ADS.

As soluções referência de plasma humano foram preparadas diluindo, em água, 50, 100, 200 e 500  $\mu\text{L}$  de plasma para volume final de 2,0 mL em tubo de ensaio.

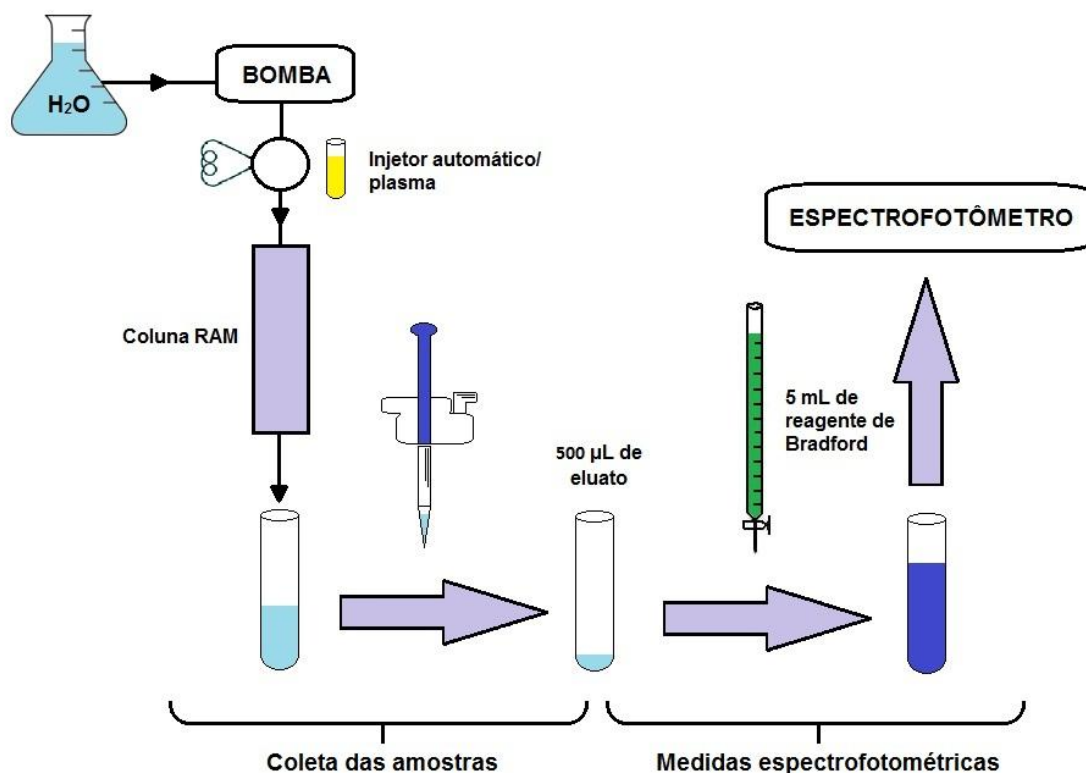


As amostras coletadas e as soluções de plasma preparadas foram mantidas à temperatura ambiente e processadas e analisadas, no máximo, três horas após obtenção.

### **1.2.2.3 Medidas espectrofotométricas das amostras excluídas e das soluções de plasma**

Após homogeneização em agitador automático, foram pipetados 500  $\mu$ L das amostras excluídas pelas colunas RAM para tubo de ensaio. Foram adicionados 5,0 mL do reagente de Bradford, homogeneizado e deixado em repouso por 3 min para formação do complexo corante-proteína. A solução branco foi preparada adicionando 500  $\mu$ L de água em 5,0 mL do reagente de Bradford (**Figura 18**). Em seguida, o equipamento foi zerado com a solução branco e alíquotas das amostras do primeiro volume excluído foram transferidas para cubetas de quartzo, suas medidas espectrométricas a 595 nm foram registradas. Este comprimento de onda foi utilizado por ser aquele em que ocorre absorção máxima do complexo formado. O mesmo procedimento foi realizado para as soluções de referência de plasma.

**Figura 18** – Esquema do procedimento realizado para avaliar a eficiência da exclusão de proteínas do plasma humano pelas colunas RAM-BSA e RAM-ADS.



Foram também registradas varreduras na região espectral de 190 a 800 nm de alíquotas das amostras do primeiro e segundo volumes excluídos e do reagente de Bradford, utilizando água deionizada como solução branco.

A eficiência de exclusão de proteínas do plasma foi calculada comparando as absorvâncias das amostras excluídas coletadas com as absorvâncias das soluções padrão preparadas admitindo que estas últimas representam a quantidade total (100%) de proteínas presentes no plasma humano.

As colunas RAM-BSA e RAM-ADS foram estatisticamente comparadas quanto ao poder de exclusão de proteínas do plasma humano utilizando o teste *t* de médias de *Student*. Esta comparação foi realizada para as eficiências obtidas entre os volumes de injeção de 50, 100, 200 e 500  $\mu L$  em ambas as colunas. Existem três requisitos para o emprego de testes paramétricos, como, por exemplo, o teste *t*: os resultados

experimentais devem ser mensurados em escalas intervalares; os dados devem ser normalmente distribuídos, isto é, devem seguir a distribuição normal e deve haver homogeneidade nas variâncias de cada situação experimental. Desse modo, a normalidade dos resíduos (estatística  $R_{e'q}$ ) foi calculada por meio do teste de *Ryan-Joiner* segundo as equações:

$$R_{e'q} = \frac{S_{e'q}}{\sqrt{S_{e'e'} \times S_{qq}}} \quad (1)$$

$$S_{e'q} = \sum_{i=1}^n e'_i q_i - \sum_{i=1}^n e'_i \sum_{i=1}^n q_i / n \quad (2)$$

$$S_{e'e'} = \sum_{i=1}^n e_i'^2 - \left( \sum_{i=1}^n e_i' \right)^2 / n \quad (3)$$

$$S_{qq} = \sum_{i=1}^n q_i^2 - \left( \sum_{i=1}^n q_i \right)^2 / n \quad (4)$$

$$e'_i = x - \bar{x} \quad (5)$$

$$q_i = \Phi^{-1} \left\{ \frac{(i - 3/8)}{(n + 1/4)} \right\}, i = 1, \dots, n \quad (6)$$

onde:

$R_{e'q}$  = estatística do teste de *Ryan-Joiner*;

$e'_i$  = resíduos ordenados;

$q_i$  = percentis da normal;

$n$  = número de dados experimentais;

$x$  = valor experimental;

$\bar{x}$  = média dos valores experimentais.

A homocedasticidade das variâncias foi avaliada por meio do teste  $F$  de *Snedecor* utilizando a seguinte equação:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (7)$$

onde:

$F$  = estatística do teste  $F$  de *Snedecor*;

$s_1^2$  = maior variância dos valores experimentais;

$s_2^2$  = menor variância dos valores experimentais.

Se  $s_1^2 = s_2^2$ , as médias foram comparadas pelo teste  $t$  segundo as equações:

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{S_p \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}} \quad (8)$$

$$S_p = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}} \quad (9)$$

onde:

$t$  = estatística do teste  $t$  de *Student*;

$\bar{x}_1$  = média do primeiro grupo de valores experimentais;

$\bar{x}_2$  = média do segundo grupo de valores experimentais;

$n_1$  = número de valores experimentais do primeiro grupo;

$n_2$  = número de valores experimentais do segundo grupo;

$s_1^2$  = variância do primeiro grupo de valores experimentais;

$s_2^2$  = variância do segundo grupo de valores experimentais.

E, se  $s_1^2 \neq s_2^2$ , as médias foram comparadas pelo teste  $t$  segundo as equações:

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2}} \quad (10)$$

$$v' = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{(s_1^2/n_1)^2}{n_1 + 1} + \frac{(s_2^2/n_2)^2}{n_2 + 1}} - 2 \quad (11)$$

onde:

$t$  = estatística do teste  $t$  de *Student*;

$\bar{x}_1$  = média do primeiro grupo de valores experimentais;

$\bar{x}_2$  = média do segundo grupo de valores experimentais;

$n_1$  = número de valores experimentais do primeiro grupo;

$n_2$  = número de valores experimentais do segundo grupo;

$s_1^2$  = variância do primeiro grupo de valores experimentais;

$s_2^2$  = variância do segundo grupo de valores experimentais.

$v'$  = graus de liberdade

### **1.2.3 Avaliação dos fatores de retenção e de assimetria de fármacos ácidos, neutros ou básicos nas colunas RAM-BSA e RAM-ADS**

Os fatores de retenção ( $k$ ) e de assimetria a 10 % ( $A_s$ ) dos picos cromatográficos de 9 fármacos com características ácida (cetoprofeno, diclofenaco e pravastatina), neutra (bromazepam, omeprazol e teofilina) ou básica (mebendazol, propranolol e trimetoprima) foram avaliados empregando-se fase móvel com os seguintes valores de pH: 2,5; 6,0; 6,5 e 7,0.

Soluções estoque dos fármacos foram preparadas na concentração de  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ; a partir destas, foram preparadas soluções de trabalho a  $20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . Cerca de 10,0 mg dos fármacos foram pesados em balão volumétrico de 10,0 mL. Foram adicionados, em aproximadamente 80% do volume do balão, solvente ou solução diluente representados na **Tabela 1**. Em seguida, as soluções foram levadas ao banho de ultrassom durante 10 min e o volume foi completado após contração volumétrica dos diluentes. Alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  das soluções estoque foram pipetadas para tubos de ensaio e 1,98 mL de fase móvel foi adicionada. As soluções de trabalho foram então homogeneizadas em agitador automático e 20  $\mu\text{L}$  foram injetados no sistema cromatográfico no modo unidimensional de eluição.

**Tabela 1** – Condições para análise de fármacos avaliados nas fases RAM-BSA e RAM-ADS.

Compostos	Diluyente	$\lambda$ (nm)
<b>Ácidos</b>		
cetoprofeno	etanol	255
diclofenaco	metanol	275
pravastatina	metanol	237
<b>Neutros</b>		
bromazepam	metanol	230
omeprazol	ACN:solução fosfato 0,1 M pH 7,0 (40:60)	302
teofilina	etanol	290
<b>Básicos</b>		
mebendazol	ácido fórmico	312
propranolol	metanol	290
trimetoprima	ACN:água (50:50)	285

O fator de retenção dos fármacos foi calculado como descrito a seguir:

$$k = \frac{(t_R - t_0)}{t_0} \quad (12)$$

onde:

$k$  = fator de retenção;

$t_R$  = tempo de retenção do fármaco;

$t_0$  = tempo morto da corrida.

O tempo morto foi medido utilizando acetonitrila como substância não retida na fase estacionária. O fator de assimetria foi calculado a 10% do pico cromatográfico de acordo com a equação:

$$As = \frac{w_{0,10}}{2f} \quad (13)$$

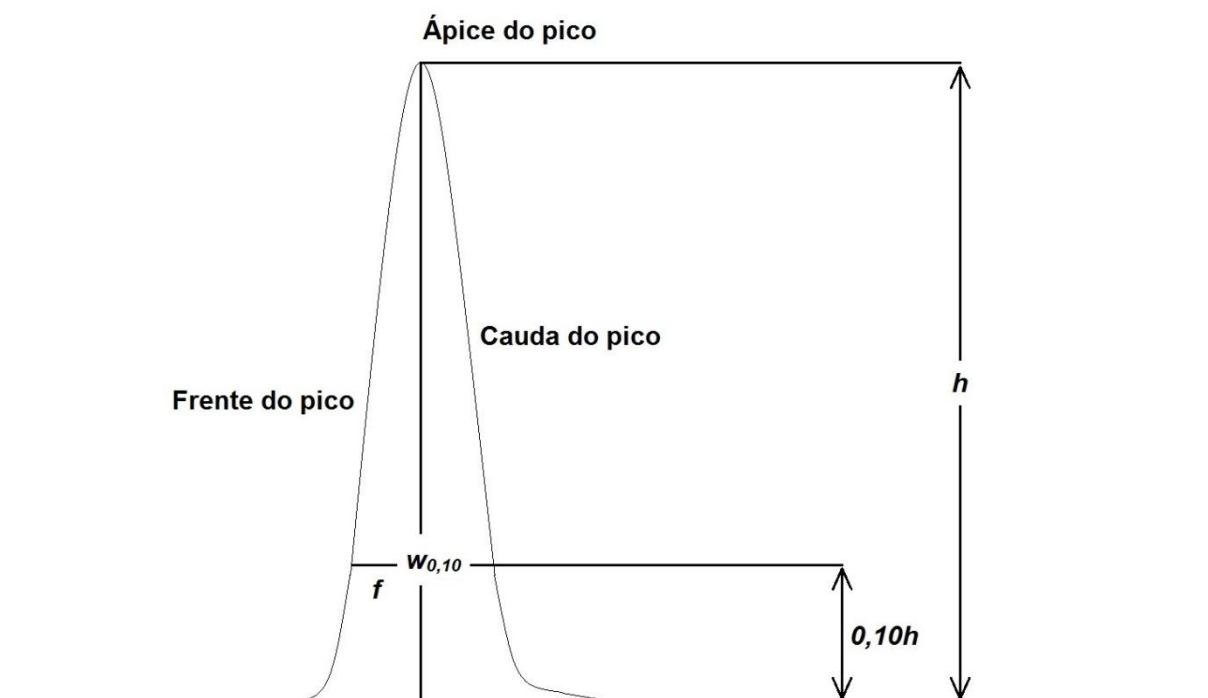
onde:

$As$  = fator de assimetria;

$w_{0,10}$  = largura do pico medida a 10% de sua altura;

$f$  = fração anterior da largura do pico medida a 10% de sua altura (**Figura 19**).

**Figura 19** – Cromatograma representando a assimetria ( $As$ ) do pico.





As condições cromatográficas foram: fase móvel composta de acetonitrila:solução fosfato de potássio 0,1 M pH 2,5; 6,0; 6,5 e 7,0 (40:60); vazão de 1,0 mLmin<sup>-1</sup>; temperatura do forno de 35°C e comprimento de onda de detecção no UV de acordo com a **Tabela 1**.

## 2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

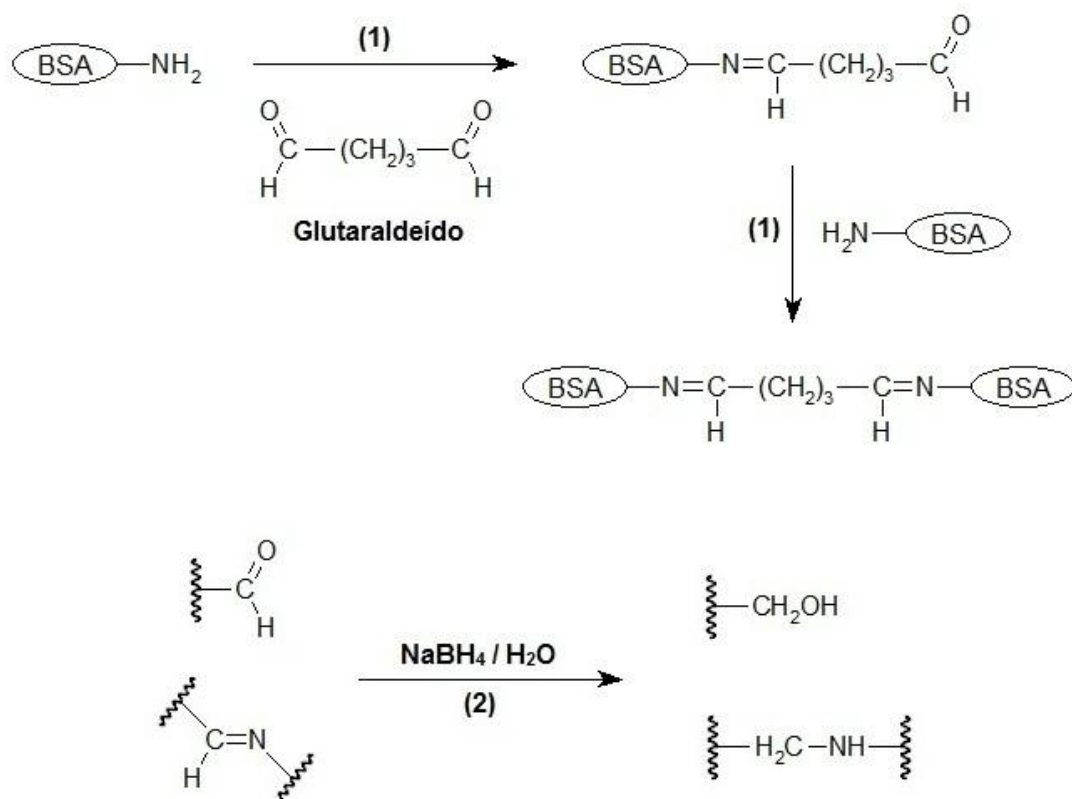
### 2.1 Preparo da coluna RAM-BSA – imobilização de BSA na fase hidrofóbica

Colunas RAM vêm sendo amplamente utilizadas para o preparo de amostras em análises de compostos endógenos e xenobióticos em diversas matrizes biológicas tais como plasma<sup>59-61</sup>, soro<sup>61-63</sup>, urina<sup>64</sup>, saliva<sup>65</sup>, tecidos biológicos<sup>66</sup>, leite<sup>67</sup> e ovos<sup>68</sup>.

O plasma humano é composto por diferentes tipos de proteínas, dentre as quais, destaca-se a albumina sérica humana (HSA), a qual representa aproximadamente 50% da massa correspondente às proteínas plasmáticas.<sup>69</sup> A HSA possui  $pI$  entre 4,0 e 5,8<sup>69</sup>, portanto, nesta faixa de pH, sua molécula apresenta-se eletricamente neutra. Contudo, em ambientes químicos cujo pH exceda esta faixa, como por exemplo a água, a albumina encontra-se negativamente carregada, possibilitando assim a repulsão eletrostática pelas moléculas de BSA, também aniônicas em água, imobilizadas no suporte RAM-BSA. Diante deste comportamento físico-químico da albumina e devido à fácil disponibilidade comercial e baixo custo da BSA, coluna RAM proteína-imobilizada foi preparada e utilizada como fase extratora para o preparo de amostra biológica *on-line* em cromatografia de fase reversa.

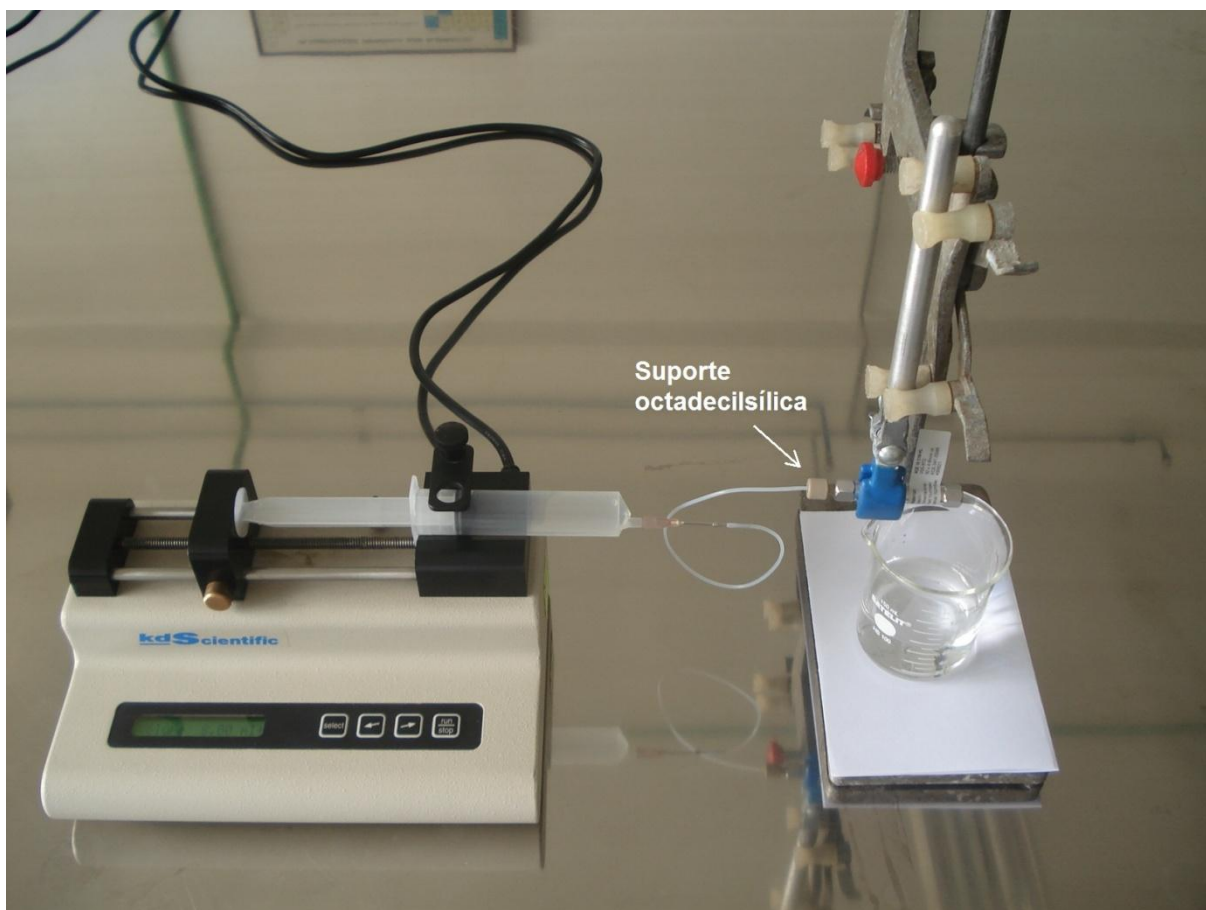
A coluna RAM-BSA foi preparada por meio da imobilização de BSA a  $1,0 \text{ mgmL}^{-1}$  na fase hidrofóbica. Com o intuito de amenizar perdas das proteínas com o uso da fase RAM, o suporte foi tratado com glutaraldeído a 25% (v/v) promovendo a formação de ligações inter cruzadas deste composto com aminas livres das proteínas. Para evitar possível hidrólise das duplas ligações das bases *Schiff* formadas e que aldeídos residuais interajam com compostos a serem analisados utilizando a coluna, as mesmas foram reduzidas com borohidreto de sódio a  $1,0 \text{ mgmL}^{-1}$ . A **Figura 20** representa as reações envolvidas no preparo da RAM-BSA.

**Figura 20** – Esquema de reações para a estabilização da BSA imobilizada: (1) formação das bases de Schiff entre a BSA e o glutaraldeído; (2) redução das bases de Schiff e dos grupos aldeídos residuais.<sup>70</sup>



A **Figura 21** ilustra o sistema montado utilizando bomba de infusão para a percolação das soluções durante o preparo da coluna RAM.

**Figura 21** – Fotografia do sistema montado para a percolação das soluções durante o preparo da coluna RAM-BSA.



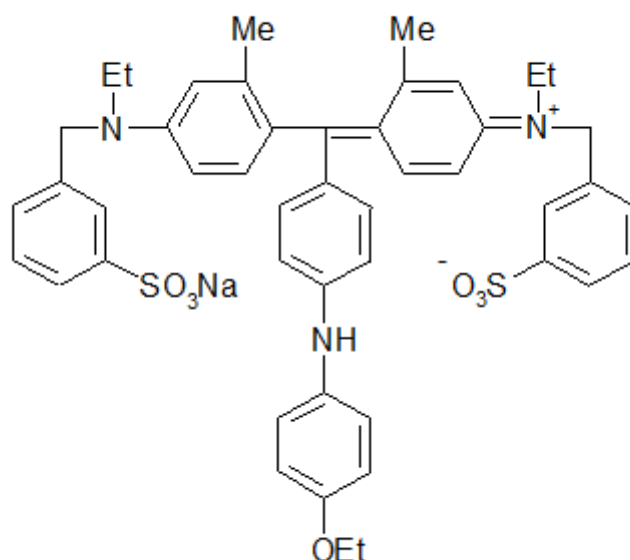
## 2.2 Avaliação e comparação da exclusão de proteínas do plasma humano pelas colunas RAM-BSA e RAM-ADS

Muitos métodos espectrofotométricos para a determinação de proteínas totais foram propostos ao longo dos anos, porém não há um método universal empregado para tal finalidade. Os métodos mais comumente utilizados em estudos de bioquímica clínica são o do biureto, de Lowry e de Bradford. O método de Bradford é um método simples, rápido e sensível e vem sendo utilizado para a quantificação de

proteínas totais em diversos meios: plasma, soro, urina, saliva, leite e outros. Este método tem como princípio a interação entre o corante azul brilhante de Coomassie G-250, cuja estrutura química está apresentada na **Figura 22**, e aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas de macromoléculas de proteínas.<sup>71</sup> Tal interação promove o deslocamento da absorção espectrofotométrica do corante de 400 e 640 para 595 nm.<sup>72</sup>

O método de Bradford foi então selecionado para avaliar e comparar o desempenho da exclusão de proteínas do plasma humano pelas colunas RAM-BSA *homemade* e RAM-ADS comercial.

**Figura 22** – Estrutura do corante azul brilhante de Coomassie G-250.



O plasma humano foi então centrifugado para evitar que proteínas precipitadas pudessem obstruir o sistema cromatográfico uma vez que foram feitas injeções das amostras na sua forma integral.

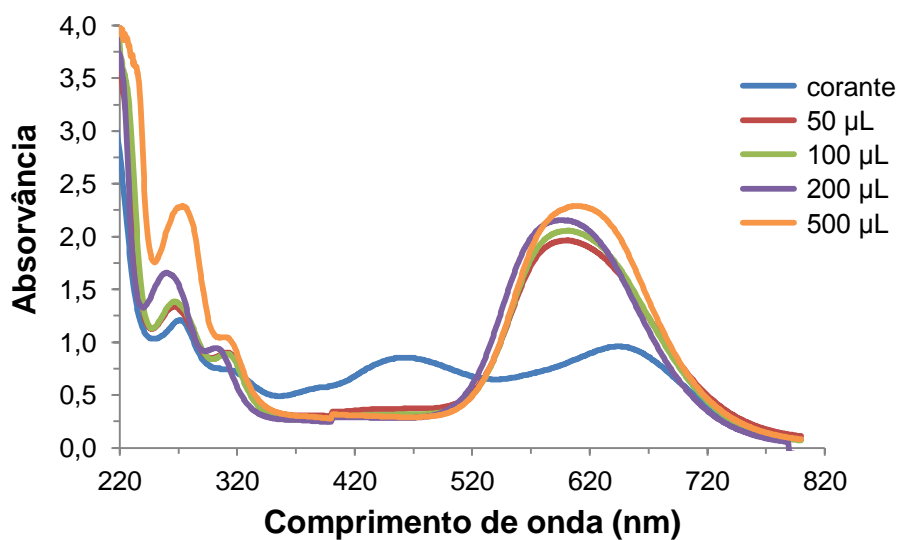
Foram injetados no modo unidimensional de eluição amostras de 50, 100, 200 e 500  $\mu$ L de plasma centrifugado utilizando água deionizada como fase móvel. Após cada

injeção, duas frações de 2,0 mL do eluato excluído pelas colunas RAM foram coletadas, a primeira fração entre os minutos 0 e 2 e a segunda fração entre os minutos 2 e 4 da corrida cromatográfica. Para avaliar a eficiência da exclusão de proteínas obtida, alíquotas de cada fração coletada foram analisadas espectrofotometricamente após complexação com o reagente de Bradford, conforme o procedimento esquematizado na **Figura 18**.

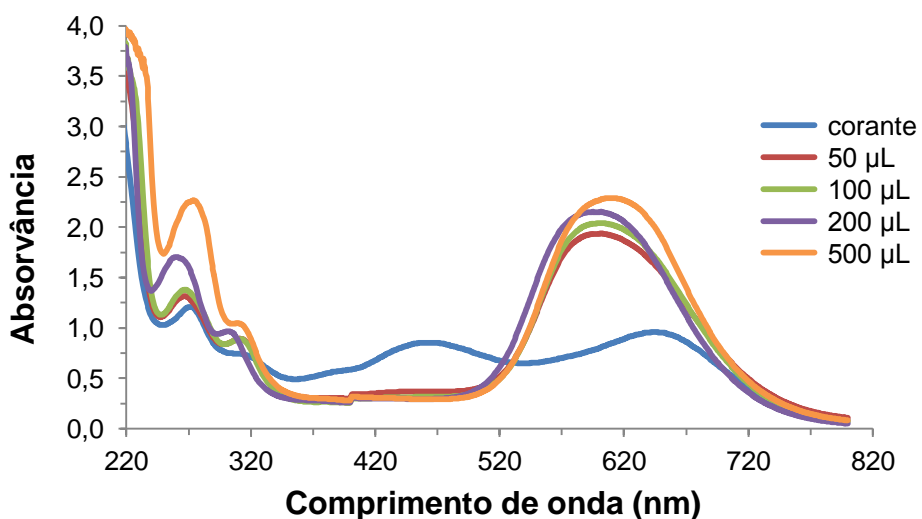
As eficiências da exclusão em cada coluna RAM e em cada volume de injeção foram calculadas comparando as absorvâncias das frações coletadas de 0 a 2 min em relação às absorvâncias das soluções padrão preparadas, considerando que estas últimas fornecem a quantidade total de proteínas do plasma humano (100%) uma vez que foram obtidas sem passarem pelas colunas extratoras.

As **figuras 23 e 24** representam os espectros de absorvância das frações eluídas no tempo de 0-2 minutos nas colunas RAM-BSA e RAM-ADS, respectivamente. Como podem ser observados, os espectros de absorção do corante apresentam dois picos bem definidos com máximos de absorção em aproximadamente 450 e 640 nm, correspondentes às suas formas catiônica e neutra, respectivamente. Após a formação do complexo corante-proteína, estas bandas desaparecem e há um aumento significativo da absorvância na região de 595 nm. Isso ocorre devido ao deslocamento do equilíbrio do corante para sua forma aniônica, a qual absorve fortemente em 595 nm, como consequência da interação do corante com as proteínas do plasma<sup>73</sup>. Os espectros obtidos para a coluna RAM-BSA apresentam similaridade se comparados aos espectros obtidos para a RAM-ADS, o que sugere, qualitativamente, que as eficiências de exclusão entre estas colunas são semelhantes. Isto pode ser confirmado após os cálculos das porcentagens de exclusão de proteínas pelas colunas extratoras.

**Figura 23** – Espectros de absorção do corante azul brilhante e do complexo corante-proteína da primeira fração coletada (0-2 min) após eluição do plasma humano na coluna RAM-BSA. Volumes de plasma injetado: 50, 100, 200 e 500  $\mu\text{L}$ . Fase móvel: água e vazão:  $1,0 \text{ mLmin}^{-1}$ .

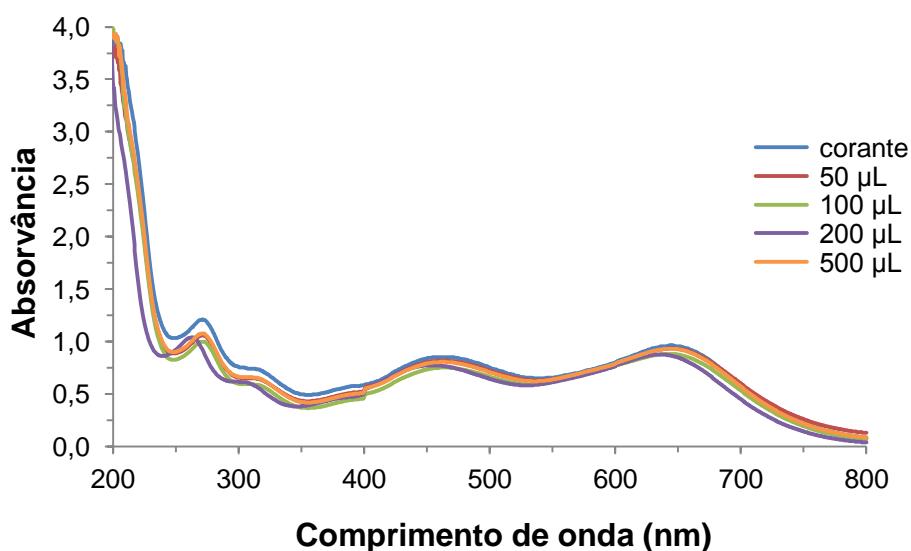


**Figura 24** – Espectros de absorção do corante azul brilhante e do complexo corante-proteína da primeira fração coletada (0-2 min) após eluição do plasma humano na coluna RAM-ADS. Volumes de plasma injetado: 50, 100, 200 e 500  $\mu\text{L}$ . Fase móvel: água e vazão:  $1,0 \text{ mLmin}^{-1}$ .



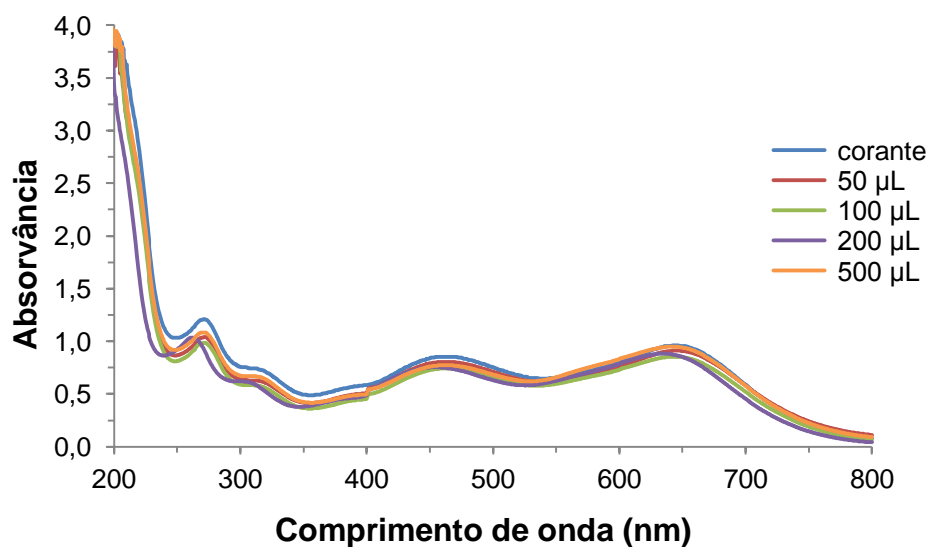
Os espectros de absorvância referentes às frações coletadas entre os minutos 2 e 4 da análise (**figuras 25 e 26**), para todos os volumes de injeção e ambas as colunas, foram similares ao espectro do próprio corante, indicando a ausência quase que total de proteínas nestas frações. Isto confirma o bom desempenho de exclusão das proteínas pelas fases extratoras no tempo de 0 a 2 minutos.

**Figura 25** – Espectros de absorção do corante azul brilhante e do complexo corante-proteína da segunda fração coletada (2-4 min) após eluição do plasma humano na coluna RAM-BSA. Volumes de plasma injetado: 50, 100, 200 e 500  $\mu\text{L}$ . Fase móvel: água e vazão:  $1,0 \text{ mLmin}^{-1}$ .



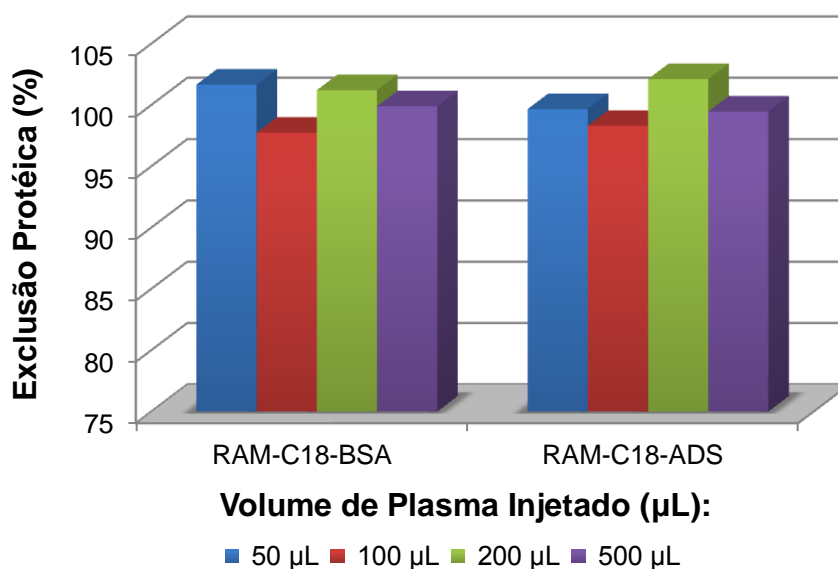


**Figura 26** – Espectros de absorção do corante azul brilhante e do complexo corante-proteína da segunda fração coletada (2-4 min) após eluição do plasma humano na coluna RAM-ADS. Volumes de plasma injetado: 50, 100, 200 e 500  $\mu\text{L}$ . Fase móvel: água e vazão:  $1,0 \text{ mLmin}^{-1}$ .



A **Figura 27** mostra um gráfico comparativo entre as colunas extratoras RAM-BSA e RAM-ADS, quanto à porcentagem de exclusão de proteínas do plasma humano para os volumes de injeção de 50, 100, 200 e 500  $\mu\text{L}$  do fluido biológico.

**Figura 27** – Porcentagem de proteínas do plasma humano excluídas em 2 min pelas colunas RAM-BSA e RAM-ADS. Fase móvel: água e vazão: 1,0 mLmin<sup>-1</sup>.



Os resultados percentuais obtidos mostram que as duas colunas RAM apresentaram adequada eficiência de exclusão de proteínas do plasma (**Tabela 2**), utilizando água como fase móvel.

**Tabela 2** – Porcentagem de proteínas do plasma humano excluídas em 2 min pelas colunas RAM-BSA e RAM-ADS e respectivos coeficientes de variação das injeções. Método de Bradford.

Coluna	Volume de plasma humano injetado (n=3)							
	50 µL		100 µL		200 µL		500 µL	
	Média	CV	Média	CV	Média	CV	Média	CV
RAM-BSA	101,7	0,48	97,7	1,17	101,2	0,28	99,9	0,32
RAM-ADS	99,7	0,33	98,3	0,63	102,1	0,54	99,5	0,75

A eficiência de exclusão entre as colunas RAM-BSA e RAM-ADS foi, então, estatisticamente comparada nos quatro volumes de injeção avaliados. Tal comparação foi realizada por meio de testes estatísticos paramétricos, os quais devem ser empregados se comprovadas a normalidade dos dados obtidos e a

igualdade entre as variâncias para cada situação experimental. Assim sendo, primeiramente foi verificado se as porcentagens de exclusão obtidas para cada volume de injeção e para cada coluna RAM seguem a distribuição normal, utilizando o teste de normalidade de *Ryan-Joyner*. Em seguida, foi observado se houve diferença entre as variâncias obtidas em uma coluna e outra para um mesmo volume de injeção, utilizando o teste *F* de *Snedecor*. E, finalmente, as médias de exclusão foram comparadas empregando o teste *t* de *Student*. O teste de médias também foi aplicado a cada nível (volume de injeção) avaliado. As estatísticas calculadas estão representadas nas **tabelas 3 e 4**.

**Tabela 3** – Estatística  $R_{eq}$  do teste de normalidade de *Ryan-Joyner* para as porcentagens de exclusão obtidas nas colunas RAM-BSA e RAM-ADS.

Coluna	Volume de plasma humano injetado (n=3)			
	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L	200 $\mu$ L	500 $\mu$ L
RAM-BSA	0,908	0,948	0,949	0,902
RAM-ADS	0,997	0,926	0,978	0,956

**Tabela 4** – Estatísticas *F* de *Snedecor* e *t* de *Student* para a comparação da eficiência de exclusão entre as colunas RAM-BSA e RAM-ADS.

Estatística	Volume de plasma humano injetado (n=3)			
	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L	200 $\mu$ L	500 $\mu$ L
<i>F</i>	2,2	3,4	3,8	5,5
<i>t</i>	5,866	0,744	2,491	0,930

A média de exclusão, considerando os quatro volumes de injeção avaliados, nos primeiros 2 minutos de análise, foi de 100,1% para coluna RAM-BSA preparada e de 99,9% para a coluna RAM-ADS comercial.

As triplicatas de porcentagens de exclusão obtidas para todos os volumes de injeção de plasma e para ambas as colunas seguem a distribuição normal de acordo com o teste de *Ryan-Joiner* a 95% de confiança. Se a estatística  $R_{eq}$  calculada for maior ou

igual ao  $R$  crítico tabelado (0,878 para  $\alpha=0,05$ ), não há evidências de rejeição da hipótese nula de normalidade dos resíduos e os mesmos seguem a distribuição normal.

Não houve diferença estatística entre a variância das porcentagens de exclusão da coluna RAM-BSA e a variâncias das porcentagens da coluna RAM-ADS para nenhum dos volumes de injeção avaliados segundo o teste  $F$  de *Snedecor* a 95% de confiança. Quando a estatística  $F$  calculada é menor ou igual ao  $F$  crítico tabelado (19,0 para  $\alpha=0,05$ ,  $n_1=n_2=3$ ) não há evidências de rejeição da hipótese nula de homocedasticidade, ou seja, as variâncias dos resultados de exclusão para um mesmo volume de injeção de plasma são iguais para as duas colunas RAM.

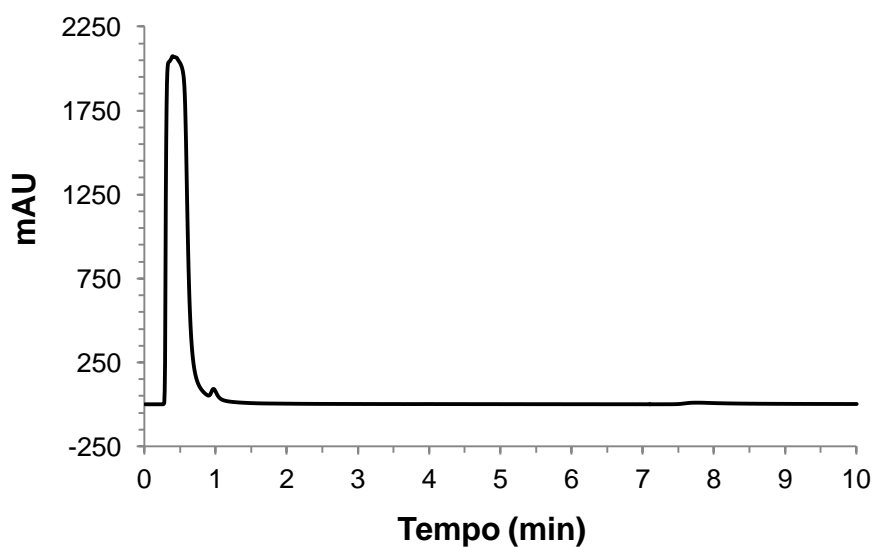
As médias de exclusão obtidas para os volumes de injeção de 100, 200 e 500  $\mu\text{L}$  são estatisticamente semelhantes de acordo com o teste  $t$  de *Student* a 95% de confiança. Uma vez que a estatística  $t$  calculada é menor ou igual ao  $t$  crítico tabelado (2,776 para  $\alpha=0,05$ ,  $n_1=n_2=3$ ) há evidências de não rejeição da hipótese nula de igualdade de médias. Nesse caso, pode-se afirmar que as colunas RAM-BSA e RAM-ADS possuem eficiência de exclusão de proteínas semelhante para estes volumes de injeção. Contudo, há diferença estatística na exclusão de proteínas pelas colunas RAM *homemade* e comercial para o volume de injeção de 50  $\mu\text{L}$ . Entretanto, ainda que exista tal diferença, ambas as colunas extratoras demonstraram, para este nível, adequada eficiência de exclusão (média de 100,7%) para o propósito ao qual são empregadas.

É importante ressaltar que, apesar de ambas as colunas apresentarem eficiência de exclusão de proteínas satisfatória, resquícios de proteínas e gorduras presentes no plasma podem ficar adsorvidos na fase estacionária e/ou nos filtros metálicos porosos (*frit*) presentes na entrada e na saída das colunas cromatográficas, como reportado por YU<sup>74</sup> *et al.* Portanto, após um determinado número de injeções de fluidos biológicos, há a necessidade de limpeza ou até mesmo substituição do *frit* das colunas para amenizar problemas de elevação da pressão do sistema cromatográfico.

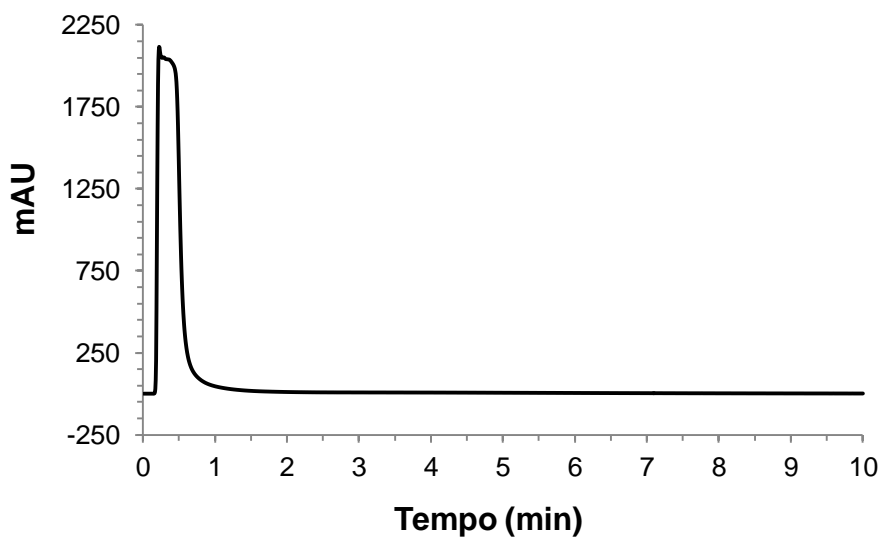
As **figuras 28 e 29** mostram os perfis cromatográficos das exclusões de proteínas pelas colunas RAM-BSA e RAM-ADS, respectivamente. Os cromatogramas foram obtidos monitorando espectrofotometricamente o fluxo cromatográfico após

passarem pelas colunas extratoras. Foram então injetados 100  $\mu\text{L}$  de plasma humano utilizando água como fase móvel na vazão de 1,0  $\text{mLmin}^{-1}$ . Os cromatogramas foram obtidos em 280 nm, comprimento de onda relativo ao máximo de absorção das proteínas plasmáticas.

**Figura 28** – Cromatograma do plasma humano na coluna RAM-BSA. Condições cromatográficas: Fase móvel: água, vazão: 1,0  $\text{mLmin}^{-1}$ , volume de injeção: 100  $\mu\text{L}$  e  $\lambda$ : 280 nm.



**Figura 29** – Cromatograma do plasma humano na coluna RAM-ADS. Condições cromatográficas: Fase móvel: água, vazão: 1,0  $\text{mLmin}^{-1}$ , volume de injeção: 100  $\mu\text{L}$  e  $\lambda$ : 280 nm.



De maneira análoga, foram obtidos os cromatogramas para os volumes de injeção de 50, 200 e 500  $\mu\text{L}$  do fluido biológico. Os picos cromatográficos foram então integrados e as porcentagens de exclusão de proteínas foram calculadas de acordo com um segundo método. Neste, a área sob o pico relativo às proteínas plasmáticas excluídas, integrado em toda a sua extensão, representa 100% de exclusão e a área sob o mesmo pico integrado até o tempo de 2 minutos da corrida cromatográfica representa a porcentagem de proteínas excluídas durante este intervalo de tempo. A **Tabela 5** apresenta os resultados obtidos para a exclusão de proteínas pelas colunas RAM e eles confirmam o alto desempenho quanto à exclusão destas macromoléculas avaliado pelo método de Bradford.

**Tabela 5** – Porcentagem de proteínas do plasma humano excluídas em 2 min pelas colunas RAM-BSA e RAM-ADS. Cálculo pela área sob a curva do pico relativa.

Coluna	Volume de plasma humano injetado			
	50 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$
RAM-BSA	99,8	99,6	99,3	96,9
RAM-ADS	98,8	97,8	97,3	95,6

A exclusão de proteínas do plasma humano obtida para a fase proteína-imobilizada, assim como para a fase sílica alquil-diol, permite inferir que elas são suficientemente hidrofílicas para excluir as macromoléculas nas condições cromatográficas utilizadas. Como já descrito acima, tanto a BSA imobilizada no suporte extrator quanto a HSA e demais proteínas presentes nas amostras injetadas são negativamente ionizadas e conseqüentemente há a repulsão eletrostática e exclusão das proteínas plasmáticas. O mecanismo de exclusão da RAM-ADS é baseado no princípio de afinidade química, uma vez que este tipo de material apresenta na superfície de suas partículas grupamentos hidrofílicos alquil-diol, o que leva à exclusão das proteínas do plasma humano.

Concluindo-se, pode-se afirmar que as colunas RAM-BSA *homemade* e RAM-ADS comercial apresentaram desempenho satisfatório como colunas de exclusão para o

preparo de amostras em métodos analíticos empregando CLAE com injeção direta da matriz biológica.

### **2.3 Avaliação dos fatores de retenção e de assimetria de fármacos ácidos, neutros ou básicos nas colunas RAM-BSA e RAM-ADS**

No modo reverso de eluição cromatográfica, a fase estacionária possui grupamentos químicos apolares e, em contrapartida, a fase móvel é relativamente mais polar. Portanto, quanto maior a hidrofobicidade de um composto, maior será sua afinidade pela fase estacionária e, conseqüentemente, maior será seu fator de retenção.

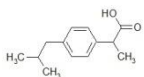
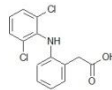
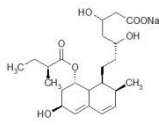
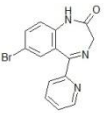
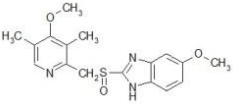
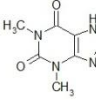
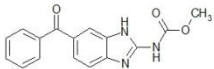
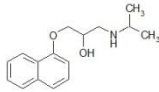
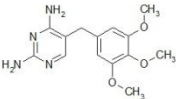
Quando um composto ácido ou básico se ioniza, a polaridade de sua molécula é substancialmente aumentada e seu valor de  $k$  reduzido. Assim sendo, as moléculas de um fármaco ácido eluídas em uma fase móvel com pH abaixo do seu  $pK_a$  se encontrarão majoritariamente em sua forma molecular e maior será sua retenção na fase estacionária reversa. E em fase móvel de alto pH este fármaco sofrerá ionização molecular, apresentando um comportamento mais hidrofílico com maior afinidade pela fase móvel e menor retenção cromatográfica. Para compostos básicos o raciocínio inverso é válido, quanto maior o pH da fase móvel maior será seu fator de retenção e em ambientes ácidos, o fator de retenção será reduzido. Para compostos neutros não ocorre variação significativa de  $k$  em função do pH da fase móvel.

Foi comprovado anteriormente que as colunas RAM-BSA *homemade* e RAM-ADS comercial apresentaram desempenho satisfatório para a exclusão de grandes moléculas proteicas. Contudo, ao mesmo passo que macromoléculas da matriz biológica são excluídas, as colunas RAM devem ser capazes de reter micromoléculas adequadamente e sem que ocorra a deformação das bandas cromatográficas.

Para avaliar então a capacidade de retenção e o comportamento de fármacos nas colunas RAM-C18-BSA (30 x 4,6 mm, 15  $\mu$ m) *homemade* e RAM-C18-ADS (25 x 4,0 mm, 25  $\mu$ m) comercial, foram determinados o fator de retenção e o fator de

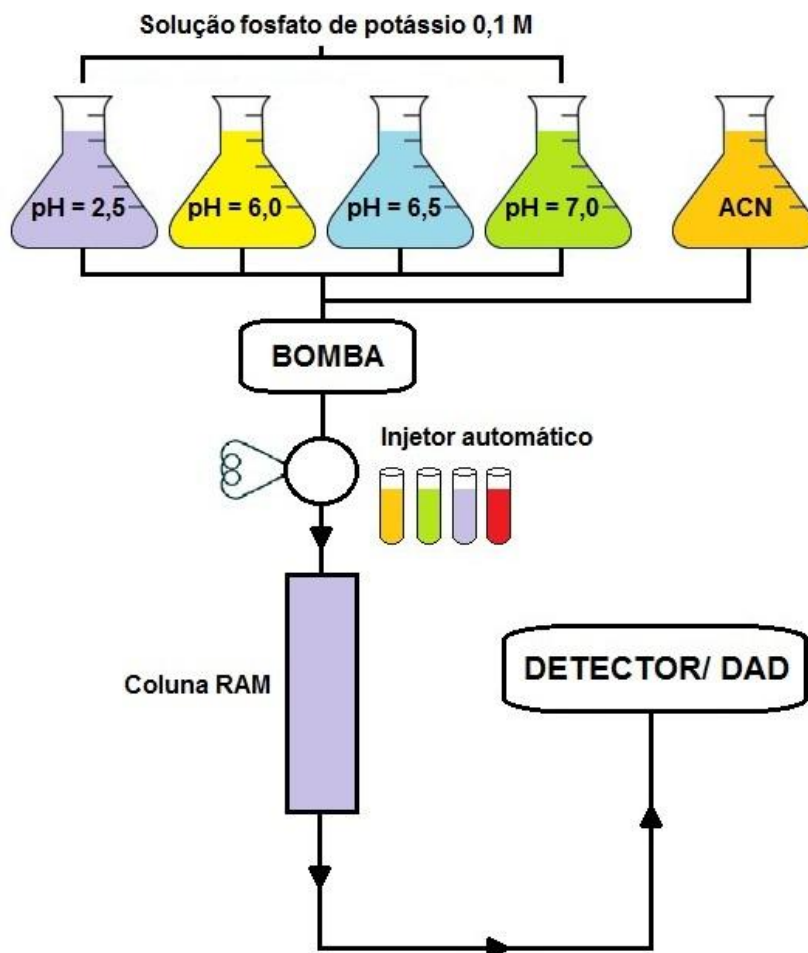
assimetria de bandas cromatográficas de 9 compostos ácidos, neutros e básicos a  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabela 6) empregando fase móvel com pH 2,5; 6,0; 6,5 e 7,0 no modo unidimensional de eluição cromatográfica, como esquematizado na Figura 30.

**Tabela 6** – Fármacos avaliados nas fases RAM-BSA e RAM-ADS.

Compostos	Estrutura química	Categoria terapêutica
<b>Ácidos</b>		
cetoprofeno		Anti-inflamatório não esteroidal
diclofenaco		Anti-inflamatório não esteroidal
pravastatina		Antilipêmico
<b>Neutros</b>		
bromazepam		Ansiolítico
omeprazol		Supressor da secreção de HCl gástrico
teofilina		Antiasmático
<b>Básicos</b>		
mebendazol		Anti-helmíntico
propranolol		Anti-hipertensivo
trimetoprima		Antibiótico

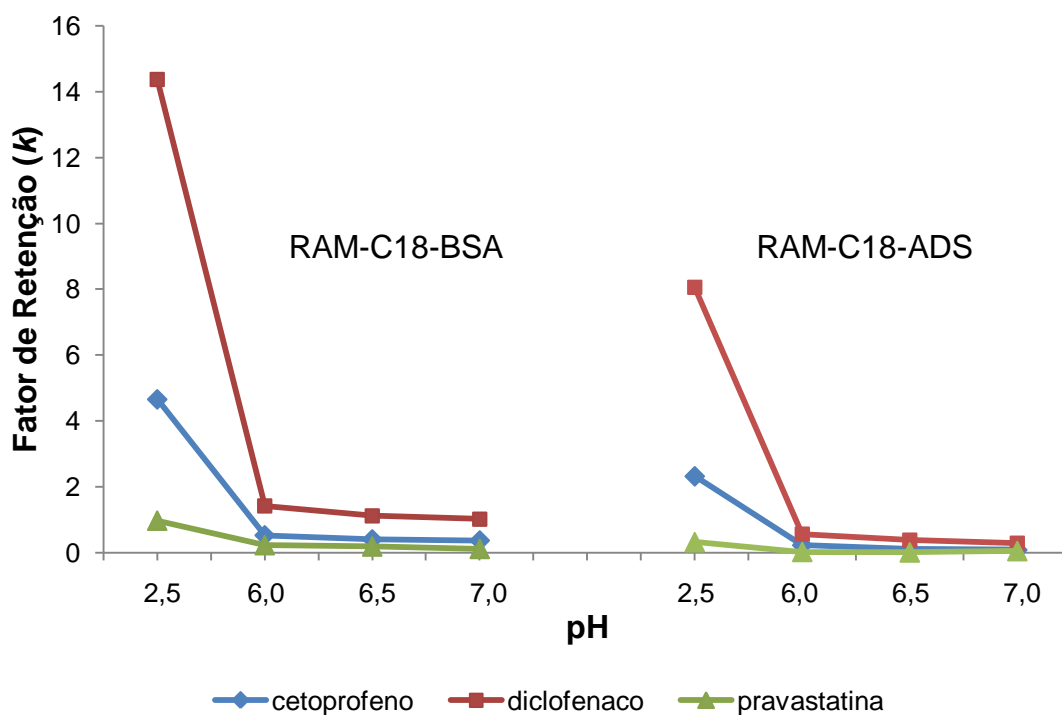


**Figura 30** – Esquema do procedimento realizado para avaliar a retenção e assimetria de fármacos ácidos, neutros e básicos nas colunas RAM-BSA e RAM-ADS.

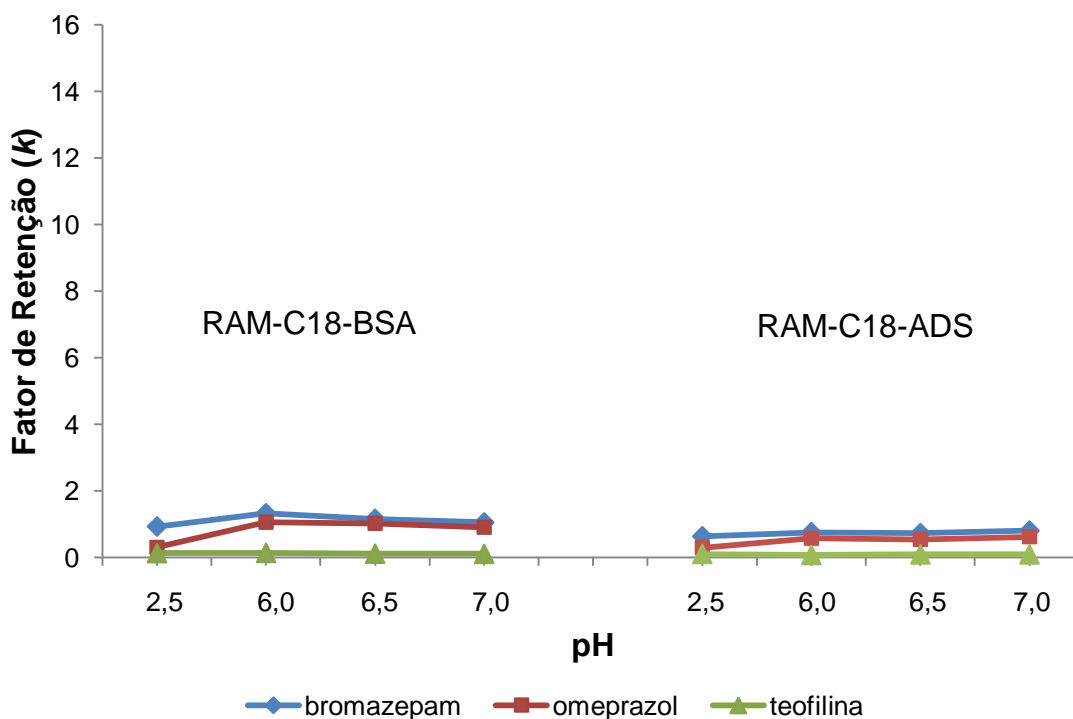


O uso de fases móveis com pH próximo ao ponto isoelétrico da albumina leva a uma perda na eficiência de exclusão da fase extratora e à precipitação das proteínas plasmáticas no sistema cromatográfico. Portanto, não é recomendável o uso de eluentes com pH compreendidos entre 3 e 5 em métodos analíticos que empregam a injeção direta de amostra em colunas RAM.<sup>73,75</sup> As **figuras 31, 32 e 33** mostram a influência do pH da fase móvel no fator de retenção dos fármacos ácidos, neutros e básicos, respectivamente, avaliados nas colunas RAM-BSA e RAM-ADS.

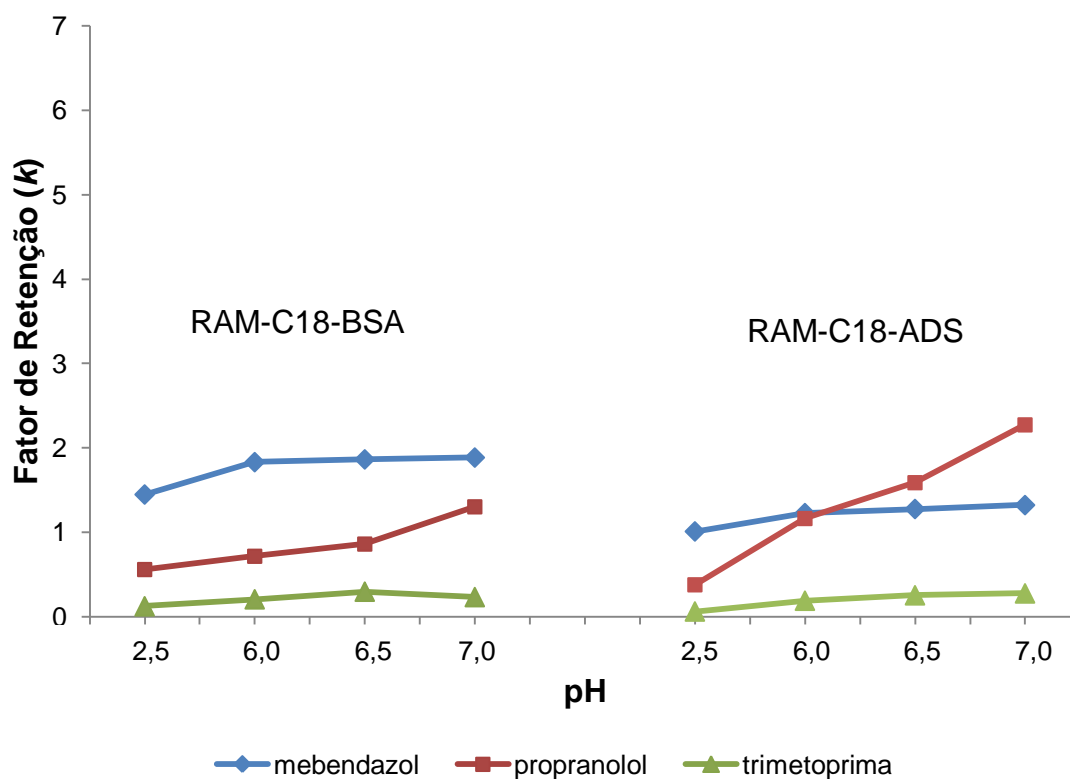
**Figura 31** – Retenção dos fármacos ácidos em função do pH da fase móvel nas colunas RAM-C18-BSA (30 x 4,6 mm, 15  $\mu$ m) e RAM-C18-ADS (25 x 4,0 mm, 25  $\mu$ m).



**Figura 32** – Retenção dos fármacos neutros em função do pH da fase móvel nas colunas RAM-C18-BSA (30 x 4,6 mm, 15  $\mu$ m) e RAM-C18-ADS (25 x 4,0 mm, 25  $\mu$ m).



**Figura 33** – Retenção dos fármacos básicos em função do pH da fase móvel nas colunas RAM-C18-BSA (30 x 4,6 mm, 15  $\mu$ m) e RAM-C18-ADS (25 x 4,0 mm, 25  $\mu$ m).



Os resultados mostram que não houve diferenças significativas nos fatores de retenção dos fármacos nas colunas RAM-C18-BSA e RAM-C18-ADS, com exceção dos fármacos ácidos em pH 2,5 em que foram observados maiores valores de  $k$  quando eluídos pela coluna RAM-C18-BSA.

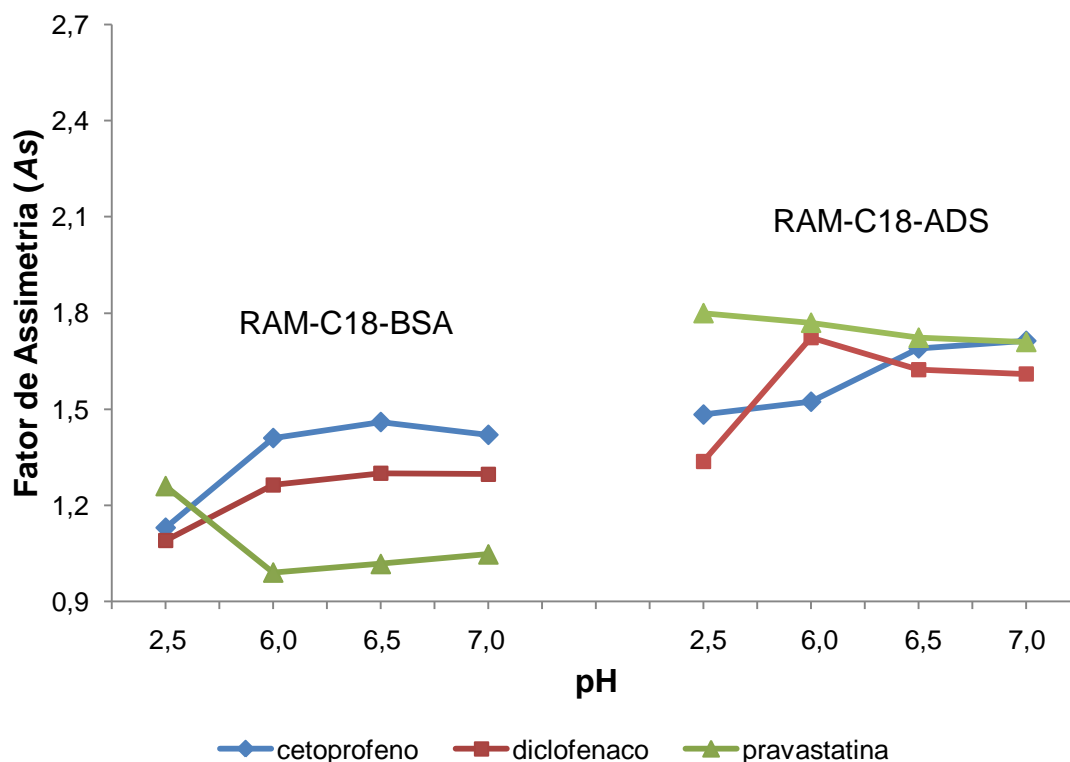
LIMA<sup>73</sup> *et al.* avaliaram a retenção de uma série de fármacos em coluna RAM-C8-BSA (100 x 4,6 mm, 10  $\mu$ m), dentre eles, cetoprofeno, omeprazol e propranolol. Os perfis de retenção obtidos por LIMA<sup>73</sup> *et al.* foram semelhantes aos perfis de retenção obtidos no presente trabalho para estes fármacos. Provavelmente, esses resultados foram semelhantes devido ao fato de que apesar das colunas extratoras utilizadas por LIMA<sup>73</sup> *et al.* possuírem comprimento maior que as colunas deste trabalho, cerca de três vezes o comprimento da RAM-C18-BSA e quatro vezes o da RAM-C18-ADS, o que é capaz de aumentar os fatores de retenção dos fármacos; as fases hidrofóbicas utilizadas por LIMA<sup>73</sup> *et al.* são octilsílica, as quais, em

contrapartida, possibilitam uma menor retenção dos fármacos se comparada às fases octadecilsilica, mais apolares, do presente trabalho.

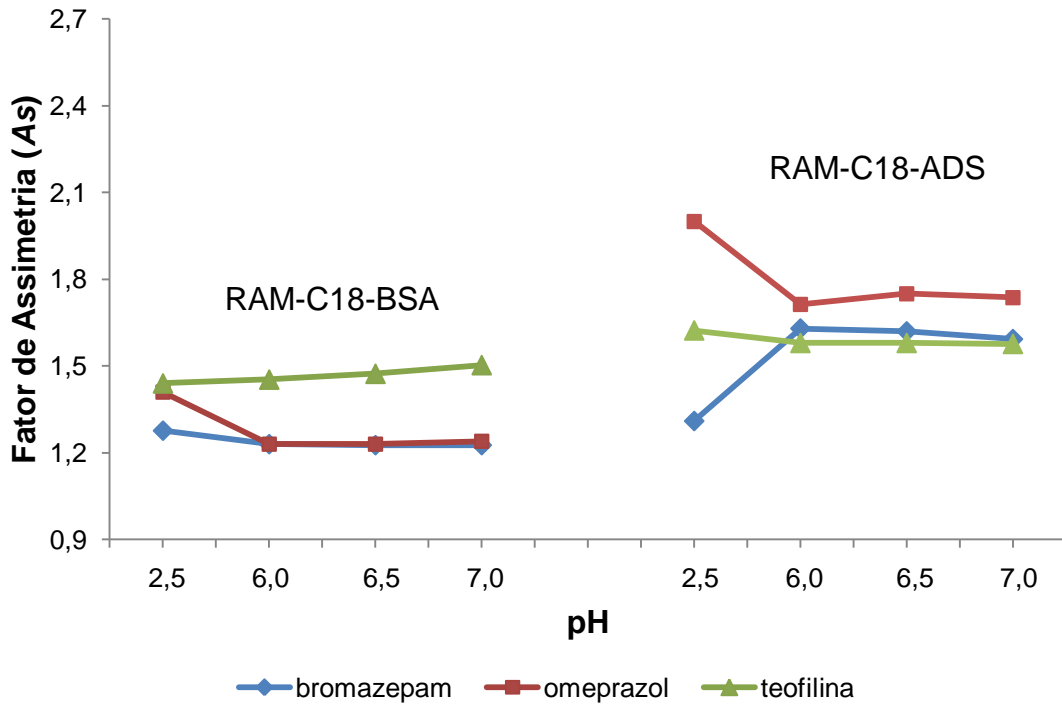
Quanto a assimetria das bandas cromatográficas, pode ser observado que há uma maior dispersão deste parâmetro em relação ao ideal ( $A_s=1,0$ ) na coluna RAM-C18-ADS do que na RAM-C18-BSA, tanto para os fármacos ácidos (**Figura 34**), quanto para os neutros (**Figura 35**) e básicos (**Figura 36**).

Contudo, no desenvolvimento de um método analítico com extração *on-line* da amostra biológica por coluna RAM, os fármacos interagem tanto com a fase hidrofóbica da coluna extratora quanto com a fase da coluna analítica, o que tende a diminuir o fator de assimetria dos analitos. Logo, altos valores de assimetria obtidos na interação analito-coluna RAM são aceitos. É evidente então a necessidade de uma reavaliação e otimização da separação cromatográfica no sistema bidimensional.

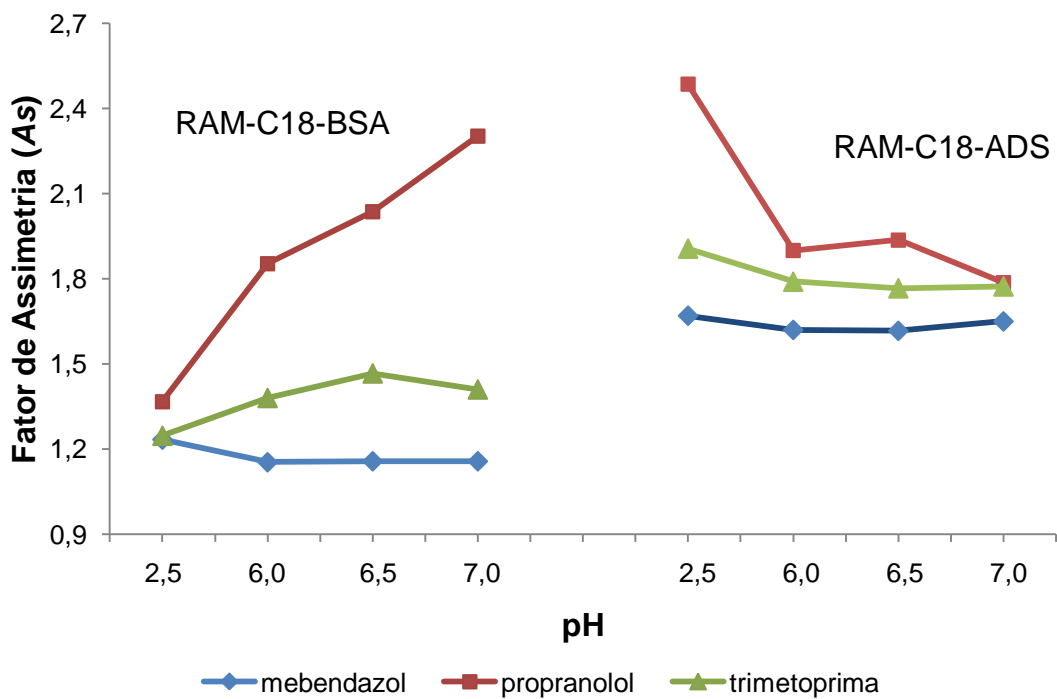
**Figura 34** – Fator de assimetria ( $A_s$ ) dos fármacos ácidos em função do pH da fase móvel nas colunas RAM-C18-BSA (30 x 4,6 mm, 15  $\mu$ m) e RAM-C18-ADS (25 x 4,0 mm, 25  $\mu$ m).



**Figura 35** – Fator de assimetria ( $A_s$ ) dos fármacos neutros em função do pH da fase móvel nas colunas RAM-C18-BSA (30 x 4,6 mm, 15  $\mu$ m) e RAM-C18-ADS (25 x 4,0 mm, 25  $\mu$ m).



**Figura 36** – Fator de assimetria ( $A_s$ ) dos fármacos básicos em função do pH da fase móvel nas colunas RAM-C18-BSA (30 x 4,6 mm, 15  $\mu$ m) e RAM-C18-ADS (25 x 4,0 mm, 25  $\mu$ m).



### 3 CONCLUSÃO

A coluna RAM-BSA *homemade* possui preparo simples e, assim como a RAM-ADS comercial se demonstrou eficiente para a exclusão de proteínas do plasma humano, com porcentual médio de, respectivamente, 101,1 e 99,9%, utilizando-se apenas água como fase móvel.

Ambas as colunas apresentaram também fatores de retenção adequados para os diferentes compostos avaliados, permitindo então a exclusão de proteínas da matriz biológica sem eliminar os analitos. Para os compostos ácidos e básicos, há a possibilidade de adequação dos fatores de retenção otimizando o pH da fase móvel.

Estes suportes são então adequados para serem utilizados como fases extratoras em sistemas de *column-switching* para determinação de fármacos em amostras biológicas.

A coluna *homemade* é uma alternativa viável para a substituição da coluna comercial.

### **CAPÍTULO 3**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE LOVASTATINA, PRAVASTATINA, ROSUVASTATINA E SINVASTATINA EM PLASMA HUMANO EMPREGANDO CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA COM COLUNAS DE MEIO DE ACESSO RESTRITO**

## 1 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos analíticos foram realizados nos Laboratórios de Controle de Qualidade de Medicamentos (LCQ) e de Bioequivalência do Centro de Estudos e Desenvolvimento Analítico Farmacêutico (CEDAFAR-BIO) da Faculdade de Farmácia da UFMG.

O plasma humano utilizado foi coletado no Laboratório de Hematologia Clínica da Faculdade de Farmácia da UFMG mediante aprovação do estudo pelo Comitê de Ética da UFMG conforme **Anexo A** deste trabalho.

### 1.1 Materiais

#### 1.1.1 Substâncias químicas de referência (SQR) e amostras

- Atorvastatina cálcica (USP Reference Standard), lote G0J276.
- Pravastatina sódica (USP Reference Standard), lote F1I288.
- Rosuvastatina cálcica (PGS Purity Grade Standard – USA), lote 1110-012A1.
- Sinvastatina (USP Reference Standard), lote I1H070.
- Atorvastatina cálcica matéria-prima (Fagron – São Paulo, Brasil), lote VLATD01100110#5.
- Lovastatina matéria-prima (Pharmanostra – Rio de Janeiro, Brasil), lote 09124119A.
- Pravastatina sódica matéria-prima (Pharmanostra – Rio de Janeiro, Brasil), lote 11114129B.
- Rosuvastatina cálcica matéria-prima (Embrafarma – São Paulo, Brasil), lote 13771.
- Sinvastatina matéria-prima (Galena – São Paulo, Brasil), lote 1102009509.



#### 1.1.4 Reagentes e vidrarias

- Solventes e reagentes grau cromatográfico: acetonitrila e metanol J. T. Baker (Xalostoc, México).
- Solventes e reagente grau analítico: ácido orto-fosfórico Vetec (Duque de Caxias, Brasil), fosfato de potássio bibásico Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha), fosfato de potássio monobásico Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) e hidróxido de potássio Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).
- Água ultrapurificada em sistema Milli-Q Millipore Direct-Q3.
- Tubos *Eppendorf*.
- Pipetas, provetas e balões volumétricos calibrados.
- Béqueres, tubos de ensaio e kit de filtração a vácuo.

#### 1.1.5 Equipamentos e materiais

- Agitador automático Minishaker MS1IKA Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).
- Aparelho de ultrassom Unique (Indaiatuba, Brasil) MaxiClean 1400.
- Balança analítica Shimadzu (Kyoto, Japão) AUW220D com precisão de 0,01 mg.
- Centrífuga Jouan (Saint-Herblain, França) MR23.
- Coluna analítica Lichrocart 125-4 Purospher Star C8 (125 x 4,0 mm, 5  $\mu$ m) Merck (Darmstadt, Alemanha).
- Coluna cromatográfica HPLC C18 (30 x 4,6 mm, 15  $\mu$ m) ACE (Aberdeen, Escócia)
- Coluna RAM-ADS Lichrocart 25-4 Lichrospher C18 ADS (25 x 4,0 mm, 25  $\mu$ m) Merck (Darmstadt, Alemanha).
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu (Kyoto, Japão), com controladora SCL-10A VP, duas bombas LC-10AD VP, forno CTO-10A VP,

injetor automático SIL-10AD VP e detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M10A VP.

- Filtros de membrana de celulose regenerada de 0,45 µm Millipore (Darmstadt, Alemanha).
- Freezer Revco (Garden Grove, EUA) com temperatura de -70°C.
- Repipetador eletrônico HandStep Brand (Wertheim, Alemanha).
- Micropipetas Pipetman P20 e P1000 Gilson (Middleton, EUA).
- Potenciômetro Metrohm (São Paulo, Brasil) 827 pH Lab.
- Refrigerador GELOPAR (Araucária, Brasil) com temperatura de 2°C.
- Sistema de purificação de água Milli-Q Millipore (Darmstadt, Alemanha) Direct-Q3.
- Válvula de 6 vias e 2 posições VICI (Brockville, Canadá) Cheminert.

## 1.2 Métodos

### 1.2.1 Ajuste do pH das amostras biológicas

A primeira etapa do desenvolvimento do método bioanalítico para a determinação de lovastatina, pravastatina, rosuvastatina e sinvastatina, utilizando atorvastatina como padrão interno, consistiu na acidificação do plasma humano com o intuito de reduzir a conversão das formas moleculares lactona em hidroxiácida de alguns destes fármacos na amostra biológica.

Preparou-se então solução de ácido fosfórico a 42,5% (v/v) diluindo 500 µL de ácido fosfórico PA em 500 µL de água deionizada. Em seguida, foram adicionados 10 µL da solução preparada em 500 µL de plasma humano. A amostra foi homogeneizada em agitador automático durante 15 segundos e o pH medido.

### **1.2.2 Medidas espectrofotométricas de soluções padrão de estatinas**

Para determinar os comprimentos de onda relativos à absorção máxima na região do ultravioleta e visível (UV-vis) pelas estatinas, foram realizadas medidas espectrofotométricas de soluções padrão a  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  destes compostos.

Inicialmente foram preparadas soluções a  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$  de atorvastatina, lovastatina, pravastatina, rosuvastatina e sinvastatina pesando cerca de 10 mg de cada fármaco em balões de 10 mL e dissolvendo-os em metanol. 20  $\mu\text{L}$  destas soluções foram diluídas em 980  $\mu\text{L}$  de solução de acetonitrila:solução fosfato de potássio 0,1 M pH 2,5 (40:60), obtendo assim soluções padrão a  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  de estatinas. Em seguida, o equipamento foi zerado e alíquotas das soluções padrão foram transferidas para cubetas de quartzo. As varreduras na região espectral de 190 a 800 nm foram registradas utilizando solução de acetonitrila:solução fosfato de potássio 0,1 M pH 2,5 (40:60) como solução branco.

### **1.2.3 Desenvolvimento e comparação de métodos empregando os modos de eluição *backflush* e *foreflush* do sistema de *column-switching***

Inicialmente foi otimizada a separação cromatográfica de atorvastatina, lovastatina, pravastatina, rosuvastatina e sinvastatina no modo unidimensional de eluição (modo de eluição convencional em CLAE, em que o sistema é composto por apenas uma coluna analítica). Foi avaliada a separação desses fármacos utilizando, como fase móvel, diferentes misturas em diversas proporções de solução fosfato de potássio 0,1 M pH 2,5 com metanol ou acetonitrila ou metanol e acetonitrila em eluição isocrática e gradiente.

Foram desenvolvidos e avaliados métodos para a separação cromatográfica desses mesmos fármacos em plasma humano empregando coluna RAM e cromatografia líquida no modo bidimensional de eluição (modo em que o sistema cromatográfico é composto por duas colunas, geralmente uma extratora para o preparo da amostra e uma analítica para a separação dos analitos). Os métodos foram desenvolvidos

utilizando as duas modalidades de eluição do sistema bidimensional: *backflush* e *foreflush*. Os métodos compartilharam condições cromatográficas análogas diferindo apenas no modo de eluição bidimensional empregado, em um deles foi utilizado o *backflush* e no outro, o *foreflush*. Esta comparação foi realizada utilizando colunas RAM-BSA *homemade* C18 (30 x 4,6 mm, 15  $\mu\text{m}$ ) e RAM-ADS Lichrocart C18-ADS (25 x 4,0 mm, 25  $\mu\text{m}$ ) como fases extratoras e coluna analítica Lichrocart C8 (125 x 4,0 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) mantidas a 35°C. O tempo de viragem da válvula do modo bidimensional foi de 3 min. Em uma dimensão foi empregada água deionizada com fluxo de 1,0 mLmin<sup>-1</sup> como fase móvel (A). Na segunda dimensão foi utilizada como fase móvel (B) os gradientes representados nas **tabelas 7 e 8** para os modos *backflush* e *foreflush*, respectivamente, também a 1,0 mLmin<sup>-1</sup>. O volume de injeção foi de 20  $\mu\text{L}$  e os analitos foram monitorados a 237 nm.

**Tabela 7** – Condições de gradiente para a fase móvel (B) no modo *backflush* de eluição.

Tempo (min)	Acetonitrila (%)	Fosfato* (%)	Eluição
0 – 4,0	40	60	isocrática
4,0 – 6,0	40 → 60	60 → 40	gradiente linear
6,0 – 16,0	60	40	isocrática

\*solução fosfato de potássio 0,1 M pH 2,5.

**Tabela 8** – Condições de gradiente para a fase móvel (B) no modo *foreflush* de eluição.

Tempo (min)	Acetonitrila (%)	Fosfato* (%)	Eluição
0 – 10,5	40	60	isocrática
10,5 – 12,5	40 → 60	60 → 40	gradiente linear
12,5 – 30,0	60	40	isocrática

\*solução fosfato de potássio 0,1 M pH 2,5.

As amostras de estatinas foram preparadas na concentração de 2,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Para isso, preparou-se uma solução metanólica dos cinco analitos a 0,1  $\text{mg mL}^{-1}$  pesando cerca de 1,0 mg de cada fármaco em um único balão de 10 mL. O volume foi

completado com metanol e a solução foi homogeneizada. Após centrifugar o plasma a 5000 rpm durante 15 minutos ( $2711,15 \times g$ ) em temperatura ambiente, foram transferidos 480  $\mu\text{L}$  do mesmo juntamente com 10  $\mu\text{L}$  de solução de ácido fosfórico a 42,5% (v/v) para tubo *ependorf*. A amostra foi homogeneizada em agitador automático durante 15 segundos. Em seguida, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  da solução de estatinas a  $0,1 \text{ mgmL}^{-1}$  e homogeneizado por mais 15 segundos, obtendo assim a amostra a  $2,0 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  dos cinco fármacos em plasma.

Finalmente, foram injetados no cromatógrafo seis replicatas de 20  $\mu\text{L}$  da amostra utilizando a coluna RAM-BSA como fase extratora, o modo *backflush* de eluição e as demais condições cromatográficas acima descritas. O mesmo procedimento foi repetido para a coluna RAM-ADS e também para as duas colunas no modo *foreflush*. Entretanto, as tubulações no cromatógrafo e na válvula seletora foram ajustadas a fim se obter a configuração deste segundo modo de eluição bidimensional.

Os parâmetros cromatográficos número de pratos teóricos ( $N$ ), fator de assimetria a 10% ( $A_s$ ) e resolução ( $Res$ ) entre os picos, além do tempo total de corrida foram avaliados e comparados para os modos de eluição *backflush* e *foreflush* e para as colunas RAM-BSA e RAM-ADS.

O número de pratos teóricos foi calculado segundo a equação:

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{w_b} \right)^2 \quad (14)$$

onde:

$N$  = número de pratos teóricos;

$t_R$  = tempo de retenção do analito;

$w_b$  = largura do pico medida na sua base utilizando o método da tangente.

O fator de assimetria a 10% foi calculado de acordo com a **equação 13** do **capítulo 2**. E a resolução entre os picos foi determinada de acordo com a seguinte equação:

$$Res = \frac{2(t_{R2} + t_{R1})}{w_{b2} + w_{b1}} \quad (15)$$

onde:

$Res$  = Resolução entre dois picos adjacentes (1 e 2);

$t_{R2}$  = tempo de retenção do pico 2;

$t_{R1}$  = tempo de retenção do pico 1;

$w_{b2}$  = largura do pico 2 medida na sua base;

$w_{b1}$  = largura do pico 1 medida na sua base.

#### **1.2.4 Avaliação dos volumes de injeção de amostras de estatinas**

Para aumentar a detectabilidade do método, foi avaliado o perfil dos picos dos cinco analitos quando volumes crescentes de amostra foram injetados.

Foram preparadas soluções metanólicas a  $1,0 \text{ mgmL}^{-1}$  dos cinco fármacos conforme já descrito anteriormente. Destas, foram transferidos para um único balão de 10 mL, 2500  $\mu\text{L}$  da solução de atorvastatina, 265  $\mu\text{L}$  das soluções de lovastatina, rosuvastatina e sinvastatina e 650  $\mu\text{L}$  da solução de pravastatina. O volume foi completado com metanol e a solução foi homogeneizada. Após centrifugar o plasma a 5000 rpm durante 15 minutos ( $2711,15 \times g$ ) à temperatura ambiente, foram transferidos 960  $\mu\text{L}$  do mesmo juntamente com 20  $\mu\text{L}$  de solução de ácido fosfórico a 42,5% (v/v) para tubo *ependorf*. A amostra foi homogeneizada em agitador automático durante 15 segundos. Em seguida, foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  da solução

contendo as cinco estatinas e homogeneizado por mais 15 segundos, obtendo dessa forma a amostra em uma concentração mediana às concentrações da curva de calibração para determinação destes fármacos em plasma humano. As concentrações foram de  $5000 \text{ ngmL}^{-1}$  para a atorvastatina,  $530 \text{ ngmL}^{-1}$  para a lovastatina, rosuvastatina e sinvastatina e  $1300 \text{ ngmL}^{-1}$  para a pravastatina.

Foram então injetados no cromatógrafo 20, 50, 100, 200 e 500  $\mu\text{L}$  da amostra preparada utilizando coluna RAM-BSA como fase extratora, coluna analítica Lichrocart C8, ambas mantidas a  $35^\circ\text{C}$ , e o modo *backflush* de eluição com tempo de viragem da válvula de 3 min. A fase móvel (A) consistiu em água deionizada com vazão de  $1,0 \text{ mLmin}^{-1}$  e fase móvel (B) foi utilizada de acordo com o gradiente representado na **Tabela 7**, também a  $1,0 \text{ mLmin}^{-1}$ . Os fármacos foram monitorados a 237 nm durante 16 min.

A avaliação da detectabilidade dos fármacos foi então realizada comparando a altura e o fator de assimetria a 10% (**equação 13** do **capítulo 2**) das bandas cromatográficas dos cinco analitos.

### **1.2.5 Condições cromatográficas para validação do método**

As análises cromatográficas para a validação do método foram realizadas em cromatógrafo a líquido Shimadzu 10A VP com detector DAD, coluna RAM-ADS Lichrocart C18-ADS (25 x 4,0 mm, 25  $\mu\text{m}$ ) como fase extratora e coluna analítica Lichrocart C8 (125 x 4,0 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), mantidas a  $35^\circ\text{C}$ . Foi selecionado o modo *backflush* de eluição, como já descrito anteriormente, com tempo de viragem da válvula de 3 min. Na primeira dimensão foi empregada água deionizada (pH 2,5, ajustado com  $\text{H}_3\text{PO}_4$  PA) com vazão de  $1,0 \text{ mLmin}^{-1}$  (fase móvel (B)), e na segunda dimensão, a fase móvel (B) foi utilizada de acordo com o gradiente representado na **Tabela 7**, também a  $1,0 \text{ mLmin}^{-1}$ . O volume de injeção foi de 500  $\mu\text{L}$ , os fármacos foram monitorados a 237 nm e o tempo total de análise foi de 16 min.

### **1.2.6 Preparo das amostras e padrões de validação do método**

Os padrões e amostras de calibração e as amostras de controle de qualidade utilizados na validação do método bioanalítico para determinação de lovastatina, pravastatina, rosuvastatina e sinvastatina em plasma humano, utilizando atorvastatina como padrão interno, foram preparados da seguinte maneira: inicialmente foram preparadas soluções estoque (SE) de ATO, LOV, PRA, ROS e SIN. A partir destas SE, foram preparadas soluções de trabalho (ST) contendo os cinco fármacos juntos em concentrações que variavam. As amostras e padrões de validação do método foram então obtidas fortificando alíquotas de plasma com volume fixo de ST.

#### **1.2.6.1 Preparo das soluções estoque de estatinas**

As SE de estatinas foram preparadas na concentração de  $1,0 \text{ mgmL}^{-1}$  do fármaco em metanol. Foram pesados exatamente cerca de 10,0 mg de LOV, PRA, ROS e SIN em balão volumétrico de 10 mL e exatamente cerca de 50 mg de ATO em balão de 50 mL. Cerca de 80% do volume dos balões foi completado com metanol e as soluções foram levadas ao banho de ultrassom durante 5 minutos. Em seguida, as soluções foram deixadas em repouso à temperatura ambiente até completa contração do solvente. Finalmente, o volume dos balões foi completado com o mesmo solvente e as soluções foram homogeneizadas.

#### **1.2.6.2 Preparo das soluções de trabalho de calibração e de controle de qualidade**

Foram preparadas sete soluções de trabalho (ST<sub>1</sub>, ST<sub>2</sub>, ST<sub>3</sub>, ST<sub>4</sub>, ST<sub>5</sub>, ST<sub>6</sub> e ST<sub>7</sub>) correspondentes aos sete pontos da curva de calibração dos fármacos e quatro



soluções de trabalho correspondentes às concentrações de controle de qualidade de baixa, média e alta concentração e de diluição ( $ST_{CQB}$ ,  $ST_{CQM}$ ,  $ST_{CQA}$  e  $ST_{CQD}$ ).

As soluções de trabalho foram obtidas transferindo os volumes das soluções estoque de ATO, LOV, PRA, ROS e SIN de acordo com a **Tabela 9** para balões volumétricos de 10 mL. O volume dos balões foi completado com metanol e as soluções foram homogeneizadas.

As ST foram armazenadas em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$ , por, no máximo, 30 dias.

**Tabela 9** – Volume de solução estoque de estatinas ( $\mu\text{L}$ ) para o preparo das soluções de trabalho de calibração e de controle de qualidade.

Solução de trabalho	SE de atorvastatina	SE de lovastatina	SE de pravastatina	SE de rosuvastatina	SE de sinvastatina
$ST_1$	2500	62,5	250	62,5	62,5
$ST_2$	2500	125,0	375	125,0	125,0
$ST_3$	2500	188,0	500	188,0	188,0
$ST_4$	2500	250,0	625	250,0	250,0
$ST_5$	2500	313,0	750	313,0	313,0
$ST_6$	2500	375,0	875	375,0	375,0
$ST_7$	2500	438,0	1000	438,0	438,0
$ST_{CQB}$	2500	175,0	500	175,0	175,0
$ST_{CQM}$	2500	265,0	650	265,0	265,0
$ST_{CQA}$	2500	350,0	800	350,0	350,0
$ST_{CQD}$	5000	550,0	1350	550,0	550,0

### **1.2.6.3 Preparo de padrões e amostras de calibração e amostras de controle de qualidade**

Os padrões de calibração foram preparados nas concentrações de 125, 250, 376, 500, 626, 750 e 876  $\text{ngmL}^{-1}$  de lovastatina, rosuvastatina e sinvastatina; 500, 750,

1000, 1250, 1500, 1750 e 2000 ngmL<sup>-1</sup> de pravastatina e 5000 ngmL<sup>-1</sup> de atorvastatina.

Foram transferidos 686 µL de plasma juntamente com 14 µL de solução de ácido fosfórico a 42,5% (v/v) para tubo *ependorf*, seguido de homogeneização em agitador automático durante 15 segundos. Foram então adicionados 14 µL das soluções de trabalho ST<sub>1</sub>, ST<sub>2</sub>, ST<sub>3</sub>, ST<sub>4</sub>, ST<sub>5</sub>, ST<sub>6</sub>, e ST<sub>7</sub> para, respectivamente, os padrões de calibração P<sub>1</sub> (LIQ), P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub>, P<sub>5</sub>, P<sub>6</sub> e P<sub>7</sub> (LSQ). Os padrões foram homogeneizadas por mais 15 segundos e centrifugados a 5000 rpm durante 15 minutos (2347,8 x g) a 4°C.

Para o preparo da amostra zero de calibração, foi preparada uma solução de PI a 250 µgmL<sup>-1</sup> transferindo 2500 µL da solução estoque de ATO (cujo preparo foi descrito na **seção 1.2.6.1**) para balão volumétrico de 10 mL, completando o volume do balão com metanol e homogeneizando a solução. As amostras branco e zero foram preparadas de modo similar ao preparo das amostras de calibração, contudo, foram adicionados 14 µL de, respectivamente, metanol e solução de PI a 250 µgmL<sup>-1</sup> substituindo a adição de ST das amostras de calibração.

As amostras de controle de qualidade CQB, CQM e CQA foram preparadas nas concentrações de 350, 530 e 700 ngmL<sup>-1</sup> de lovastatina, rosuvastatina e sinvastatina; 1000, 1300 e 1600 ngmL<sup>-1</sup> de pravastatina e 5000 ngmL<sup>-1</sup> de atorvastatina. Estas amostras também tiveram o preparo similar ao das amostras de calibração, contudo, na última etapa, foram adicionados 14 µL de ST<sub>CQB</sub>, ST<sub>CQM</sub> e ST<sub>CQA</sub>, substituindo a adição de ST das amostras de calibração, obtendo, respectivamente, as amostras CQB, CQM e CQA.

A amostra de controle de qualidade CQD foi preparada na concentração de 550 ngmL<sup>-1</sup> de LOV, ROS e SIN, 1350 ngmL<sup>-1</sup> de PRA e 5000 ngmL<sup>-1</sup> de ATO da seguinte maneira: foram transferidos 686 µL de plasma e 28 µL de solução de ácido fosfórico a 42,5% (v/v) para tubo *ependorf*. A amostra foi homogeneizada em agitador automático durante 15 segundos. Em seguida, foram adicionados 14 µL de ST<sub>CQD</sub>, as amostras foram homogeneizadas por mais 15 segundos. Foi adicionada uma segunda fração de 700 µL de plasma diluindo de duas vezes a amostra e finalmente a mesma foi homogeneizada em agitador automático e centrifugada conforme as amostras de calibração.

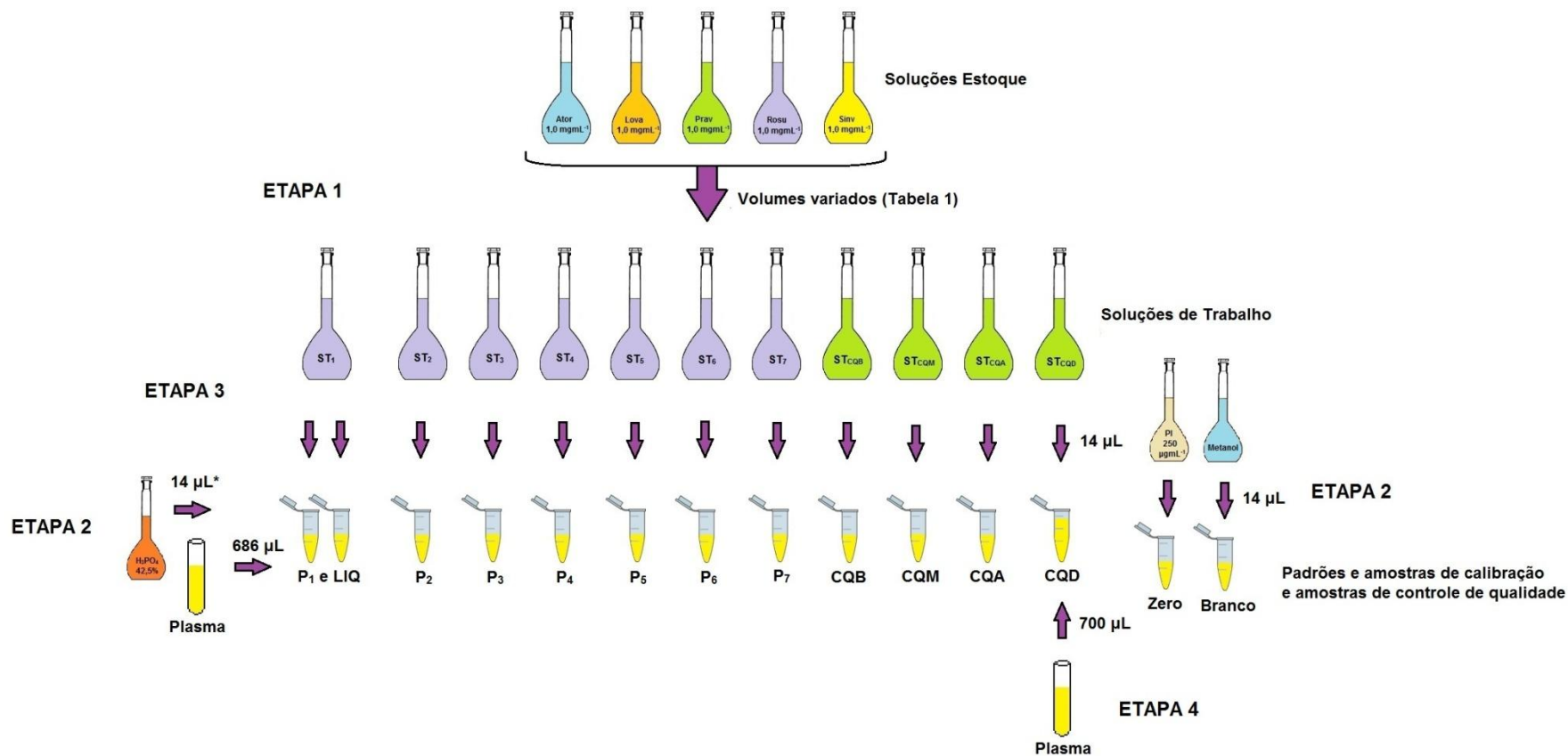
A **Figura 37** e as **tabelas 9 e 10** representam resumidamente as etapas para o preparo das amostras e soluções padrão de validação do método.

**Tabela 10** – Preparo dos padrões e amostras de calibração e amostras de controle de qualidade.

Amostra	Plasma	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *	Fortificação (14 µL)	Plasma
P <sub>1</sub> (LIQ)	686 µL	14 µL	ST <sub>1</sub>	–
P <sub>2</sub>	686 µL	14 µL	ST <sub>2</sub>	–
P <sub>3</sub>	686 µL	14 µL	ST <sub>3</sub>	–
P <sub>4</sub>	686 µL	14 µL	ST <sub>4</sub>	–
P <sub>5</sub>	686 µL	14 µL	ST <sub>5</sub>	–
P <sub>6</sub>	686 µL	14 µL	ST <sub>6</sub>	–
P <sub>7</sub> (LSQ)	686 µL	14 µL	ST <sub>7</sub>	–
branco	686 µL	14 µL	metanol	–
zero	686 µL	14 µL	PI**	–
CQB	686 µL	14 µL	ST <sub>CQB</sub>	–
CQM	686 µL	14 µL	ST <sub>CQM</sub>	–
CQA	686 µL	14 µL	ST <sub>CQA</sub>	–
CQD	686 µL	28 µL	ST <sub>CQD</sub>	700 µL

\*solução de ácido fosfórico a 42,5% (v/v). \*\*solução metanólica de PI a 250 µg mL<sup>-1</sup>.

**Figura 37** – Esquema das etapas para o preparo dos padrões e amostras de calibração e amostras de controle de qualidade.



\*28 μL de solução de ácido fosfórico a 42,5% (v/v) para a amostra CQD.

## **1.2.7 Critérios de desempenho para validação bioanalítica**

### **1.2.7.1 Seletividade**<sup>56</sup>

Para o estudo da seletividade, seis amostras branco, obtidas de seis fontes distintas, foram necessárias, das quais, quatro foram preparadas com plasma normal, uma foi preparada com plasma lipêmico e a última com plasma hemolisado. Foi também preparada uma amostra LIQ e uma amostra CQM. Os modos de preparo de amostras branco e LIQ foram descritos na **seção 1.2.6.3**.

Foram então injetados no cromatógrafo 500 µL das quatro amostras branco normais, da amostra branco lipêmica, da amostra branco hemolisada, da amostra LIQ e da amostra CQM utilizando as condições cromatográficas para validação do método (**seção 1.2.5**).

O cromatograma da amostra LIQ foi sobreposto aos seis cromatogramas das amostras branco. Por inspeção visual, foi observado se houve presença, nos cromatogramas branco, de picos interferentes, compreendidos em toda a extensão de integração dos picos dos analitos e PI no cromatograma LIQ. As porcentagens das áreas dos picos interferentes foram determinadas em relação às áreas dos respectivos analitos e PI na concentração do LIQ.

A resolução entre os picos dos cinco fármacos no cromatograma CQM foi determinada de acordo com a **equação 15** deste capítulo.

### **1.2.7.2 Efeito residual**<sup>56</sup>

O efeito residual (*carry-over*) também foi avaliado por sobreposições de cromatogramas. Neste estudo, o cromatograma de amostra LIQ foi sobreposto aos cromatogramas de amostras branco injetadas antes e após injeção e corrida de amostra LSQ.

Foram então preparadas três amostras branco, uma amostra LIQ e uma amostra LSQ segundo o modo de preparo anteriormente descrito na **seção 1.2.6.3**.

Utilizando as condições cromatográficas para validação do método (**seção 1.2.5**), foram injetados no cromatógrafo 500 µL destas amostras na seguinte ordem: uma amostra branco, amostra LSQ, duas amostras branco e amostra LIQ.

Após a sobreposição dos cromatogramas, foi observado se houve *carry-over*, ou seja, presença de picos provenientes da injeção e corrida da amostra LSQ interferindo na quantificação da área dos picos dos analitos e PI. As porcentagens das áreas dos picos interferentes foram determinadas em relação às áreas dos respectivos analitos e PI na concentração do LIQ.

### **1.2.7.3 Efeito matriz**<sup>56</sup>

O efeito matriz foi avaliado comparando a resposta dos analitos em amostras CQB e CQA em plasma em relação à resposta destes analitos em solução aquosa nas mesmas concentrações.

Foram preparadas quatro amostras de plasma fortificadas CQB e quatro CQA utilizando plasma proveniente de oito fontes distintas segundo o modo de preparo descrito na **seção 1.2.6.3**. Das amostras CQB, duas foram preparadas com plasma normal, uma com plasma lipêmico e a última com plasma hemolisado. O mesmo procedimento foi adotado para o preparo das amostras CQA.

As soluções aquosas dos analitos foram preparadas em duas replicatas na concentração de CQB e duas de CQA também utilizando o procedimento descrito na **seção 1.2.6.3**, porém, na primeira etapa, foram adicionados 686 µL de água purificada, ao invés de 686 µL de plasma.

Utilizando as condições cromatográficas para validação do método (**seção 1.2.5**), foram injetados no cromatógrafo 500 µL das oito amostras de plasma fortificadas CQB e CQA e das quatro soluções aquosas CQB e CQA.

Por meio da **equação 16** foram calculados os fatores de matriz normalizados por PI (FMN) para cada fármaco e cada concentração de controle de qualidade avaliada.

$$FMN = \frac{AUC_{AM}/AUC_{PIM}}{AUC_{AS}/AUC_{PIS}} \quad (16)$$

onde:

$FMN$  = fator de matriz normalizado por PI;

$AUC_{AM}$  = área sob a curva do analito em matriz;

$AUC_{PIM}$  = área sob a curva do PI em matriz;

$AUC_{AS}$  = área sob a curva do analito em solução;

$AUC_{PIS}$  = área sob a curva do PI em solução.

#### 1.2.7.4 Curva de calibração<sup>56,76</sup>

Foi utilizado o método de Regressão Linear Simples (Método dos mínimos quadrados ordinários – MMQO) para o estudo da linearidade.

Para isto, foram preparados e analisados, em três dias distintos, um padrão de cada ponto da calibração, uma amostra branco e uma amostra zero. Os padrões e amostras foram preparados segundo o modo de preparo anteriormente descrito na **seção 1.2.6.3** e de forma independente, ou seja, as pesagens e os preparos das soluções de estoque e trabalho foram realizados três vezes, uma vez em cada dia.

Utilizando as condições cromatográficas para validação do método (**seção 1.2.5**), foram injetados no cromatógrafo 500 µL destes padrões e amostras em ordem aleatória.

A curva de calibração concentração *versus* área do analito normalizada pela área do padrão interno foi então construída e avaliada. Previamente, o diagnóstico de *outliers* no conjunto de dados experimentais obtidos, e as premissas normalidade e homocedasticidade para o uso da estatística paramétrica foram realizados.

Para o diagnóstico de *outliers* foi empregado o teste do Resíduo padronizado de *Jacknife* (estatística  $J_{ei}$ ), calculado utilizando as seguintes equações:

$$J_{ei} = r_i \sqrt{\frac{n-p-1}{n-p-r_i^2}} \quad (17)$$

$$r_i = \frac{e_i}{S_{e_i}} \quad (18)$$

$$e_i = x - \bar{x} \quad (19)$$

$$S_{e_i} = S_{res} \sqrt{1 - h_i} \quad (20)$$

$$h_i = \frac{1}{n} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{S_{xx}} \quad (21)$$

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left( \sum_{i=1}^n x_i \right)^2 / n \quad (22)$$

onde:

$J_{ei}$  = estatística *Jacknife*;

$r_i$  = resíduo padronizado;

$e_i$  = resíduo;



$S_{e_i}$  = erro padrão do resíduo;

$h_i$  = leverage;

$n$  = número de dados;

$p$  = número de parâmetros;

$x$  = valor experimental;

$\bar{x}$  = média dos valores experimentais.

Foi avaliado se os dados seguem a distribuição normal por meio do teste de *Ryan-Joiner* calculando a estatística  $R_{e\eta}$  (**equações de 1 a 6 do capítulo 2**).

A homocedasticidade foi avaliada pelo cálculo da estatística  $t_L$  do teste de *Brown-Forsythe* (ou *Levene* modificado) com as seguintes expressões:

$$t_L = \frac{|\bar{d}_1 - \bar{d}_2|}{\sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) s_p^2}} \quad (23)$$

$$\bar{d}_k = \sum |d_{kj}|/n_k \quad (24)$$

$$d_{kj} = \tilde{e}_k - e_{kj} \quad (25)$$

$$s_p^2 = \frac{(SQD_1 + SQD_2)}{(n_1 + n_2 + 2)} \quad (26)$$

$$SQD_k = \sum_{j=1}^{n_k} (d_{kj} - \bar{d}_k)^2 \quad (27)$$

onde:

$t_L$  = estatística de *Brown-Forsythe*;

$n_k$  = número de observações;

$\tilde{e}_k$  = mediana de cada grupo;

$S_p^2$  = variância combinada;

$SQD_k$  = soma dos quadrados dos desvios das diferenças.

Além de seguirem a normalidade e serem homocedásticos, os dados experimentais devem ser independentes entre si para a adoção do modelo de Regressão Linear Simples. Foi calculada então a estatística  $d$  do teste de *Durbin-Watson* para avaliar a independência dos dados:

$$d = \frac{\sum_{i=2}^n (e_i - e_{i-1})^2}{\sum_{i=1}^n e_i^2} \quad (28)$$

onde:

$d$  = estatística de *Durbin-Watson*;

$e_i$  = resíduo do valor experimental  $i$ ;

$e_{i-1}$  = resíduo do valor experimental  $i-1$ .

O teste *Durbin-Watson* lança mão de dois valores de  $d$  crítico para comparação de  $d$  calculado, um inferior ( $d_L$ ) e um superior ( $d_U$ ). Estes parâmetros foram calculados por meio da interpolação polinomial:

$$d_{\text{critico}}(\alpha) \approx a + \frac{b}{\sqrt{n}} + \frac{c}{n} + \frac{d}{n^2} \quad (29)$$

onde, para 95% de confiança ( $\alpha = 0,05$ ):

$a = 1,96930$  para  $d_L$  e  $1,98323$  para  $d_U$ ;

$b = -2,86066$  para  $d_L$  e  $-3,05473$  para  $d_U$ ;

$c = -3,41482$  para  $d_L$  e  $1,38625$  para  $d_U$ ;

$d = 16,64003$  para  $d_L$  e  $16,36623$  para  $d_U$ .

Após as análises estatísticas foi traçado, para cada fármaco, o gráfico de dispersão com linha de tendência utilizando o software *Excel*. O eixo das abscissas foi representado pelas concentrações do fármaco e o eixo das ordenadas pelos valores de razão da área sob a curva do pico do analito dividida pela área sob a curva do pico do PI. Utilizando o mesmo *software*, foi também projetado o gráfico de dispersão dos resíduos.

A Regressão Linear utiliza a **equação 30** para correlacionar duas variáveis quaisquer estudadas e estimar o valor teórico da variável dependente em relação à variável independente experimentada.

$$y_i = bx_i + a \quad (30)$$

onde:

$y_i$  = variável dependente estimada pela equação da regressão;

$b$  = estimativa do coeficiente angular;

$a$  = estimativa do coeficiente linear;

$x_i$  = variável independente.

A estimativa dos parâmetros da Regressão Linear, coeficiente angular (inclinação,  $b$ ), coeficiente linear (interseção ou intercepto,  $a$ ) e coeficiente de determinação ( $R^2$ ), foi realizada utilizando as equações:

$$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} \quad (31)$$

$$S_{xy} = \sum_{i=1}^n x_i y_i - \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i / n \quad (32)$$

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left( \sum_{i=1}^n x_i \right)^2 / n \quad (33)$$

$$S_{yy} = \sum_{i=1}^n y_i^2 - \left( \sum_{i=1}^n y_i \right)^2 / n \quad (34)$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (35)$$

$$\bar{y} = \sum_{i=1}^n y_i / n \quad (36)$$

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^n x_i / n \quad (37)$$

$$R^2 = \frac{b^2 S_{xx}}{S_{yy}} \quad (38)$$

$$\bar{y} = \sum_{i=1}^n y_i/n \quad (39)$$

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^n x_i/n \quad (40)$$

O ajuste ao modelo foi então finalmente determinado por meio da avaliação do desvio da linearidade por Análise de Variância (ANOVA) em concordância com a **Tabela 11**.

**Tabela 11** – ANOVA: Regressão e Desvio da linearidade.

FV	GL	SQ	QM	F
Regressão	1	$b^2 S_{xx}$	$SQ_{Reg}/GL_{Reg}$	$QM_{Reg}/QM_{res}$
Resíduo	$n - 2$	$SQ_{Tot} - SQ_{Reg}$	$SQ_{res}/GL_{res}$	$QM_{Desvio}/QM_{EPuro}$
Desvio da linearidade	$u - 2$	$SQ_{res} - SQ_{EPuro}$	$SQ_{Desvio}/GL_{Desvio}$	
Entre níveis	$u - 1$	$\sum_{k=1}^u \frac{1}{n_k} \left( \sum_{j=1}^{n_k} y_{kj} \right)^2 - \frac{1}{\sum_{k=1}^u n_k} \left( \sum_{k=1}^u \sum_{j=1}^{n_k} y_{kj} \right)^2$		
Erro Puro	$n - u$	$SQ_{Tot} - SQ_{ENiveis}$	$SQ_{EPuro}/GL_{EPuro}$	
Total	$n - 1$	$S_{yy}$		

onde:

FV = fonte de variação;

GL = graus de liberdade;

SQ = soma de quadrados;

QM = quadrados médios;

$F$  = estatística  $F$ ;

$u$  = número de níveis;

$n$  = número de pontos.

#### **1.2.7.5 Precisão e Exatidão**<sup>56</sup>

Para o estudo dos critérios de desempenho de validação precisão e exatidão foram preparados e analisados, em seis replicatas, amostras nos cinco níveis de concentração: LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD. Os testes foram executados em três dias distintos para contemplar a determinação da precisão e exatidão intra e intercorrida.

Foram então preparados seis amostras de cada controle utilizando o procedimento descrito na **seção 1.2.6.3**. Para a quantificação destas amostras foram preparadas duas replicatas de cada padrão de calibração também em consonância com o modo de preparo detalhado na **seção 1.2.6.3**.

Utilizando as condições cromatográficas para validação do método (**seção 1.2.5**), foram injetados no cromatógrafo 500  $\mu$ L das 25 amostras de controle de qualidade e dos sete padrões de calibração.

Primeiramente, os dados experimentais obtidos para a precisão e exatidão foram avaliados quanto à presença de valores *outliers* utilizando o teste de *Grubbs* (estatística  $G$ ):

$$G_L = \frac{|\bar{x} - x_1|}{s} \quad (41)$$

$$G_U = \frac{|\bar{x} - x_n|}{s} \quad (42)$$

onde:

$G_L$  = estatística G calculada para o menor valor experimental;

$G_U$  = estatística G calculada para o maior valor experimental;

$\bar{x}$  = valor média experimentado;

$x_1$  = menor valor experimentado;

$x_n$  = maior valor experimentado;

$s$  = desvio padrão das replicas.

Posteriormente, a precisão e exatidão intra e inter corrida foram determinadas para cada fármaco e em cada nível de controle de qualidade.

A precisão foi calculada e expressa na forma de desvio padrão relativo ( $DPR_r$  e  $DPR_R$ , para, respectivamente, precisão intra e inter corrida) por ANOVA:

**Tabela 12** – ANOVA: Precisão intra e inter corrida.

FV	GL	SQ	QM	F
Ensaio	$u - 1$	$\sum_{k=1}^u \frac{1}{n_k} \left( \sum_{j=1}^{n_k} x_{kj} \right)^2$ $-\frac{1}{\sum_{k=1}^u n_k} \left( \sum_{k=1}^u \sum_{j=1}^{n_k} x_{kj} \right)^2$	$SQ_{Ensaio} / GL_{Ensaio}$	$QM_{Ensaio} / QM_{Repe}$
Repetitividade	$n - u$	$SQ_{Tot} - SQ_{Ensaio}$	$SQ_{Repe} / GL_{Repe}$	
Total	$n - 1$	$\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$		

onde:

FV = fonte de variação;

GL = graus de liberdade;

SQ = soma de quadrados;

QM = quadrados médios;

F = estatística F;

u = número de ensaios;

n = número total de replicatas.

**Tabela 13** – ANOVA: Estimativa de  $DPR_r$  e  $DPR_R$ .

Variância	Expressão	DPR
Repetitividade $s_r^2$	$QM_{Repetitividade}$	$\frac{\sqrt{s_r^2}}{\bar{x}} \times 100$
Entre ensaios $s_{EntreEnsaio}^2$	$(QM_{Ensaio} - QM_{Repetitividade} / \bar{n})$	
Reprodutibilidade parcial $s_R^2$	$s_r^2 + s_{EntreEnsaio}^2$	$\frac{\sqrt{s_R^2}}{\bar{x}} \times 100$



onde:

QM = quadrados médios;

$\bar{n}$  = média do número de replicatas nos diferentes ensaios;

A exatidão foi calculada e expressa na forma de erro padrão relativo ( $EPR_r$  e  $EPR_R$ , para, respectivamente, exatidão intra e inter corrida) utilizando a equação abaixo:

$$EPR = \frac{\bar{C}_{exp} - C_{nom}}{C_{nom}} \times 100 \quad (43)$$

onde:

$EPR$  = erro padrão relativo;

$\bar{C}_{exp}$  = concentração média experimentada;

$C_{nom}$  = concentração nominal.

#### **1.2.7.6 Limite inferior de quantificação (LIQ)<sup>77</sup>**

Os limites inferiores de quantificação dos fármacos foram estabelecidos analisando amostras das estatinas em plasma em concentrações decrescentes até que se obteve relação sinal/ruído próxima a 10 para os picos cromatográficos dos analitos. Dessa forma, foram preparadas e analisadas, em seis replicatas, amostras dos fármacos e PI em plasma em concentrações próximas ao LIQ, as respostas dos fármacos devem ser quantificáveis e reproduzíveis com precisão de 20% e exatidão de 80 a 120%. Além disso, a resposta dos analitos e PI devem ser, respectivamente, cinco e vinte vezes, no mínimo, superiores à resposta de qualquer interferente do plasma branco que possua tempo de retenção próximo aos dos analitos.

### 1.2.7.7 Estabilidade dos analitos em matriz biológica<sup>56</sup>

Para o estudo de estabilidade dos analitos em matriz biológica foram preparadas 15 amostras CQB e 15 amostras CQA. Destas amostras, seis (três de cada concentração) foram quantificadas após o preparo, seis foram analisadas após ciclos de congelamento e descongelamento, seis foram submetidas a condições preconizadas no estudo de curta duração, seis foram submetidas a condições de longa duração e as seis restantes, a condições de pós-precussamento.

Foram transferidos, em duplicata, 10,29 mL de plasma juntamente com 210 µL de solução de ácido fosfórico a 42,5% (v/v) para dois tubos tipo *falcon* de 50 mL. As amostras foram homogeneizadas em agitador automático durante 15 segundos. Em seguida, foram adicionados 210 µL das soluções de trabalho ST<sub>CQB</sub> e ST<sub>CQA</sub> obtendo, respectivamente, 15 amostras CQB e 15 amostras CQA. As amostras foram homogeneizadas por mais 15 segundos.

Estas amostras foram fracionadas em alíquotas de 700 µL em tubos *ependorf*. Três amostras CQB e três amostras CQA foram analisadas imediatamente após o preparo, as restantes foram armazenadas em freezer a -70°C para posterior análise de estabilidade.

Para a quantificação das amostras recém-preparadas e das demais amostras do estudo de estabilidade, as mesmas foram centrifugada a 5000 rpm durante 15 minutos (2347,8 x g) a 4°C no momento da análise. Foi também necessário o preparo de duas replicatas de cada padrão de calibração de acordo com o modo de preparo detalhado na **seção 1.2.6.3**, sendo utilizadas as condições cromatográficas para validação do método da **seção 1.2.5**.

#### 1.2.7.7.1 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

Três amostras CQB e três amostras CQA foram mantidas em freezer a -70°C durante, no mínimo, 12 horas e submetidas ao descongelamento à temperatura

ambiente. Decorrido o tempo, as amostras foram recongeladas por mais, no mínimo, 12 horas e novamente descongeladas totalizando três ciclos de congelamento e descongelamento. Por fim, estas amostras foram quantificadas conforme condições pré-determinadas na seção anterior.

#### 1.2.7.7.2 Estabilidade de curta duração

Foram submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente três amostras CQB e três amostras CQA e mantidas nesta mesma condição durante 2 horas. Decorrido o tempo, estas amostras foram quantificadas conforme condições pré-determinadas na **seção 1.2.7.7**.

#### 1.2.7.7.3 Estabilidade de longa duração

Três amostras CQB e três amostras CQA foram mantidas em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante 30 dias. Decorrido o tempo, estas amostras foram submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente e quantificadas conforme condições pré-determinadas na **seção 1.2.7.7**.

#### 1.2.7.7.4 Estabilidade pós-processamento

Foram submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente três amostras CQB e três amostras CQA e mantidas durante 12 horas no auto-injetor do cromatógrafo. Decorrido o tempo, estas amostras foram quantificadas conforme condições pré-determinadas na **seção 1.2.7.7**.

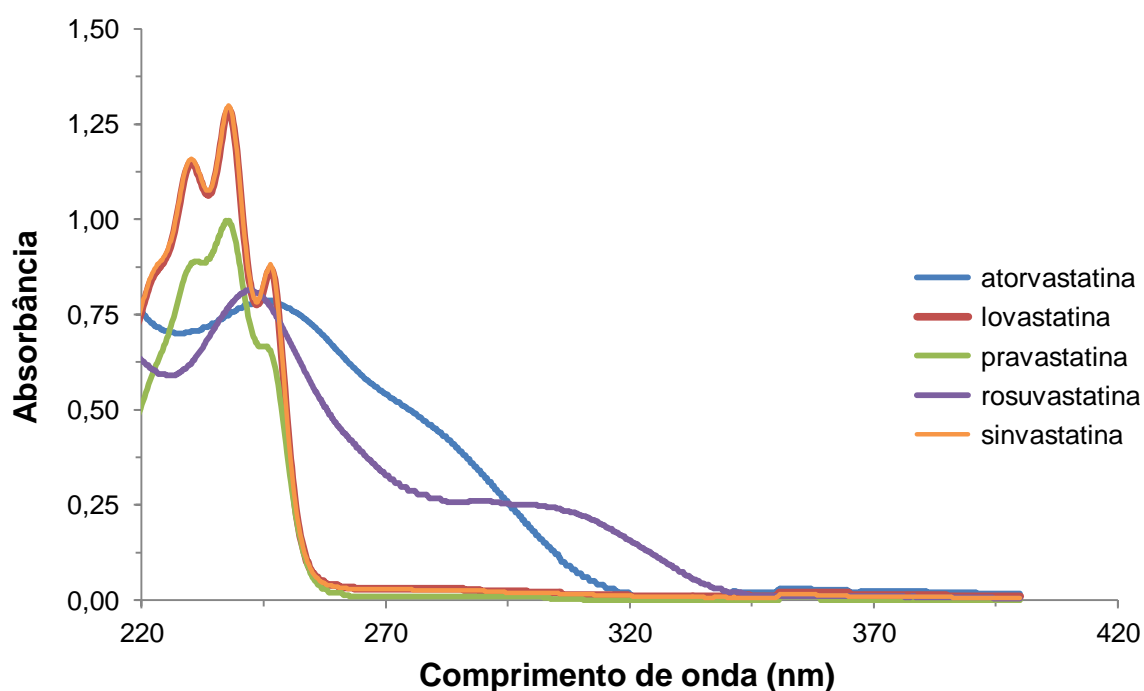
## 2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.1 Medidas espectrofotométricas de soluções padrão de estatinas

Para determinar os comprimentos de onda relativos à absorção máxima na região do UV-vis pelas estatinas, foram realizadas medidas espectrofotométricas de soluções padrão a  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  em acetonitrila:solução fosfato de potássio 0,1 M pH 2,5 (40:60) utilizando esta mesma solução como branco. Os espectros de absorção na região do ultravioleta dos fármacos atorvastatina, lovastatina, pravastatina, rosuvastatina e sinvastatina estão representados na **Figura 38**. Os máximos de absorção foram de 242 nm para a ATO e ROS e 237 nm para a LOV, PRA e SIN.

Como o comprimento de onda de máxima absorção para a maioria das estatinas do estudo foi 237 nm, este foi então selecionado para o monitoramento destes fármacos nos métodos cromatográficos desenvolvidos.

**Figura 38** – Espectros de absorção da atorvastatina, lovastatina, pravastatina, rosuvastatina e sinvastatina a  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  em acetonitrila:solução fosfato de potássio 0,1 M pH 2,5 (40:60).

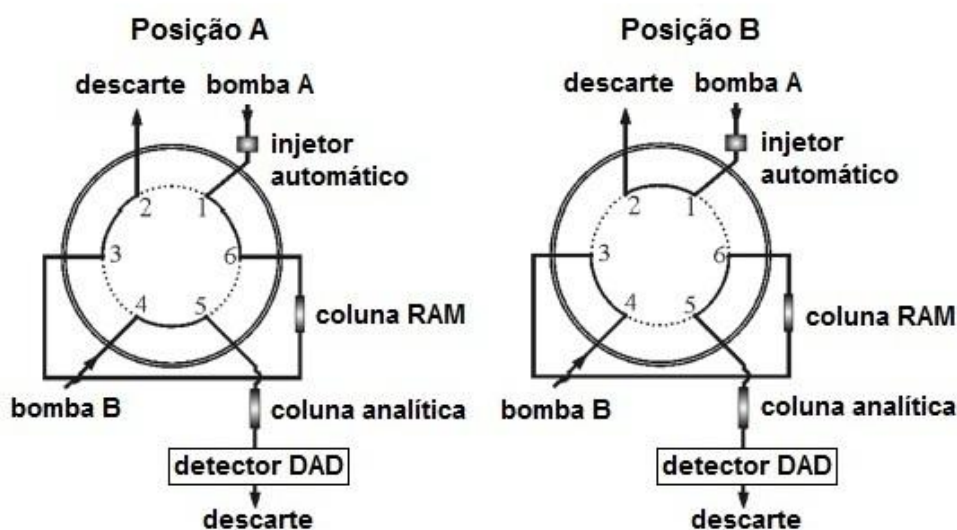


## 2.2 Desenvolvimento e comparação de métodos empregando os modos de eluição *backflush* e *foreflush* do sistema de *column-switching*

O sistema *column-switching* foi instalado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu 10A VP utilizando uma válvula de 6 vias e 2 posições, controladora, duas bombas e desgaseificadores, forno, injetor automático e detector DAD. No sistema bidimensional, dois modos de eluição da fase móvel são possíveis: *backflush* e *foreflush*. As **figuras 39 e 40** apresentam esquemas destes dois modos.

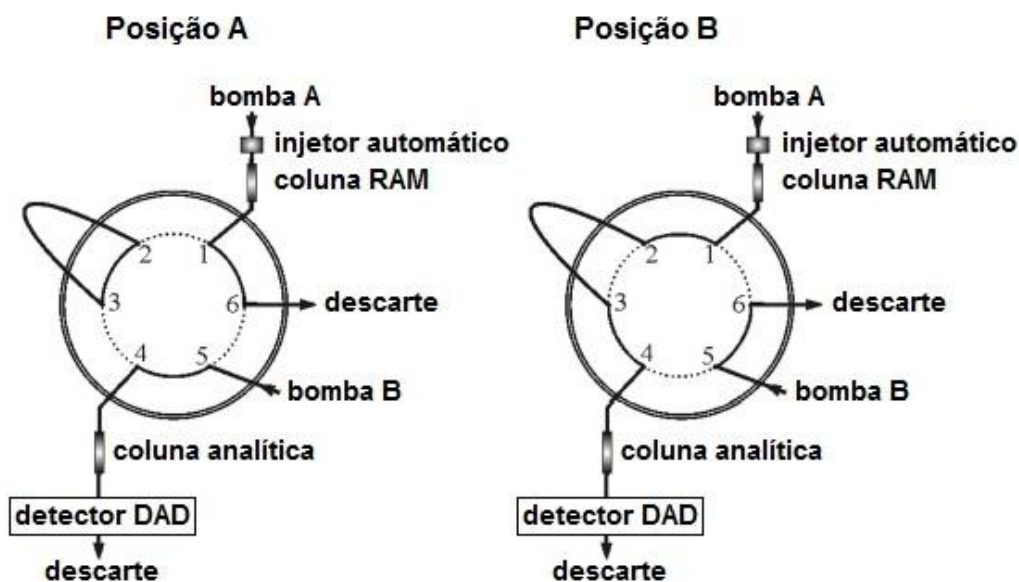
No modo de eluição *backflush*, em um primeiro momento (posição A), o plasma é injetado na coluna RAM, carreado pela fase móvel aquosa proveniente da bomba A. Como a FM aquosa é muito fraca, os analitos hidrofóbicos tendem a se concentrar na cabeça da coluna RAM ao passo que as macromoléculas da amostra são descartadas. Simultaneamente a este processo, a coluna analítica está sendo condicionada com a fase móvel de eluição e separação cromatográfica, impulsionada pela bomba B. Em um segundo momento (posição B), a fase móvel (B) é direcionada à coluna RAM no sentido contrário ao da fase aquosa, eluindo os analitos para a coluna analítica. Em seguida ocorre a separação dos fármacos e a detecção.

**Figura 39** – Esquema da configuração do sistema *column-switching* no modo de eluição *backflush*.



No modo de eluição *foreflush*, o plasma é injetado na coluna RAM e carregado pela fase móvel aquosa. As micromoléculas se concentram na cabeça da coluna RAM e os demais compostos da matriz são descartados. Na posição B da válvula, a fase móvel (B) é direcionada à coluna RAM, porém em sentido inverso ao que ocorre no modo *backflush*, da cabeça à porção terminal da RAM, eluindo os analitos em toda a extensão da coluna RAM e em seguida para a coluna analítica, ocorrendo a separação cromatográfica e a detecção.

**Figura 40** – Esquema da configuração do sistema de *column-switching* no modo de eluição *foreflush*.



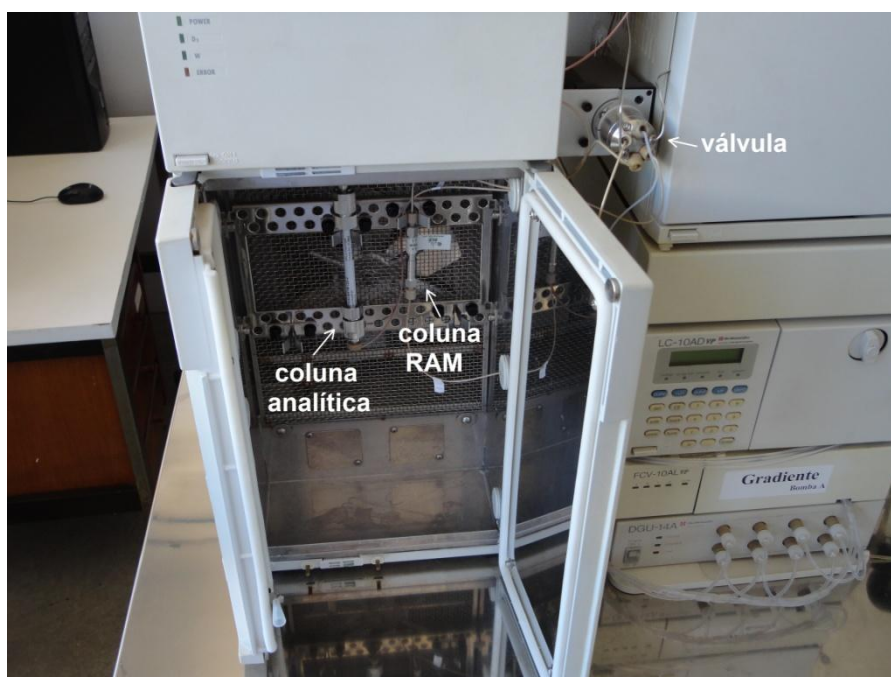
Assim, estes dois modos de eluição do sistema bidimensional se diferem na extensão da interação entre os analitos e a fase hidrofóbica presente no suporte RAM, uma vez que a interação é muito maior quando se emprega o modo *foreflush*.

A **Figura 41** ilustra o sistema *column-switching* montado. A válvula e as colunas RAM e analítica são destacadas na **Figura 42**.

**Figura 41** – Fotografia do sistema *column-switching* montado.



**Figura 42** – Fotografia do sistema de *column-switching* montado com destaque da válvula e das colunas RAM e analítica.



Foram desenvolvidos e avaliados dois métodos cromatográficos para a separação de atorvastatina, lovastatina, pravastatina, rosuvastatina e sinvastatina em plasma humano empregando cromatografia líquida bidimensional. Em um deles foi empregado o modo de eluição *backflush* e, no outro, *foreflush*. Os dois modos de eluição foram avaliados empregando coluna RAM-BSA *homemade* e RAM-ADS comercial.

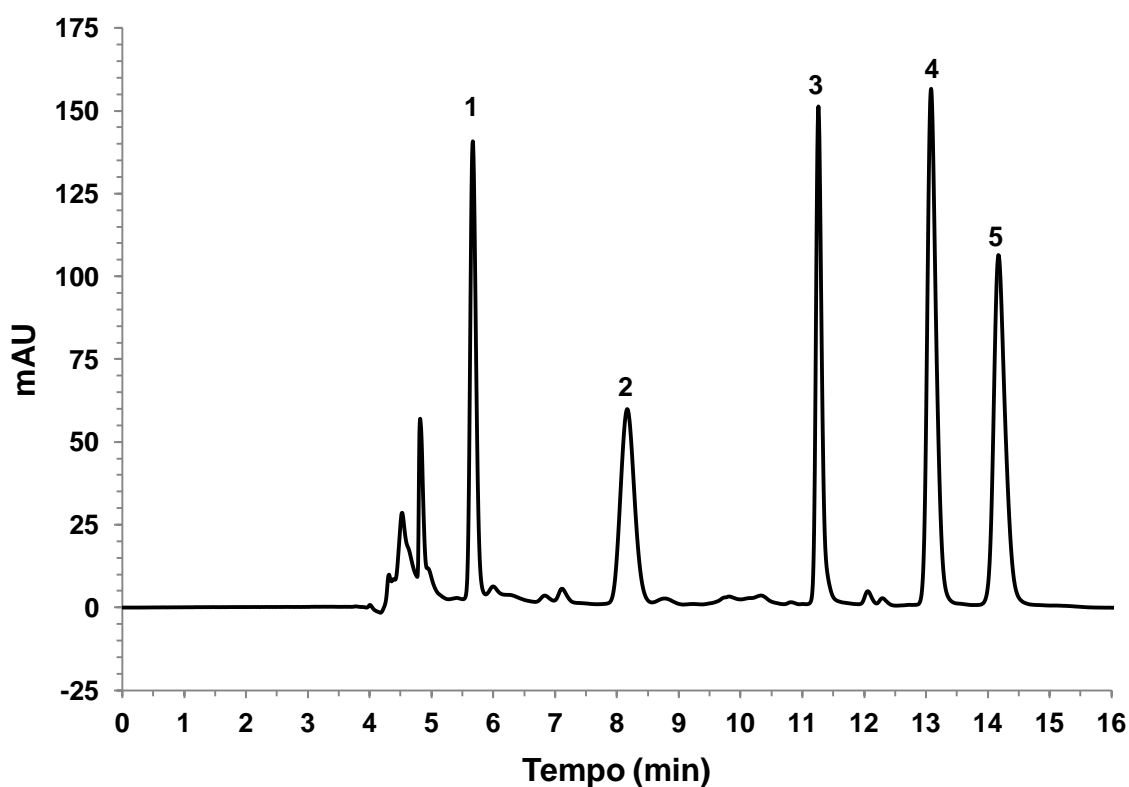
Das fases móveis testadas, misturas em diversas proporções de solução fosfato de potássio 0,1 M pH 2,5 com metanol ou acetonitrila ou metanol e acetonitrila, aquela que apresentou melhor separação dos cinco analitos em tempo de análise apropriado foi o gradiente da FM binária acetonitrila:solução fosfato de potássio 0,1 M pH 2,5.

As condições cromatográficas foram as mesmas para os dois métodos: tempo de viragem da válvula de 3 min, gradientes das **tabelas 7 e 8** como fase móvel (B) para, respectivamente, os modos *backflush* e *foreflush*, água deionizada como fase móvel (A), vazão de 1,0 mLmin<sup>-1</sup>, volume de injeção de 20 µL, temperatura do forno de 35°C e comprimento de onda de 237 nm.

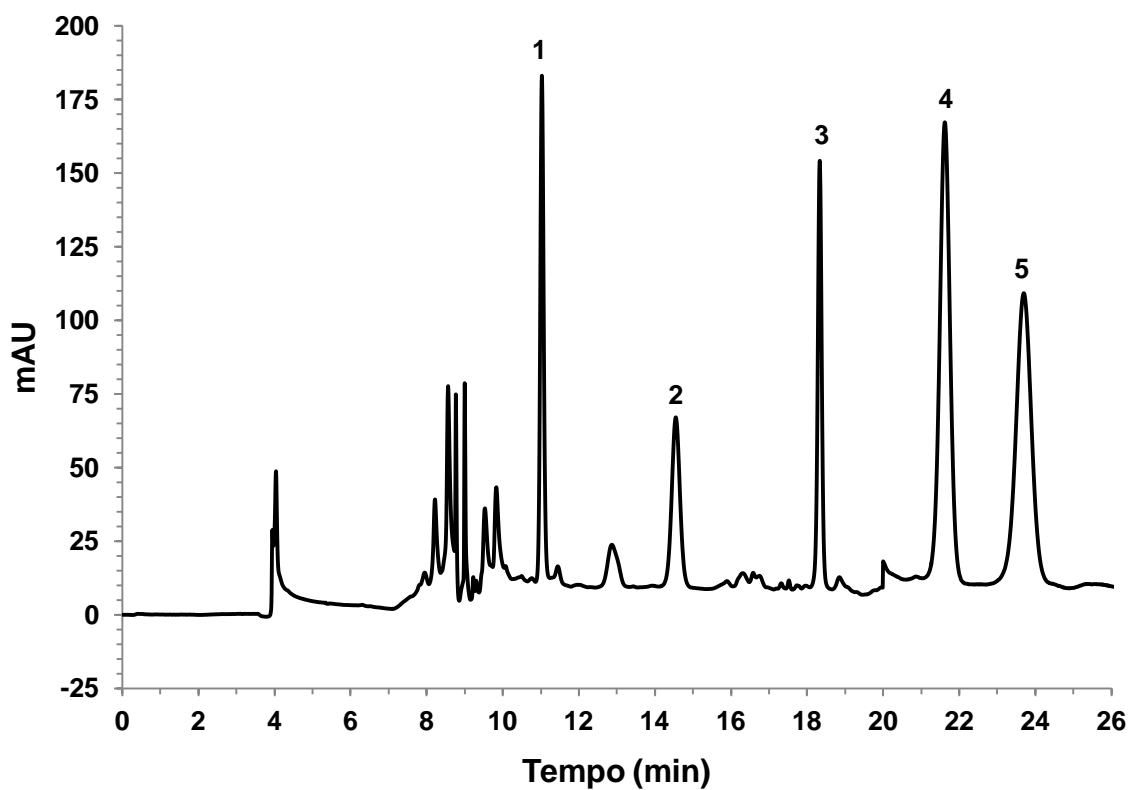


Os cromatogramas do plasma branco fortificado com estatinas, obtidos com os métodos desenvolvidos empregando os modos de eluição *backflush* e *foreflush*, estão representados, respectivamente, nas **figuras 43 e 44**.

**Figura 43** – Cromatograma típico de plasma branco fortificado com estatinas a  $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  obtido com o método bidimensional no modo *backflush*. (1) PRA, (2) ROS, (3) ATO, (4) LOV e (5) SIN.



**Figura 44** – Cromatograma típico de plasma branco fortificado com estatinas a  $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  obtido com o método bidimensional no modo *foreflush*. (1) PRA, (2) ROS, (3) ATO, (4) LOV e (5) SIN.



Os parâmetros cromatográficos obtidos para as cinco estatinas, para os dois modos de eluição e para as duas colunas RAM estão representados na **Tabela 14**.

**Tabela 14** – Parâmetros cromatográficos das estatinas nos modos de eluição *backflush* e *foreflush* empregando colunas RAM-BSA e RAM-ADS.

Parâmetro	<i>backflush</i>	<i>foreflush</i>	<i>backflush</i>	<i>foreflush</i>
	RAM-BSA	RAM-BSA	RAM-ADS	RAM-ADS
atorvastatina				
<i>N</i>	66622	142182	55601	37994
<i>As</i>	1,36	1,06	1,49	1,69
<i>Res</i>	10,08	12,74	12,86	8,26
<i>t<sub>R</sub></i>	11,24	18,32	11,03	17,57
lovastatina				
<i>N</i>	38783	29539	32563	17089
<i>As</i>	1,33	1,03	1,40	1,36
<i>Res</i>	8,29	9,43	7,77	4,54
<i>t<sub>R</sub></i>	13,06	21,62	12,86	19,76
pravastatina				
<i>N</i>	16127	64151	13383	27073
<i>As</i>	1,26	1,14	1,57	2,31
<i>Res</i>	–	–	–	–
<i>t<sub>R</sub></i>	5,65	11,01	5,32	10,56
rosuvastatina				
<i>N</i>	5643	20854	8060	6274
<i>As</i>	1,10	1,01	1,41	1,83
<i>Res</i>	8,13	12,16	8,85	5,90
<i>t<sub>R</sub></i>	8,16	14,52	7,64	13,31
sinvastatina				
<i>N</i>	27540	15904	23086	11978
<i>As</i>	1,32	1,01	1,40	1,45
<i>Res</i>	3,60	3,31	3,37	1,88
<i>t<sub>R</sub></i>	14,15	23,69	13,96	21,05

Foram considerados como referências e ideais os valores de número de pratos teóricos,  $N \geq 7000$ , resolução entre os picos,  $Res \geq 2,0$  e fator de assimetria a 10%,  $As \approx 1,0$ , contudo, valores de  $As < 2$  são aceitáveis.<sup>18</sup>

De maneira geral, ambas as colunas e os dois modos de eluição apresentaram valores adequados de  $N$ ,  $As$  e  $Res$ . Porém, empregando a coluna RAM-BSA, esses resultados se aproximaram mais dos valores ideais utilizando o modo *foreflush*. O contrário foi observado para a coluna RAM-ADS em que o modo *backflush* se mostrou mais satisfatório quanto ao desempenho cromatográfico. Diante desta pequena diferença entre os modos de eluição, o tempo total de análise foi então o fator mais crítico na seleção de um deles para se empregar no método a ser validado para a determinação de estatinas em plasma humano. Tanto quando foi empregada a coluna RAM-BSA quanto a RAM-ADS, o tempo total da corrida foi de 16 minutos para o modo *backflush* e de 26 minutos para o *foreflush*. Assim, como um dos principais objetivos do uso do sistema bidimensional com colunas RAM para o preparo de amostra é a redução do tempo da análise de fármacos em matrizes complexas, o modo *backflush* foi o mais adequado.

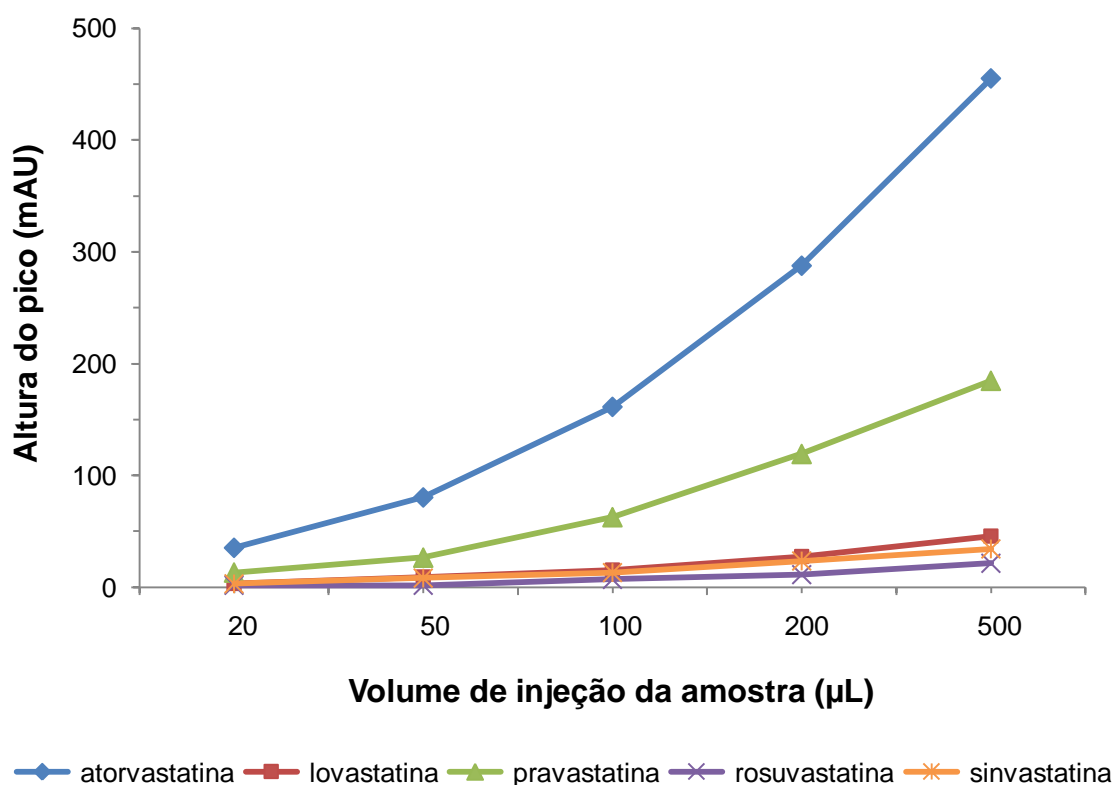
### 2.3 Avaliação dos volumes de injeções de amostras de estatinas

Os fármacos da classe das estatinas apresentam baixas concentrações plasmáticas, na ordem de ppb (partes por bilhão). A concentração plasmática máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ), administrando o medicamento referência das estatinas, em estudos de bioequivalência, foi de  $19,33 \pm 2,27 \text{ ngmL}^{-1}$  para comprimidos de lovastatina 80 mg;  $123,52 \pm 52,78 \text{ ngmL}^{-1}$  para comprimidos de pravastatina 40 mg;  $16,53 \pm 7,20 \text{ ngmL}^{-1}$  para comprimidos de rosuvastatina 10 mg e  $4,01 \pm 1,74 \text{ ngmL}^{-1}$  para comprimidos de sinvastatina 20 mg.<sup>78-81</sup>

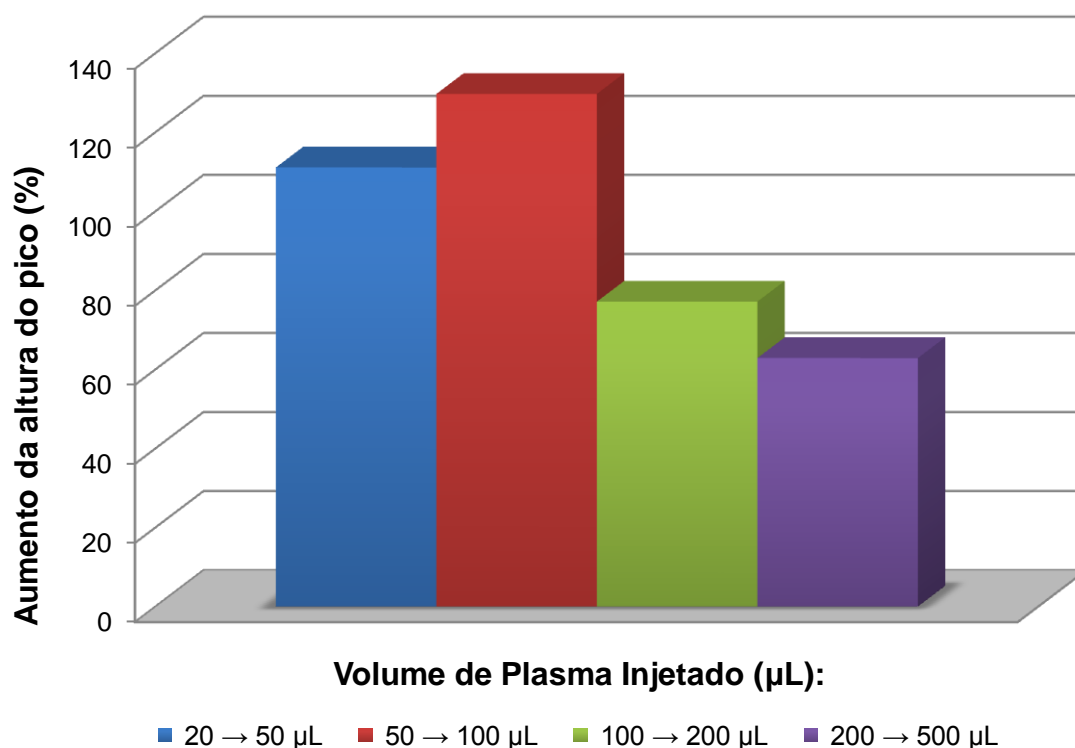
Portanto, para aumentar a detectabilidade do método, foi avaliado o perfil dos picos cromatográficos das cinco estatinas em relação à altura e assimetria a 10% das bandas cromatográficas, de acordo com o volume injetado da amostra na concentração de CQM (20, 50, 100, 200 e 500  $\mu\text{L}$ ).

O aumento da altura do pico cromatográfico das cinco estatinas está representado na **Figura 45**. Para todos estes fármacos houve um aumento significativo da altura do pico quando o volume de injeção foi aumentado. A **Figura 46** apresenta o aumento, em termos de porcentagem, quando o volume de injeção foi aumentado. Esses aumentos observados justificaram o uso de grandes volumes de injeção da amostra na determinação de estatinas em plasma humano.

**Figura 45** – Altura dos picos de estatinas na concentração de CQM em função do volume de injeção das amostras.

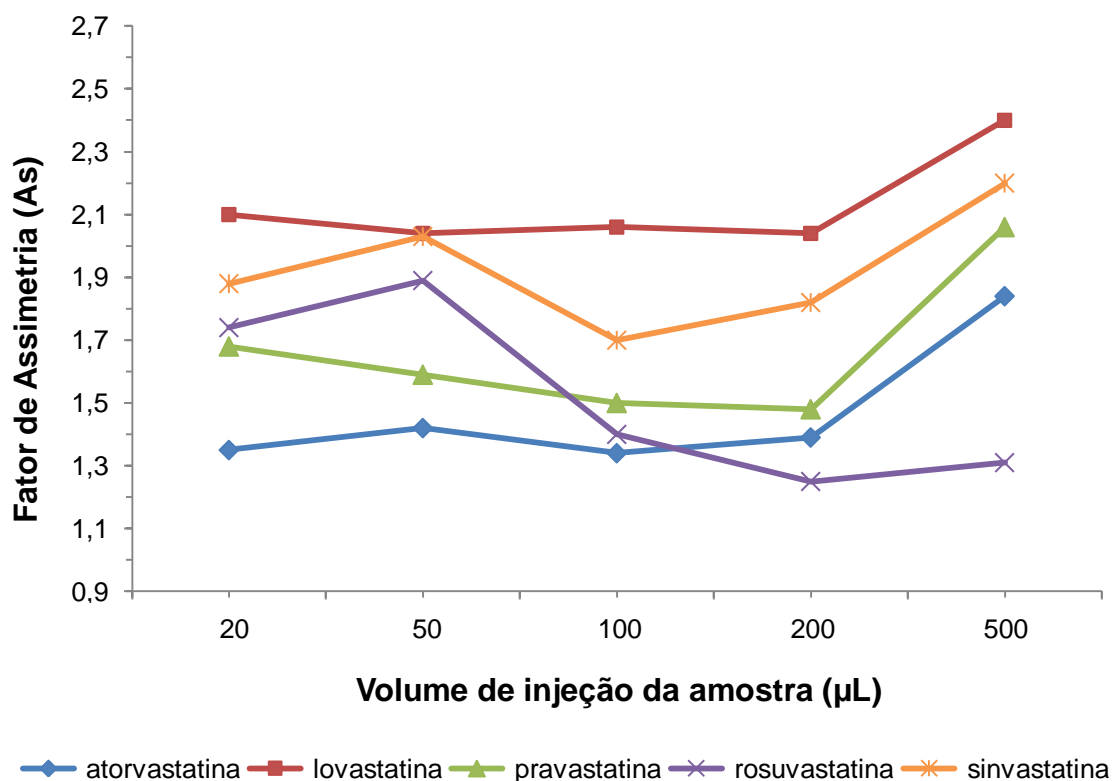


**Figura 46** – Aumento da altura dos picos de estatinas na concentração de CQM comparando-se volumes de injeção crescentes da amostra.



A injeção de grandes volumes de amostra no sistema cromatográfico, de forma geral, não afetou de forma drástica a *As* dos picos de ATO, LOV e ROS. Para a ATO e ROS, os valores de *As* obtidos para os cinco volumes de injeção foram inferiores ao valor aceitável para este parâmetro ( $As < 2$ ), enquanto que para a LOV, os valores de *As* tiveram uma pequena oscilação próxima a esse valor de referência. Entretanto, para a PRA e SIN, com a injeção de 500 µL da amostra, o valores de *As* excederam o valor aceitável, como pode ser observado na **Figura 47**.

**Figura 47** – Fator de assimetria de estatinas na concentração de CQM em função do volume de injeção das amostras.



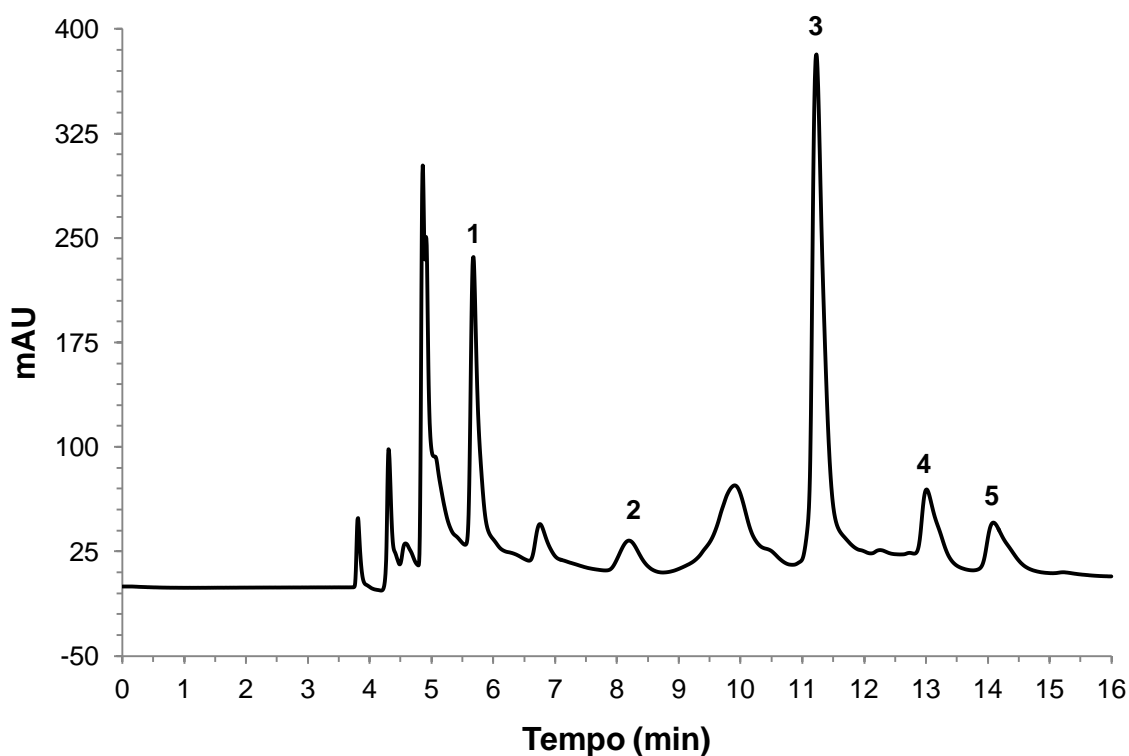
Apesar dos picos terem ficado menos simétricos com o aumento do volume de injeção, foi escolhido o de 500 microlitros, pois este volume permitiu aumentar a detectabilidade do método.

#### 2.4 Condições cromatográficas para validação do método

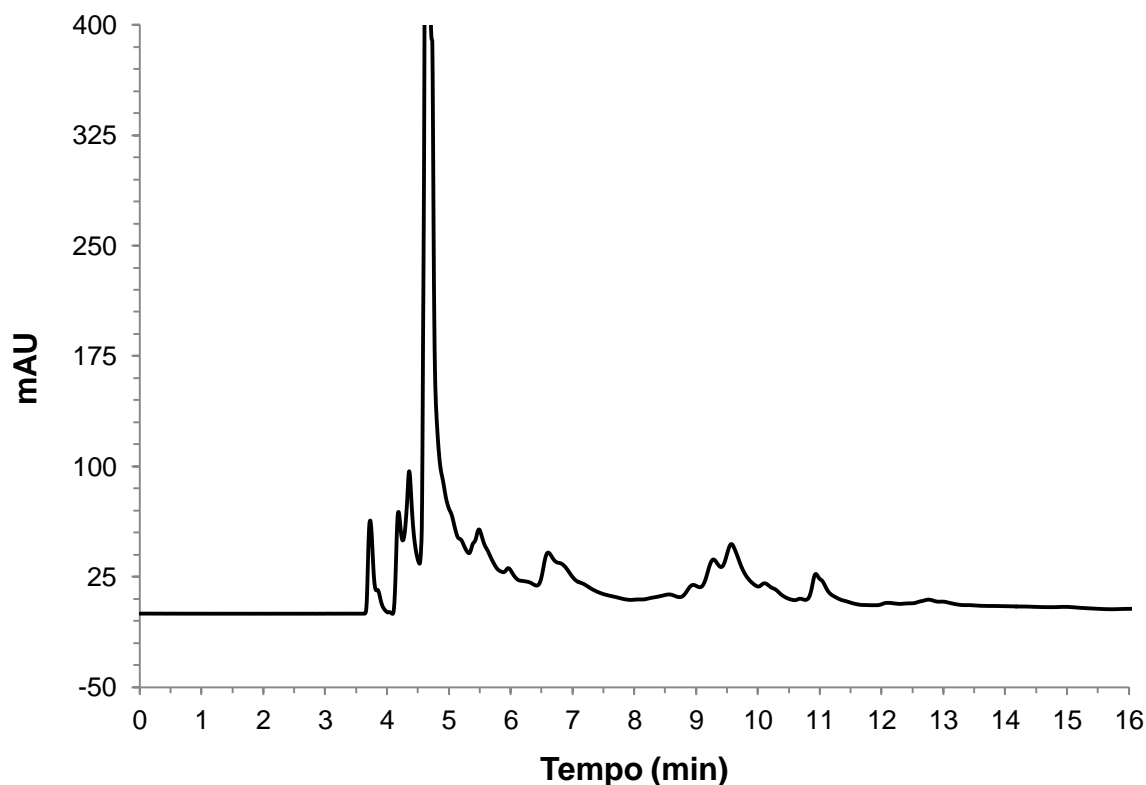
Foram selecionadas as condições cromatográficas desenvolvidas e otimizadas, anteriormente descritas, empregando o modo *backflush* de eluição do sistema bidimensional para a validação do método. Porém, houve uma alteração no mesmo. A fase móvel (A) do método, a qual era composta apenas por água deionizada, passou a ser composta por água deionizada pH 2,5, ajustado com ácido fosfórico PA, para assegurar a mínima conversão das formas lactona em hidroxilactona das

estatinas durante o período de injeção das amostras na coluna RAM e exclusão das macromoléculas. A **Figura 48** representa um cromatograma típico de plasma branco fortificado com estatinas na concentração de CQM utilizando a atorvastatina como padrão interno para a determinação bioanalítica de lovastatina, pravastatina, rosuvastatina e sinvastatina. Os tempos de retenção cromatográfica, em minutos, foram de 5,33 para a PRA; 7,55 para a ROS; 10,86 para a ATO; 12,59 para a LOV e 13,66 par a SIN. O cromatograma do plasma branco está ilustrado pela **Figura 49**.

**Figura 48** – Cromatograma típico de plasma branco fortificado com estatinas na concentração de CQM. (1) PRA, (2) ROS, (3) ATO, (4) LOV e (5) SIN.





**Figura 49** – Cromatograma típico do plasma branco de estatinas.

## 2.5 Critérios de desempenho para validação bioanalítica

### 2.5.1 Seletividade

O estudo da seletividade foi realizado avaliando a presença de compostos interferentes com o mesmo tempo de retenção dos analitos e PI na amostra LIQ. Para este teste foram utilizadas quatro amostras branco normais, uma lipêmica e uma hemolisada.

Para os analitos rosuvastatina, lovastatina e sinvastatina, não houve interferência em nenhuma das amostras branco. Por outro lado, nas quatro amostras branco normais foi observada a presença de compostos no tempo de retenção da pravastatina, cujas respostas foram de 12,53; 6,84; 4,27, e 3,09% da resposta desse analito na amostra LIQ. Da mesma forma, as amostras branco lipêmica e

hemolisada apresentaram interferências no tempo de retenção da atorvastatina, as quais corresponderam, respectivamente, a respostas de 0,27 e 4,77% da resposta do PI na amostra LIQ analisada. Contudo, todas as interferências observadas, foram inferiores aos limites aceitáveis pela RDC<sup>56</sup> 27 de 2012, que são de 20% para os analitos e 5% para o PI.

A seletividade do método também pode ser comprovada se a banda cromatográfica de um analito não interferir na banda de outros. Assim sendo, a partir da análise de uma amostra CQM, foram calculadas as resoluções entre os picos de PRA e ROS, ROS e ATO, ATO e LOV e entre LOV e SIN, as quais foram, respectivamente, de 7,97; 11,46; 5,38 e 2,14. Foi novamente demonstrada a seletividade do método, uma vez que todos os valores de *Res* estão acima do limite mínimo aceitável ( $Res > 2,0$ )<sup>18</sup>.

### **2.5.2 Efeito residual**

O efeito residual foi avaliado analisando amostras branco injetadas antes e após injeção e corrida de uma amostra LSQ. Como no estudo de seletividade, foi investigada a presença de compostos nas amostras branco interferindo no tempo de retenção dos analitos e PI na amostra LIQ.

Não houve presença de interferentes no  $t_R$  da ATO, LOV, ROS e SIN em nenhuma das três amostras branco. Contudo, houve eluição de compostos com  $t_R$  próximo ao da PRA na amostra branco injetada antes da amostra LSQ, na amostra branco injetada após LSQ e na segunda amostra branco pós LSQ, cujas respostas foram, respectivamente, de 3,09, 4,78 e 6,28% da resposta da pravastatina na amostra LIQ.

Porém, as três interferências observadas, foram inferiores ao limite aceitável pela RDC<sup>56</sup> 27 de 2012, que é de 20% para analitos.

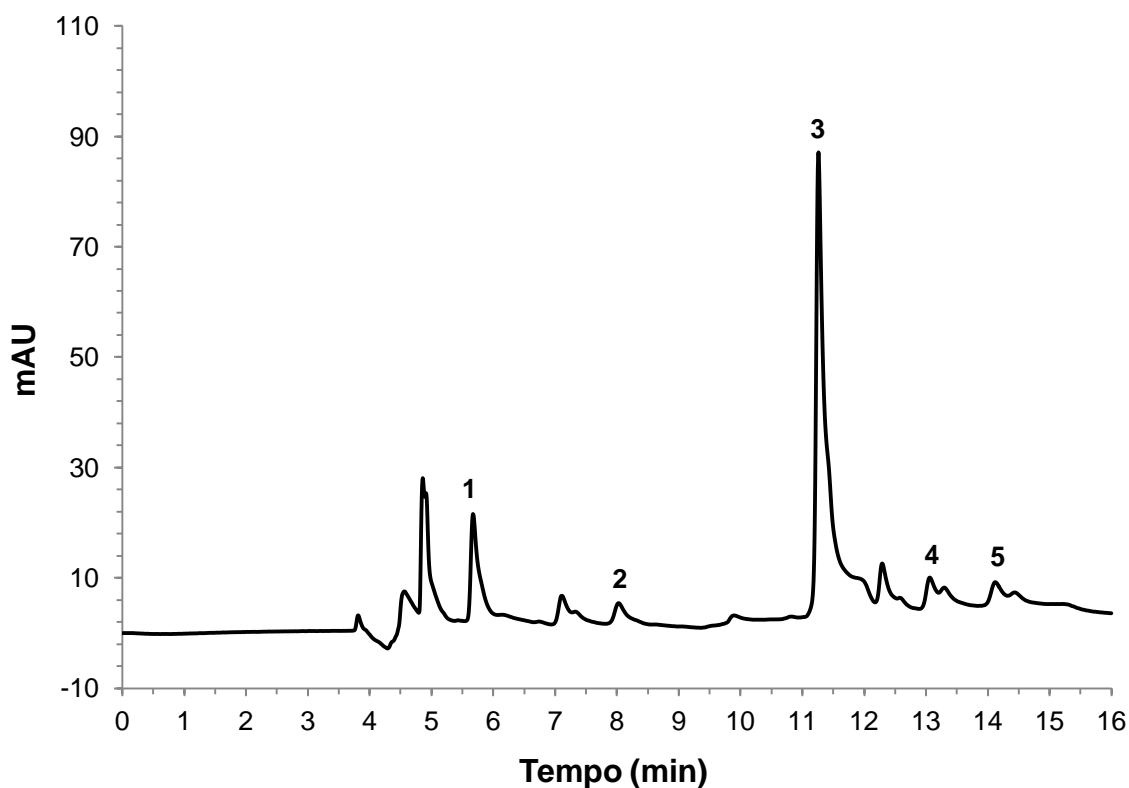
### 2.5.3 Efeito matriz

O efeito matriz deve ser avaliado comparando a resposta dos analitos em amostras CQB e CQA em plasma em relação à resposta destes analitos em solução aquosa nas mesmas concentrações. Foram então testadas como fase aquosa para o estudo, água deionizada pura, mistura de água e metanol (50:50) e mistura de água e acetonitrila (50:50). Porém, com o uso do sistema bidimensional, algumas estatinas não demonstraram estabilidade nestas soluções aquosas, tanto na concentração de CQB como na de CQA e seus picos cromatográficos apresentaram formas diferentes da curva Gaussiana comum à técnica. Por fim, foram ainda testadas análises dos fármacos em metanol e ACN puros e os resultados obtidos foram semelhantes aos das soluções aquosas.

Portanto, o cálculo do FMN teve sua realização inviabilizada; conseqüentemente, não foi possível concluir o estudo de efeito matriz.

A **Figura 50** representa um cromatograma onde é possível perceber que os picos da lovastatina (4) e sinvastatina (5) em metanol não tiveram perfil adequado, possivelmente pela conversão de sua forma lactona em hidroxiácida.

**Figura 50** – Cromatograma de estatinas em metanol na concentração de CQB. (1) PRA, (2) ROS, (3) ATO, (4) LOV e (5) SIN.



#### 2.5.4 Curva de calibração

As curvas de calibração ou linearidade foram obtidas após a análise, em três dias distintos, de padrões de calibração em sete níveis crescentes de concentração. Para controle da corrida analítica foram também analisadas uma amostra branco e uma amostra zero, porém suas respostas não participaram da construção da equação das curvas.

As concentrações dos fármacos foram igualmente espaçadas para evitar “efeito alavanca”, intervalos desiguais entre concentrações consecutivas, o que pode acarretar em um pior ajuste dos dados experimentais ao modelo. Os pontos da linearidade apresentaram então, concentração de 125, 250, 376, 500, 626, 750 e 876  $\text{ngmL}^{-1}$  para LOV, ROS e SIN; 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750 e 2000  $\text{ngmL}^{-1}$  para PRA e 5000  $\text{ngmL}^{-1}$  de ATO como padrão interno.

As massas dos padrões de estatinas pesadas foram corrigidas quanto à pureza das substâncias utilizadas e ao cátion do sal das estatinas ATO, PRA e ROS (cálcio, sódio e cálcio, respectivamente) na execução dos cálculos de calibração.

Para o estudo da linearidade foi empregado o método dos mínimos quadrados ordinários, em conformidade com a RDC<sup>56</sup> 27 de 2012, adotando para o eixo das abscissas as concentrações do fármaco e para o eixo das ordenadas as respostas relativas do analito (razões da resposta do analito pela resposta do PI). Porém, a adequação dos dados obtidos ao modelo linear foi investigada de maneira mais minuciosa. De acordo com SOUZA e JUNQUEIRA<sup>76</sup>, para se investigar a adequação ao modelo adotado, deve-se, após o tratamento de *outliers*, avaliar se os dados experimentais apresentam normalidade, homocedasticidade e independência dos resíduos. Assim, o diagnóstico de *outliers* foi realizado pelo teste do Resíduo padronizado de *Jackknife*, a normalidade, homocedasticidade e independência dos resíduos por meio dos testes de *Ryan-Joiner*, *Brown-Forsythe* e *Durbin-Watson*, respectivamente. O ajuste ao modelo foi então averiguado por ANOVA avaliando o desvio da linearidade.

Não houve *outliers* entre os padrões de calibração da LOV, porém, para a PRA, três dos padrões foram excluídos segundo o teste aplicado e para a ROS e SIN, os valores discrepantes corresponderam a quatro dos 21 padrões analisados. Para todos os analitos, a remoção de dados *outliers*, pelo teste de *Jackknife*, foi apropriada, o teste aceita remoção de até 22%, ou seja, quatro resultados do total de dados experimentais.

Os resíduos seguiram a distribuição normal para todas as estatinas em estudo, uma vez que foram obtidos valores de 0,9821, 0,9858, 0,9784 e 0,9587 para a estatística  $R_{e'q}$  do teste de *Ryan-Joiner*, para a LOV, PRA, ROS e SIN, respectivamente. Uma vez que  $R_{e'q} \geq R_{\text{crítico}}$  (0,9461, a 95% de confiança), não há rejeição da hipótese nula de normalidade dos resíduos e os dados seguem a normal.

Foram obtidos valores de 1,8915 ( $p = 0,07$ ), 0,5291 ( $p = 0,60$ ), 0,6196 ( $p = 0,55$ ) e 0,1432 ( $p = 0,89$ ) para a estatística  $t_L$  do teste de *Brown-Forsythe* para LOV, PRA, ROS e SIN, respectivamente. Se  $p > 0,05$ , não há rejeição da hipótese nula de homocedasticidade, portanto houve homocedasticidade dos resíduos para estes quatro fármacos a 95% de confiança.

Para a independência dos resíduos, se  $d_u < d_{calc} < 4 - d_u$ , ou seja, a estatística  $d$  calculada ( $d_{calc}$ ) do teste de *Durbin-Watson* for maior que  $d$  crítico superior ( $d_u$ ) e menor que  $4 - d_u$ , não há rejeição da hipótese nula de não autocorrelação dos resíduos. Os valores de  $d_{calc}$ ,  $d_u$  e  $4 - d_u$  para os quatro analitos se encontram na **Tabela 15**. A 95% de confiança, os resíduos não apresentaram autocorrelação (foram independentes) para os quatro analitos em estudo.

**Tabela 15** – Valores das estatísticas  $d_{calc}$ ,  $d_u$  e  $4 - d_u$  do teste de independência dos resíduos de *Durbin-Watson*.

Analito	$d_u$	$d_{calc}$	$4 - d_u$
lovastatina	1,420	1,769	2,580
pravastatina	1,391	2,359	2,609
rosuvastatina	1,380	1,542	2,620
sinvastatina	1,380	1,402	2,620

Na avaliação da adequação ao modelo linear por ANOVA, se a estatística  $p > 0,05$ , não há rejeição da hipótese nula de regressão não significativa, ou seja, o modelo adotado é adequado. Foram obtidos valores da estatística  $F$  de 3,4197 ( $p = 0,03$ ), 1,5045 ( $p = 0,27$ ), 2,3465 ( $p = 0,12$ ) e 4,7631 ( $p = 0,02$ ) para LOV, PRA, ROS e SIN, respectivamente. Portanto, o modelo linear adotado demonstrou ajuste adequado apenas para a pravastatina e rosuvastatina. Para a lovastatina e sinvastatina houve desvio da linearidade.

Ainda assim, como a RDC<sup>56</sup> 27 de 2012 não exige essa avaliação estatística para adequação do modelo, as equações obtidas para os quatro fármacos foram utilizadas na quantificação destes analitos nas amostras dos estudos de precisão, exatidão e estabilidade do analito em matriz na validação.

Contudo, esta RDC preconiza que 75% (16 dos 21 utilizados no estudo) dos padrões de calibração, dos quais, pelo menos um de cada concentração, apresentem desvio menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para os padrões de LIQ e 15% para os demais padrões. As concentrações das triplicatas dos sete pontos do estudo de linearidade foram estimadas pelas equações da calibração e estão

representadas na **tabela 16, 17, 18 e 19** para LOV, PRA, ROS e SIN, respectivamente, juntamente com o desvio dessas concentrações em relação ao valor nominal.

**Tabela 16** – Concentrações (C) em ngmL<sup>-1</sup> e desvio (%) em relação ao valor da concentração nominal das triplicatas dos sete padrões do estudo da linearidade para a lovastatina.

Padrão	C	Desvio	Padrão	C	Desvio	Padrão	C	Desvio
1.1	158,44	26,75	3.2	352,10	-6,36	5.3	604,73	-3,40
1.2	148,44	18,75	3.3	353,23	-6,06	6.1	775,73	3,43
1.3	147,55	18,04	4.1	517,93	3,59	6.2	702,50	-6,33
2.1	252,31	0,92	4.2	485,87	-2,83	6.3	771,25	2,83
2.2	251,04	0,42	4.3	518,14	3,63	7.1	912,05	4,11
2.3	253,29	1,32	5.1	592,53	-5,35	7.2	908,01	3,65
3.1	370,66	-1,42	5.2	597,23	-4,60	7.3	869,41	-0,75

**Tabela 17** – Concentrações (C) em ngmL<sup>-1</sup> e desvio (%) em relação ao valor da concentração nominal das triplicatas dos sete padrões do estudo da linearidade para a pravastatina.

Padrão	C	Desvio	Padrão	C	Desvio	Padrão	C	Desvio
1.1	510,60	2,12	3.2	1025,22	2,52	5.3	1640,49	9,37
1.2	516,54	3,31	3.3	994,28	-0,57	6.1	1641,36	-6,21
1.3	636,54	27,31	4.1	1298,60	3,89	6.2	1725,42	-1,40
2.1	696,77	-7,10	4.2	1304,80	4,38	6.3	1915,38	9,45
2.2	699,96	-6,67	4.3	1279,23	2,34	7.1	1845,98	-7,70
2.3	773,89	3,19	5.1	1405,36	-6,31	7.2	1930,12	-3,49
3.1	905,82	-9,42	5.2	1505,51	0,37	7.3	2134,67	6,73

**Tabela 18** – Concentrações (C) em  $\text{ngmL}^{-1}$  e desvio (%) em relação ao valor da concentração nominal das triplicatas dos sete padrões do estudo da linearidade para a rosuvastatina.

Padrão	C	Desvio	Padrão	C	Desvio	Padrão	C	Desvio
1.1	137,54	10,03	3.2	365,11	-2,90	5.3	651,39	4,06
1.2	135,73	8,58	3.3	378,17	0,58	6.1	736,98	-1,74
1.3	129,81	3,84	4.1	502,69	0,54	6.2	742,48	-1,00
2.1	242,01	-3,19	4.2	497,69	-0,46	6.3	798,00	6,40
2.2	249,95	-0,02	4.3	481,52	-3,70	7.1	828,95	-5,37
2.3	247,59	-0,96	5.1	598,32	-4,42	7.2	835,20	-4,66
3.1	370,46	-1,47	5.2	612,01	-2,23	7.3	967,39	10,43

**Tabela 19** – Concentrações (C) em  $\text{ngmL}^{-1}$  e desvio (%) em relação ao valor da concentração nominal das triplicatas dos sete padrões do estudo da linearidade para a sinvastatina.

Padrão	C	Desvio	Padrão	C	Desvio	Padrão	C	Desvio
1.1	146,77	17,41	3.2	370,42	-1,48	5.3	626,66	0,11
1.2	145,46	16,37	3.3	351,77	-6,44	6.1	815,34	8,71
1.3	149,71	19,77	4.1	483,80	-3,24	6.2	682,44	-9,01
2.1	253,53	1,41	4.2	487,95	-2,41	6.3	776,34	3,51
2.2	238,69	-4,52	4.3	520,80	4,16	7.1	914,44	4,39
2.3	272,38	8,95	5.1	550,87	-12,00	7.2	903,77	3,17
3.1	353,39	-6,01	5.2	566,68	-9,48	7.3	897,78	2,49

Os desvios obtidos estão de acordo com o estabelecido pela RDC<sup>56</sup> 27, exceto pelos desvios da primeira replicata do LIQ da LOV e da terceira replicata do LIQ da PRA, os quais excederam o limite de 20%, porém as curvas são aceitas, pois poderiam ser excluídos até cinco padrões para cada fármaco. Foi notado que estes padrões de LIQ da LOV e PRA excluídos para a confecção da curva e da equação de calibração foram diferentes dos padrões considerados como *outliers* pelo teste de *Jackknife*. Dessa maneira, as curvas e equações elaboradas conforme a RDC<sup>56</sup> 27 de 2012 e conforme recomendações de SOUZA e JUNQUEIRA<sup>76</sup> diferem, ligeiramente, quanto aos valores de inclinação e intercepto (**Tabela 20**).

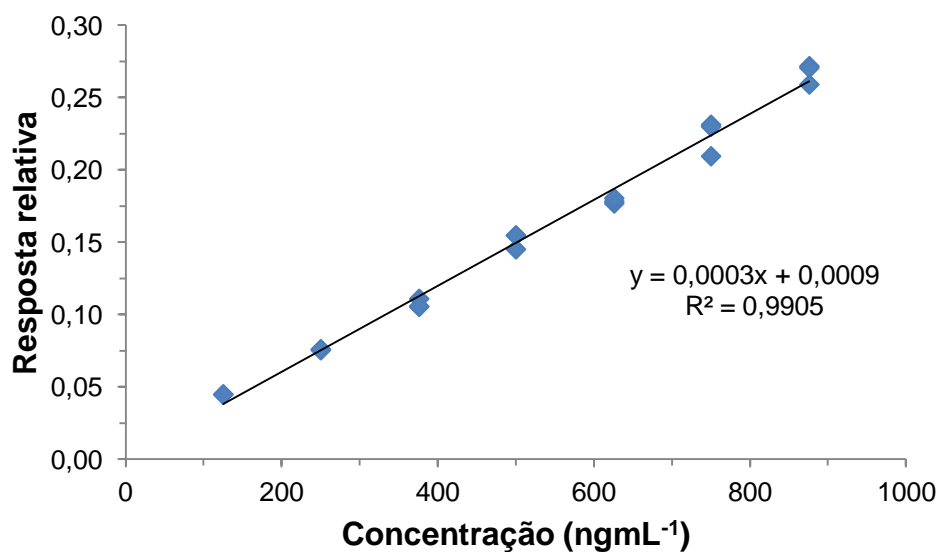


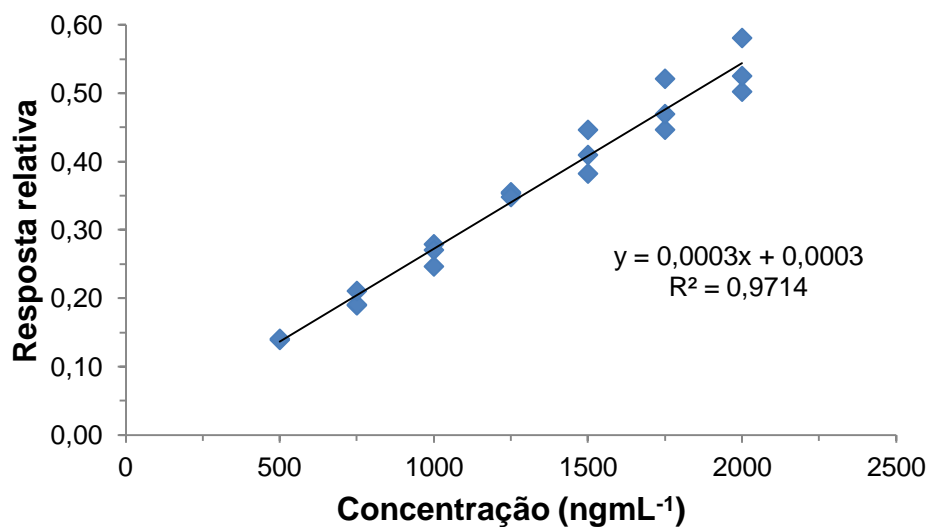
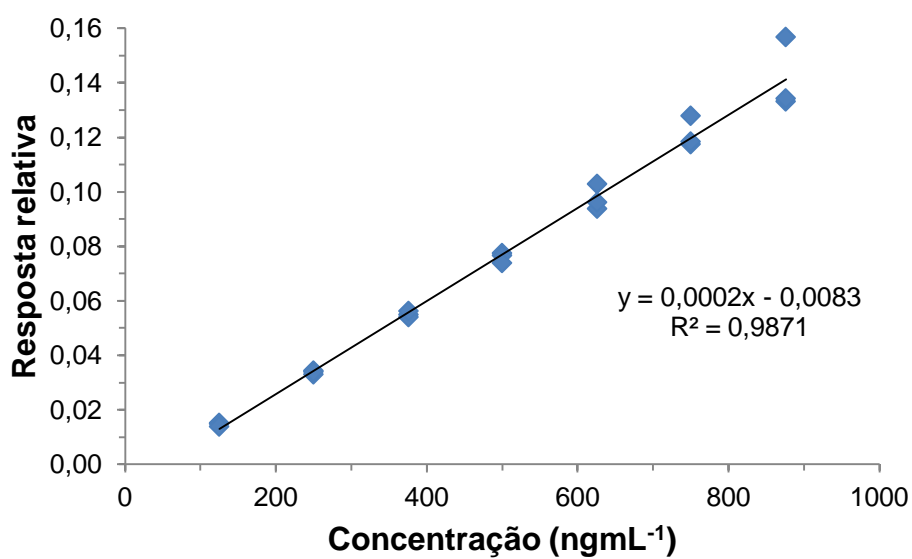
**Tabela 20** – Valores de coeficiente angular (*b*) e coeficiente linear (*a*) das equações de calibração das estatinas.

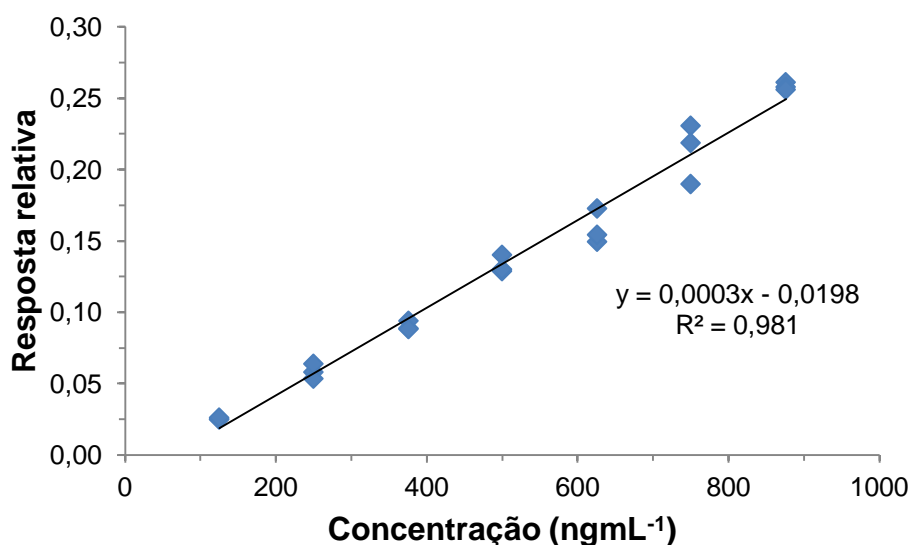
Referência	lovastatina		pravastatina		rosuvastatina		sinvastatina	
	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>
RDC 27	0,0003	0,0009	0,0003	0,0003	0,0002	-0,0083	0,0003	-0,0198
SOUZA <i>et al.</i>	0,0003	0,0030	0,0002	0,0215	0,0002	-0,0055	0,0003	-0,0202

As **figuras 51, 52, 53 e 54** representam as curvas de calibração obtidas para LOV, PRA, ROS e SIN, respectivamente.

**Figura 51** – Curva de calibração para a LOV em plasma utilizando ATO como padrão interno.



**Figura 52** – Curva de calibração para a PRA em plasma utilizando ATO como padrão interno.**Figura 53** – Curva de calibração para a ROS em plasma utilizando ATO como padrão interno.

**Figura 54** – Curva de calibração para a SIN em plasma utilizando ATO como padrão interno.

Muitos protocolos e diretrizes de validação recomendam de forma imprópria que a adoção do modelo linear para uma curva de calibração seja feita por meio da avaliação do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) ou de correlação ( $r$ ). Muitas vezes essa associação não é verdadeira, uma vez que modelos não lineares podem apresentar valores altos de  $R^2$ . Contudo, se os dados experimentais realmente seguem o modelo linear proposto, quanto mais próximo de 1 (um) for o coeficiente de determinação, tanto maior será a validade da regressão, ou seja, maior é o ajuste dos dados experimentados à curva analítica. Os valores de  $R^2$  e  $r$  obtidos após exclusão dos dados discrepantes de acordo com a RDC<sup>56</sup> 27 e com o teste de *Jackknife* estão representados na **Tabela 21**, assim como os coeficientes  $a$  e  $b$  da regressão, estes parâmetros também apresentaram pequena divergência em seus valores em relação à exclusão de *outliers*.

**Tabela 21** – Valores de coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e de correlação ( $r$ ) das equações de calibração das estatinas.

Referência	lovastatina		pravastatina		rosuvastatina		sinvastatina	
	$R^2$	$r$	$R^2$	$r$	$R^2$	$r$	$R^2$	$r$
RDC 27	0,9905	0,9952	0,9714	0,9856	0,9871	0,9935	0,9810	0,9904
SOUZA <i>et al.</i>	0,9906	0,9953	0,9843	0,9921	0,9987	0,9994	0,9950	0,9975

Para todos os analitos, o ajuste ao modelo linear foi adequado. Porém, comparando os valores de  $R^2$ , as curvas obtidas após exclusão de *outliers* de *Ryan-Joiner* se ajustaram melhor que as curvas traçadas após exclusão de dados experimentais discrepantes segundo a RDC<sup>56</sup> 27. Contudo, apesar de obtidos valores de  $R^2$  bem próximos de 1 (um) para a LOV e SIN, o desvio da linearidade da curva desses fármacos é significativo, sugerindo que os dados experimentais sigam a um outro modelo matemático, não o linear.

Entretanto, para uma resposta à legislação o método desenvolvido está adequado, em relação à curva de calibração, para a determinação de LOV, PRA, ROS e SIN em plasma humano.

### 2.5.5 Precisão e Exatidão

O estudo dos critérios de desempenho de validação precisão e exatidão foram conduzidos analisando seis replicatas de amostras nos cinco níveis de concentração: LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD. A experimentação foi realizada em três dias distintos contemplando a precisão e exatidão intra e intercorrida.

As concentrações de LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD corresponderam a, respectivamente, 125, 350, 530, 700 e 550 ngmL<sup>-1</sup> para LOV, ROS e SIN, 500, 1000, 1300, 1600 e 1350 ngmL<sup>-1</sup> para PRA.

Após o tratamento de *outliers* pelo teste de *Grubbs*, a precisão foi determinada por ANOVA e expressa na forma de DPR, simbolizada como DPR<sub>r</sub> para a intra corrida

ou repetitividade e  $DPR_R$  para a inter corrida ou reprodutibilidade parcial. A exatidão foi calculada por meio do EPR e, da mesma forma que a precisão, foi representada por  $EPR_r$  para a exatidão intra corrida e  $EPR_R$  para a inter corrida.

O teste de Grubbs não detectou, a 95% de confiança, dados experimentais discrepantes para nenhum analito em nenhum dos níveis de concentração estudados.

Os DPR e EPR foram então determinados, em porcentagem, utilizando as seis replicatas experimentadas e seus valores estão representados nas **tabelas 22 a 25**, para LOV, PRA, ROS e SIN, respectivamente.

**Tabela 22** – Precisão e Exatidão intra e inter corrida para a lovastatina (n=6).

Nível	Intra corrida			Inter corrida		
	média ± s (ngmL <sup>-1</sup> )	$DPR_r$ (%)	$EPR_r$ (%)	média ± s (ngmL <sup>-1</sup> )	$DPR_R$ (%)	$EPR_R$ (%)
LIQ	126,48 ± 2,01	2,54	0,01	126,41 ± 4,84	4,25	1,13
CQB	377,76 ± 18,66	3,14	0,06	371,46 ± 17,81	5,34	6,13
CQM	472,49 ± 60,61	7,33	-0,02	517,38 ± 60,42	13,07	-2,38
CQA	677,16 ± 46,47	4,10	-0,05	663,92 ± 33,32	5,36	-5,15
CQD	562,08 ± 15,13	5,59	0,01	557,22 ± 29,50	5,59	1,31

**Tabela 23** – Precisão e Exatidão intra e inter corrida para a pravastatina (n=6).

Nível	Intra corrida			Inter corrida		
	média ± s (ngmL <sup>-1</sup> )	$DPR_r$ (%)	$EPR_r$ (%)	média ± s (ngmL <sup>-1</sup> )	$DPR_R$ (%)	$EPR_R$ (%)
LIQ	485,83 ± 5,77	2,62	-0,01	493,24 ± 13,65	2,83	-1,35
CQB	971,61 ± 16,18	11,55	0,02	1022,76 ± 123,63	12,30	2,28
CQM	1348,60 ± 18,13	4,68	0,02	1324,40 ± 63,09	4,80	1,88
CQA	1751,59 ± 18,90	0,75	0,10	1755,65 ± 19,19	1,21	9,73
CQD	1243,90 ± 98,88	9,47	-0,04	1296,95 ± 124,46	9,65	-3,93

**Tabela 24** – Precisão e Exatidão intra e inter corrida para a rosuvastatina (n=6).

Nível	Intra corrida			Inter corrida		
	média ± s (ngmL <sup>-1</sup> )	DPR <sub>r</sub> (%)	EPR <sub>r</sub> (%)	média ± s (ngmL <sup>-1</sup> )	DPR <sub>R</sub> (%)	EPR <sub>R</sub> (%)
LIQ	117,17 ± 10,81	5,68	0,09	136,71 ± 23,20	19,86	9,36
CQB	312,58 ± 3,81	1,41	0,00	349,17 ± 27,81	9,43	-0,24
CQM	505,13 ± 4,46	3,75	-0,12	466,38 ± 51,11	12,82	-12,00
CQA	756,96 ± 25,02	2,48	-0,02	688,48 ± 62,04	10,60	-1,65
CQD	561,07 ± 18,26	3,33	0,08	592,66 ± 60,71	12,00	7,76

**Tabela 25** – Precisão e Exatidão intra e inter corrida para a sinvastatina (n=6).

Nível	Intra corrida			Inter corrida		
	média ± s (ngmL <sup>-1</sup> )	DPR <sub>r</sub> (%)	EPR <sub>r</sub> (%)	média ± s (ngmL <sup>-1</sup> )	DPR <sub>R</sub> (%)	EPR <sub>R</sub> (%)
LIQ	129,66 ± 22,89	11,54	0,05	131,05 ± 15,34	11,78	4,84
CQB	376,78 ± 8,74	1,78	0,08	379,45 ± 6,65	1,78	8,41
CQM	604,61 ± 44,29	4,65	0,14	603,25 ± 60,66	11,58	13,82
CQA	625,81 ± 14,21	3,12	0,00	700,10 ± 76,26	12,79	0,01
CQD	488,01 ± 15,50	6,16	-0,06	514,34 ± 46,37	9,97	-6,48

O método desenvolvido foi preciso e exato, tanto em relação à repetitividade quanto à reprodutibilidade parcial, conforme a RDC<sup>56</sup> 27 de 2012. Para todos os fármacos, os DPRs e EPRs para o LIQ apresentaram desvios menores que 20% e, para os demais níveis de concentração, CQB, CQM, CQA e CQD, os desvios foram inferiores a 15%, atendendo os limites estabelecidos por essa resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

### **2.5.6 Limite inferior de quantificação (LIQ)**

Os limites inferiores de quantificação dos fármacos foram estabelecidos analisando amostras das estatinas em plasma em concentrações decrescentes até que se obteve relação sinal/ruído próxima a 10 para os picos cromatográficos dos analitos. Além disto, estes LIQs devem ser quantificáveis com precisão e nível de interferência aceitáveis. Assim, foram analisadas seis amostras de estatinas em plasma com concentração de 125 ngmL<sup>-1</sup> para LOV, ROS e SIN, 500 ngmL<sup>-1</sup> para PRA e 5000 ngmL<sup>-1</sup> para ATO (PI). Os valores de DPR das respostas dos analitos normalizadas por PI foram de 2,46; 4,70; 2,48 e 2,31%.

As respostas dos fármacos foram quantificáveis e reprodutíveis com DPR inferior ao limite de 20% preconizado pela RDC<sup>56</sup> 27 de 2012. Além disso, as respostas dos analitos e PI foram, respectivamente, cinco e vinte vezes superiores à resposta dos interferentes do plasma branco.

### **2.5.7 Estabilidade dos analitos em matriz biológica**

O estudo de estabilidade dos analitos em matriz biológica foi realizado em quatro condições diferentes, denominadas: estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, estabilidade de curta duração, estabilidade de longa duração e estabilidade pós-processamento. Três amostras CQB e três CQA foram submetidas às condições de estabilidade referentes a cada um destes estudos e analisadas. Foram também analisadas, três replicatas de amostras CQB e CQA recém-preparadas.

As amostras da estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento foram congeladas durante, no mínimo, 12 horas e submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente por três vezes. As amostras da estabilidade de curta duração foram mantidas à temperatura ambiente durante 4 horas antes da quantificação. As amostras da estabilidade de longa duração foram mantidas congeladas a -70°C

durante 30 dias. E, finalmente, as amostras da estabilidade pós-processamento foram mantidas durante 12 horas no auto-injetor do cromatógrafo e analisadas.

A quantificação das amostras de estabilidade foi realizada por meio de curvas de calibração recém-preparadas, as quais atenderam a todos os requisitos de aprovação estipulados pela RDC<sup>56</sup> 27 de 2012.

As concentrações das amostras analisadas após o preparo, e nos testes de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, de curta duração, de longa duração e pós-processamento, bem como o desvio destas concentrações em relação ao valor nominal de CQB ou CQA estão representados nas **tabelas 26 a 30**.

**Tabela 26** – Média e desvio em relação ao valor nominal das concentrações das amostras analisadas após o preparo (n=3).

Nível	lovastatina		pravastatina	
	média ± s (ngmL <sup>-1</sup> )	Desvio (%)	média ± s (ngmL <sup>-1</sup> )	Desvio (%)
CQB	301,06 ± 6,98	-13,98	1018,36 ± 9,61	1,84
CQA	739,90 ± 2,97	5,70	1732,21 ± 20,96	8,26
Nível	rosuvastatina		sinvastatina	
	média ± s (ngmL <sup>-1</sup> )	Desvio (%)	média ± s (ngmL <sup>-1</sup> )	Desvio (%)
CQB	321,54 ± 3,90	-8,13	304,73 ± 14,15	-12,93
CQA	604,89 ± 0,90	-13,59	720,37 ± 3,32	2,91



**Tabela 27** – Média e desvio em relação ao valor nominal das concentrações das amostras analisadas após ciclos de congelamento e descongelamento (n=3).

Nível	lovastatina		pravastatina	
	média ± s (ngmL <sup>-1</sup> )	Desvio (%)	média ± s (ngmL <sup>-1</sup> )	Desvio (%)
CQB	314,14 ± 5,69	-10,25	853,48 ± 52,93	-14,65
CQA	597,62 ± 9,75	-14,63	1545,82 ± 4,18	-3,39
Nível	rosuvastatina		sinvastatina	
	média ± s (ngmL <sup>-1</sup> )	Desvio (%)	média ± s (ngmL <sup>-1</sup> )	Desvio (%)
CQB	398,52 ± 16,14	13,86	305,20 ± 0,04	-12,80
CQA	606,45 ± 0,33	-13,36	601,17 ± 6,74	-14,12

**Tabela 28** – Média e desvio em relação ao valor nominal das concentrações das amostras analisadas após estabilidade de curta duração, 2h (n=3).

Nível	lovastatina		pravastatina	
	média ± s (ngmL <sup>-1</sup> )	Desvio (%)	média ± s (ngmL <sup>-1</sup> )	Desvio (%)
CQB	308,32 ± 7,97	-11,91	931,51 ± 18,90	-6,85
CQA	796,27 ± 3,77	13,75	1814,48 ± 56,32	13,40
Nível	rosuvastatina		sinvastatina	
	média ± s (ngmL <sup>-1</sup> )	Desvio (%)	média ± s (ngmL <sup>-1</sup> )	Desvio (%)
CQB	343,69 ± 7,34	-1,80	301,50 ± 4,64	-13,86
CQA	620,85 ± 6,76	-11,31	668,27 ± 18,88	-4,53

**Tabela 29** – Média e desvio em relação ao valor nominal das concentrações das amostras analisadas após estabilidade de longa duração (n=3).

Nível	lovastatina		pravastatina	
	média ± s (ngmL <sup>-1</sup> )	Desvio (%)	média ± s (ngmL <sup>-1</sup> )	Desvio (%)
CQB	301,61 ± 9,32	-13,83	862,92 ± 21,65	-13,71
CQA	597,97 ± 5,64	-14,58	1803,95 ± 17,88	12,75
Nível	rosuvastatina		sinvastatina	
	média ± s (ngmL <sup>-1</sup> )	Desvio (%)	média ± s (ngmL <sup>-1</sup> )	Desvio (%)
CQB	398,51 ± 6,99	13,86	297,82 ± 1,35	-14,91
CQA	601,88 ± 5,78	-14,02	596,58 ± 3,79	-14,77

**Tabela 30** – Média e desvio em relação ao valor nominal das concentrações das amostras analisadas após estabilidade pós-processamento (n=3).

Nível	lovastatina		pravastatina	
	média ± s (ngmL <sup>-1</sup> )	Desvio (%)	média ± s (ngmL <sup>-1</sup> )	Desvio (%)
CQB	300,48 ± 1,21	-14,15	1004,45 ± 29,05	0,44
CQA	704,21 ± 11,22	0,60	1721,76 ± 1,06	7,61
Nível	rosuvastatina		sinvastatina	
	média ± s (ngmL <sup>-1</sup> )	Desvio (%)	média ± s (ngmL <sup>-1</sup> )	Desvio (%)
CQB	305,05 ± 3,74	-12,84	307,96 ± 0,13	-12,01
CQA	618,85 ± 3,41	-11,59	675,06 ± 11,46	-3,56

Como pode ser observado na **Tabela 26**, as amostras analisadas imediatamente após o preparo apresentaram desvios da concentração média em relação ao valor nominal aceitáveis segundo a RDC<sup>56</sup> 27 de 2012 para os quatro analitos do estudo, ou seja, os desvios, tanto para as amostras CQB quanto para as CQA, foram menores que ± 15%. O maior desvio observado foi de -13,98% referente ao CQB da lovastatina. Assim sendo, as amostras preparadas para o estudo de estabilidade, por apresentarem concentrações dos fármacos dentro do limite aceitável, foram adequadas para a submissão às diferentes condições preconizadas para o estudo.

Nos estudos de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, estabilidade de longa duração e estabilidade pós-processamento os quatro analitos se mostraram estáveis (desvio menor que  $\pm 15\%$ ) de acordo com mesma resolução. O desvio máximo observado nesses três estudos foi de  $-14,91\%$  para a amostra CQB da sinvastatina na estabilidade de longa duração.

No estudo da estabilidade de curta duração, as amostras foram primeiramente mantidas a temperatura ambiente durante quatro horas, porém as mesmas não foram estáveis, havendo concentração cujo desvio foi de até  $-56,77\%$  do valor nominal, referente ao CQB da lovastatina. Posteriormente, o experimento foi repetido empregando menor intervalo de tempo, duas horas. O maior desvio encontrado nesse novo estudo foi de  $-13,86\%$  do CQB da sinvastatina.

Todas as amostras CQB e CQA analisadas foram estáveis em relação aos quatro analitos em concordância com a RDC<sup>56</sup> 27 de 2012 nos quatro estudos de estabilidade conduzidos.

### 3 CONCLUSÃO

O sistema *column-switching* montado nesse estudo permitiu a análise simultânea de quatro estatinas, com tempo de análise reduzido.

O sistema *column-switching* possibilitou realizar a etapa de preparo de amostras de forma automatizada, com a vantagem de reduzir o contato do analista com solventes tóxicos e amostras biológicas. Além disso, o sistema automatizado permitiu reduzir os erros desta etapa, bem como o tempo longo, que são característicos das técnicas convencionais de preparo de amostras.

O modo *backflush* do sistema bidimensional de eluição possibilitou maior rapidez de análise, podendo proporcionar maior produtividade laboratorial. Além disso, esse modo de eluição permitiu economizar solventes orgânicos utilizados como fase móvel em cromatografia a líquido.

O método bioanalítico desenvolvido e validado demonstrou ser simples, rápido, seletivo, preciso e exato na determinação simultânea de estatinas em plasma humano na faixa de 125 a 876 ngmL<sup>-1</sup> para lovastatina, rosuvastatina e sinvastatina e 500 a 2000 ngmL<sup>-1</sup> para pravastatina.

As amostras CQB e CQA de lovastatina, pravastatina, rosuvastatina e sinvastatina em matriz biológica demonstraram ser estáveis após submetidas a condições de estabilidade de três ciclos de congelamento e descongelamento, de estabilidade de curta duração de 2 horas, de estabilidade de longa duração de 30 dias e de estabilidade pós-processamento de 12 horas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CASSIANO, N. M.; LIMA, V. V.; OLIVEIRA, R. V.; DE PIETRO, A. C.; CASS, Q. B. Development of restricted-access media supports and their application to the direct analysis of biological fluid samples via high-performance liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, n. 7-8, p. 1462-1469, 2006.
2. SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L. Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 801, n. 2, p. 141-156, 2004.
3. SADÍLEK, P.; SATÍNSKÝ, D.; SOLICH, P. Using restricted-access materials and column switching in high-performance liquid chromatography for direct analysis of biologically-active compounds in complex matrices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 5, p. 375-384, 2007.
4. SANTOS NETO, A. J.; FERNANDES, C.; RODRIGUES, J. C.; ALVES, C.; LANÇAS, F. M. Fluoxetine and norfluoxetine analysis by direct injection of human plasma in a column switching liquid chromatographic system. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 1, p. 78-85, 2008.
5. BOOS, K. S.; RUDOLPHI, A. The use of restricted-access media in HPLC, part I – classification and review. **LC-GC**, v. 15, n. 9, p. 602-611, 1997.
6. CARVALHO, I.; CAMPO, L. V. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 425-430, 2007.
7. ERTÜRK, S.; ÖNAL, A.; ÇETIN, S. M. Analytical methods for the quantitative determination of 3-hidroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in biological samples. **Journal of Chromatography B**, v. 793, n. 2, p. 193-205, 2003.
8. MOGHADASIAN, M. H. Minireview: Clinical pharmacology of 3-hidroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. **Life Sciences**, v. 65, n. 13, p. 1329-1337, 1999.

9. GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. 1848 p.
10. BRASIL, Ministério da saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Saúde Brasil 2006 Uma Análise da Desigualdade em Saúde, Brasília-DF, **Ministério da Saúde**, 1ª ed., p. 71-104, 2006. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/saude\\_brasil\\_2006.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/saude_brasil_2006.pdf)> Acesso em: 12 abr. 2011.
11. MOREAU, R. L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. **Toxicologia Analítica**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 334 p.
12. BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RE nº 1.170 de 19 de abril de 2006. Guia para provas de biodisponibilidade relativa/ bioequivalência de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 de abril de 2006.
13. MAJORS, R. E. An overview of sample preparation. **LC-GC**, v. 9, n. 1, p. 16-20, 1991.
14. CHEN, Y.; GUO, Z.; WANG, X.; QIU, C. Sample preparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, n. 1-2, p. 191-219, 2008.
15. TYOTYLAINEN, T. Critical evaluation of sample pretreatment techniques. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 394, n. 3, p. 743-758, 2009.
16. CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de Métodos por HPLC: Fundamentos, Estratégias e Validação**. 1ª ed. São Carlos: EdUFScar, 2002. 77 p.
17. QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.
18. SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L.; **Practical HPLC Method Development**. 2ª ed. New York: John Wiley and Sons, 1997. 765 p.

19. LANÇAS, F. M. **Extração em Fase Sólida (SPE)**. 1ª ed. São Carlos: Rima, 2001. 96 p.
20. SANTOS NETO, A. J. **Cromatografia líquida multidimensional e espectrometria de massas em tandem para análise direta de fármacos em fluidos biológicos: da escala convencional à miniaturizada**. 2007. 216 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos. 2007.
21. BELAZ, K. R. A. **Quantificação dos metabólitos do albendazol em plasma bovino por cromatografia líquida quiral de alta eficiência, com injeção direta de amostras**. 2007. 148 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2007.
22. HENNION, M. C. Solid-phase extraction: method development, sorbents and coupling with liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 856, n. 1-2, p. 3-54, 1999.
23. ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. SPME with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 2145-2148, 1990.
24. ULRICH, S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 902, n. 1, p. 167-194, 2000.
25. FERNANDES, C. **Otimização da extração, separação cromatográfica, identificação e quantificação de fármacos em fluidos biológicos**. 2006. 220 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos. 2006.
26. LEANDRO, F. Z. **Desenvolvimento de barras imunosorventes de agitação e avaliação das técnicas extração sortiva em barra de agitação, microextração em sorvente empacotado e cromatografia líquida para análise de antidepressivos em amostras de plasma**. 2010. 181 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2010.
27. BALTUSSEN, E.; SANDRA, P.; DAVID, F.; CRAMERS, C. Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory

- and principles. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 11, n. 10, p. 737-747, 1999.
28. DESILETS, C. P.; ROUNDS, M. A.; REGNIER, F. E. Semipermeable-surface reversed-phase media for high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 544, n. 1-2, p. 25-39, 1991.
29. MULLETT, W. M. Determination of drugs in biological fluids by direct injection of sample for liquid-chromatographic analysis. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, n. 2, p. 263-273, 2007.
30. BOOS, K. S.; RUDOLPHI, A. The use of restricted-access media in hplc, part II – Applications. **LC-GC**, v. 15, n. 9, p. 816-823, 1997.
31. FRIED, K.; WAINER, I. W. Column-switching techniques in the biomedical analysis of stereoisomeric drugs: why, how and when. **Journal of Chromatography B**, v. 689, n. 1, p. 91-104, 1997.
32. ANDERSON, D. J. High-performance liquid chromatography in clinical analysis. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 12, p. 314-327, 1999.
33. FELIX, G.; CAMPÈSE, D. Determination by HPLC of the chiral conversion of drugs in biologic fluids on new RAM-chiral columns. **30<sup>th</sup> Internacional Symposium & Exhibit on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques**. San Francisco-CA-USA, 2006, p. 170.
34. HAGESTAM, I. H.; PINKERTON, T. C. Internal surface reversed-phase silica supports for liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 57, n. 8, p. 1757-1763, 1985.
35. BOOS, K. S.; RUDOLPHI, A.; VIELHAUER, S.; WALFORT, A.; LUBDA, D. Alkyl-diol silica (ADS): restricted access precolumn packings for direct injection and coupled-column chromatography of biofluids. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 352, n. 7-8, p. 684-690, 1995.
36. GLUNZ, I. J.; PERRY, J. A.; INVERGO, B.; WAGNER, H.; SZCZERBA, T. J.; RATEIKE, J. D.; GLUNZ, P. W. The semipermeable surface, a new restricted



- access medium. **Journal of Chromatography**, v. 15, n. 8, p. 1361-1379, 1992.
37. YOSHIDA, H.; MORITA, I.; TAMAI, G.; MASUJIMA, T.; TSURU, T.; TAKAI, N.; IMAI, H. Some characteristics of a protein-coated ODS column and its use for the determination of drugs by the direct injection analysis of plasma samples. **Chromatographia**, v. 19, n. 1, p. 466-472, 1984.
38. MENEZES, M. L.; FELIX, G. On-line extraction and separation of bendiocarb, methomyl, methylparathion and pentachlorophenol pesticides from raw milk. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 21, n. 18, p. 2863-2871, 1998.
39. GISCH, D. J.; HUNTER, B. T.; FEIBUSH, B. Shield hydrophobic phase: a new concept for direct injection analysis of biological fluids by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 433, p. 264-268, 1988.
40. HAGINAKA, J.; WAKAI, J.; YASUDA, H. Synthesis of mixed-functional-phase silica supports for liquid chromatography and their applications to assays of drugs in serum. **Journal of Chromatography A**, v. 535, n. 1-2, p. 163-172, 1990.
41. HAGINAKA, J.; WAKAI, J. Preparation and characterization of mixed-functional-phase silica materials using phenyl-, butyl- or octylchlorosilane as a silylating agent. **Journal of Chromatography A**, v. 596, n. 2, p. 151-156, 1992.
42. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Health Observatory (GHO), Cholesterol, Raised cholesterol. **WHO**. Geneva, 2008. Disponível em: <[http://gamapserver.who.int/gho/interactive\\_charts/ncd/risk\\_factors/cholesterol\\_prevalence/atlas.html](http://gamapserver.who.int/gho/interactive_charts/ncd/risk_factors/cholesterol_prevalence/atlas.html)>. Acesso em: 20 jan. 2013.
43. RENAME. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais**. Secretaria de Políticas de Saúde, Departamento de Atenção Básica, Gerência Técnica de Assistência Farmacêutica. 3 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

44. ENDO, A. A gift from nature: the birth of the statins. **Nature medicine**, v. 14, n. 10, p. 1050-1052, 2008.
45. MOFFAT, A.C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B. **Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material**. 3. ed. London: Pharmaceutical Press, 2004. 564 p.
46. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 34 ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2009. 4200 p.
47. WOOD, W. G.; ECKERT, G. P.; IGBAVBOA, U.; MULLER, W. E. Statin and neuroprotection: a prescription to move the field forward. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1199, p. 69-76, 2010.
48. NEZASA, K.; HIGAKI, K.; MATSUMURA, T.; INAZAWA, K.; HASEGAWA, H.; NAKANO, M.; KOIKE, M. Liver-specific distribution of rosuvastatina in rats: comparison with pravastatina and simvastatin. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 30, n. 11, p. 1158-1163, 2002.
49. PIECHA, M.; SARAHA, M.; TREBSE, P.; KOCAR, D. Stability studies of cholesterol lowering statin drugs in aqueous samples using HPLC and LC-MS. **Environmental Chemistry Letters**, v. 8, n. 2, p. 185-191, 2010.
50. YANG, D. J.; HWANG, L. S. Study on the conversion of three natural statins from lactone forms to their corresponding hydroxyl acid forms and their determination in Pu-Erh tea. **Journal of Chromatography A**, v. 1119, n. 1-2, p. 277-284, 2006.
51. JEMAL, M.; OUYANG, Z.; CHEN, B.; TEITZ, D. Quantitation of the acid and lactone forms of atorvastatin and its biotransformation products in human serum by high-performance liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 13, n. 11, p. 1003-1015, 1999.
52. ABDALLAH, O. M. RP-HPLC determination of three anti-hyperlipidemic drugs in spiked human plasma and in dosage forms. **E-Journal of Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 753-761, 2011.

53. SHAH, Y.; IQBAL, Z.; AHMAD, L.; KHAN, A.; KHAN, M. I.; NAZIR, S.; NASIR, F. Simultaneous determination of rosuvastatina and atorvastatin in human serum using RP-HPLC/UV detection: method development, validation and optimization of various experimental parameters. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 9-10, p. 557-563, 2011.
54. GUILLÉN, D.; COFÁN, F.; ROS, E.; MILLÁN, O.; COFÁN, M.; RIMOLA, A.; BRUNET, M. Determination of atorvastatin and its metabolite ortho-hydroxyatorvastatin in human plasma by on-line anion-exchange solid-phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 394, n. 6, p. 1687-1696, 2009.
55. BARRETT, B.; HUCLOVÁ, J.; DOHALSHÝ, V. B.; Němec, B.; JELÍNEK, I. Validated HPLC-MS/MS method for simultaneous determination of simvastatin and simvastatin hydroxyl acid in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 2, p. 517-526, 2006.
56. BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 de maio de 2012.
57. MENEZES, M. L.; FELIX, G. Analysis of organochlorine pesticides in plain milk using direct injection on an ISRP column with column switching. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 19, n. 19, p. 3221-3228, 1996.
58. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
59. SANTOS NETO, A. J.; FERNANDES, C.; RODRIGUES, J. C.; ALVES, C.; LANÇAS, F. M. Fluoxetine and norfluoxetine analysis by direct injection of human plasma in a column switching liquid chromatographic system. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 1, p. 78-85, 2008.
60. SATÍNSKÝ, D.; SERRALHEIRO, H. S.; SOLICH, P.; ARAÚJO, A. N.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M. On-line coupling of sequential injection extraction with restricted-access materials and post-column derivatization for sample clean-up and determination of propranolol in human plasma. **Analytica Chimica Acta**, v. 600, n. 1-2, p. 122-128, 2007.

61. CHIAP, P.; PIETTE, M.; EVRARD, B.; FRANKENNE, F.; CHRISTIAENS, B.; PIEL, G.; CATALDO, D.; FOIDART, J. M.; DELATTRE, L. CROMMEN, J.; HUBERT, P. Automated method for the determination of a new matrix metalloproteinase inhibitor in ovine plasma and serum by coupling of restricted access material for on-line sample clean-up to liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 817, n. 1, p. 109-117, 2005.
62. GIL, G. C.; BRENNAN, J.; THROCKMORTON, D. J.; BRANDA, S. S.; CHIRICA, G. S. Automated analysis of mouse serum peptidome using restricted access media and nanoliquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 15-16, p. 1112-1120, 2011.
63. HU, L.; BOOS, K. S.; YE, M.; WU, R.; ZOU, H. Selective on-line serum peptide extraction and multidimensional separation by coupling a restricted-access material-based capillary trap column with nanoliquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 28, p. 5377-5384, 2009.
64. GONZALO, E. R.; GÓMEZ, D. G.; MARTÍNEZ, R. C. Development and validation of a method for the detection and confirmation of biomarkers of exposure in human urine by means of restricted Access material-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 1, p. 40-48, 2010.
65. GORDI, T.; NIELSEN, E.; YU, Z.; WESTERLUND, D.; ASHTON, M. Direct analysis of artemisinin in plasma and saliva using coupled-column high-performance liquid chromatography with a restricted-access material pre-column. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 742, n. 1, p. 155-162, 2000.
66. FRIEDRICH, G.; ROSE, T.; RISSLER, K. Determination of testosterone metabolites in human hepatocytes: I. Development of an on-line sample preparation liquid chromatography technique and mass spectroscopic detection of 6 $\beta$ -hydroxytestosterone. **Journal of Chromatography B**, v. 784, n. 1, p. 49-61, 2003.
67. CHICO, J.; MECA, S.; COMPANYÓ, R.; PRAT, M. D.; GRANADOS, M. Restricted Access materials for sample clean-up in the analysis of trace levels of tetracyclines by liquid chromatography application to food and environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1181, n. 1-2, p. 1-8, 2008.

68. DE PAULA, F. C. C. R.; DE PIETRO, A. C.; CASS, Q. B. Simultaneous quantification of sulfamethoxazole and trimethoprim in whole egg samples by column-switching high-performance liquid chromatography using restricted Access media column for on-line sample clean-up. **Journal of Chromatography A**, v. 1189, n. 1-2, p. 221-226, 2008.
69. BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R.; BRUNS, D. E. **Tietz: Fundamentos de química clínica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 992 p.
70. DE PAULA, F. C. C. R. **Desenvolvimento de um método para quantificação simultânea de sulfametoxazol e trimetoprima em ovos de galinha utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência bidimensional**. 2007. 115 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2007.
71. ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.
72. COMPTON, S. J.; JONES, C. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 151, n. 2, p. 369-374, 1985.
73. LIMA, V. V.; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B. Desenvolvimento de colunas cromatográficas de meios de acesso restrito proteína imobilizada e suas avaliações para análise de fármacos com injeção direta de plasma humano. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 72-78, 2006.
74. YU, Z.; WESTERLUND, D.; BOOS, K. S. Evaluation of liquid chromatography behavior of restricted-access media precolumns in the course of direct injection of large volumes of plasma samples in column-switching systems. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 704, n. 1-2, p. 53-62, 1997.
75. YU, Z.; WESTERLUND, D. Influence of mobile phase conditions on the clean-up effect of restricted-access media precolumns for plasma samples injected in a column-switching system. **Chromatographia**, v. 44, n. 11-12, p. 589-594, 1997.

76. DE SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1-2, p. 25-35, 2005.
77. BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de junho de 2003.
78. HAMIDI, M.; ZAREI, N.; SHAHBAZI, M. A. A simple and sensitive HPLC-UV method for quantification of lovastatin in human plasma: application to a bioequivalence study. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 9, p. 1600-1603, 2009.
79. ALMEIDA, S.; FILIPE, A.; ALEMIDA, A.; GICH, I.; ANTONIJOAN, R.; PUNTES, N.; BARBANOJ, M.; CRUZ, C. M. Comparative study on the bioequivalence of two formulations of pravastatin. Data from a crossover, randomized, open-label bioequivalence study in healthy volunteers. **Arzneimittelforschung Drug Research**, v. 56, n. 2, p. 70-75, 2006.
80. ZHANG, D.; ZHANG, J.; LIU, X.; WEI, C.; ZHANG, R.; SONG, H.; YAO, H.; YUAN, G.; WANG, B.; GUO, R. Validated LC-MS/MS method for the determination of rosuvastatin in human plasma: application to a bioequivalence study in Chinese volunteers. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 2, n. 4, p. 341-346, 2011.
81. DING, M. J.; YUAN, L. H.; LI, Y.; WANG, S.; WU, X. L.; LIU, J.; MA, K. F.; FAN, H. W.; LU, Z. Y.; XU, H. J.; ZHOU, X. M. Pharmacokinetics and bioequivalence study of simvastatin orally disintegrating tablets in Chinese healthy volunteers by LC-ESI-MS/MS. **Journal of Bioequivalence & Bioavailability**, v. 3, n. 2, p. 32-37, 2011.

## **APÊNDICE A**

**Termo de consentimento livre e esclarecido para o grupo 1 – indivíduos não usuários de fármacos da classe das estatinas**

## **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(Para o grupo 1 – Indivíduos não usuários de fármacos da classe das estatinas)

Projeto de pesquisa de mestrado: “Determinação de estatinas em plasma humano empregando cromatografia líquida com colunas de meio de acesso restrito”

Prezado(a) Sr.(a),

Você está sendo convidado(a) para participar de uma pesquisa que tem por objetivo desenvolver métodos automatizados que serão utilizados para analisar fármacos da classe das estatinas em sangue humano. Estes métodos apresentam a vantagem de reduzir o consumo de substâncias químicas (amenizando riscos para a saúde do trabalhador e ambiental) quando comparados com os métodos convencionais.

Para realizar este estudo, gostaríamos de colher 15 mL do seu sangue para executar as etapas do projeto. Na coleta de sangue pode ocorrer uma leve dor localizada associada à picada da agulha ou pequena reação local. Para reduzir esta reação local, a coleta de sangue será realizada por um profissional experiente, empregando rotina padronizada. Serão utilizados agulhas e tubos descartáveis. Outro risco associado ao procedimento de coleta de sangue, embora raro, é a sensação momentânea de tontura. Nesse caso, o profissional adotará as medidas pertinentes, para as quais está habilitado.

Este estudo trará benefícios aos pacientes usuários de estatinas na terapia e controle dos níveis de colesterol pela introdução de métodos modernos para a determinação de fármacos desta classe terapêutica.

Na divulgação dos resultados da pesquisa, os voluntários serão identificados apenas por números, garantindo sua privacidade e que os dados particulares serão confidenciais. As amostras de sangue coletadas serão descartadas após a realização das análises.

Você não terá nenhum gasto, pois a coleta do sangue será feita na Faculdade de Farmácia da UFMG, de acordo com sua disponibilidade. Também não haverá remuneração para participação neste projeto.



Para qualquer dúvida sobre esta pesquisa você deverá entrar em contato com as pessoas responsáveis pela mesma, cujos nomes estão abaixo relacionados. Você terá garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou dúvida que possa surgir relacionada ao estudo e também terá a liberdade de retirar seu consentimento e sair do estudo no momento em que desejar.

Se você compreendeu as informações e estiver de acordo, por favor, assine esta folha.

**Responsáveis:**

Gerson Antônio Pianetti (orientador) – telefone: 3409-6974

Christian Fernandes (co-orientador) – telefone: 3409-6957

Vinicius Freire Fagundes (mestrando) – telefone: 3318-0240

Luci Maria SantAna Dusse (colaboradora) – telefone: 3409-6880

Av. Antônio Carlos, nº. 6627 – Pampulha – Faculdade de Farmácia - Campus UFMG

**Comitê de Ética em Pesquisa – COEP:** Av. Antônio Carlos, nº. 6627 – Pampulha – Campus UFMG, Unidade Administrativa II. Sala 2005 – 2º andar. CEP: 31270-901. Telefone: 3409-4592.

---

Gerson Antônio Pianetti

---

Christian Fernandes

---

Vinicius Freire Fagundes

---

Luci Maria SantAna Dusse

## **APÊNDICE B**

**Termo de esclarecimento livre e esclarecido para o grupo 2 – indivíduos  
usuários de fármacos da classe das estatinas**

## **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(Para o grupo 2 – Indivíduos usuários de fármacos da classe das estatinas)

Projeto de pesquisa de mestrado: “Determinação de estatinas em plasma humano empregando cromatografia líquida com colunas de meio de acesso restrito”

Prezado(a) Sr.(a),

Você está sendo convidado(a) para participar de uma pesquisa que tem por objetivo desenvolver métodos automatizados que serão utilizados para analisar fármacos da classe das estatinas em sangue humano. Estes métodos apresentam a vantagem de reduzir o consumo de substâncias químicas (amenizando riscos para a saúde do trabalhador e ambiental) quando comparados com os métodos convencionais.

Para realizar este estudo, gostaríamos de colher 15 mL do seu sangue para executar as etapas do projeto. Na coleta de sangue pode ocorrer uma leve dor localizada associada à picada da agulha ou pequena reação local. Para reduzir esta reação local, a coleta de sangue será realizada por um profissional experiente, empregando rotina padronizada. Serão utilizados agulhas e tubos descartáveis. Outro risco associado ao procedimento de coleta de sangue, embora raro, é a sensação momentânea de tontura. Nesse caso, o profissional adotará as medidas pertinentes, para as quais está habilitado.

Este estudo trará benefícios aos pacientes usuários de estatinas na terapia e controle dos níveis de colesterol pela introdução de métodos modernos para a determinação de fármacos desta classe terapêutica.

Na divulgação dos resultados da pesquisa, os voluntários serão identificados apenas por números, garantindo sua privacidade e que os dados particulares serão confidenciais. As amostras de sangue coletadas serão descartadas após a realização das análises.

Você não terá nenhum gasto, pois a coleta do sangue será feita na Faculdade de Farmácia da UFMG, de acordo com sua disponibilidade. Também não haverá remuneração para participação neste projeto.

Para qualquer dúvida sobre esta pesquisa você deverá entrar em contato com as pessoas responsáveis pela mesma, cujos nomes estão abaixo relacionados. Você terá garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou dúvida que possa surgir relacionada ao estudo e também terá a liberdade de retirar seu consentimento e sair do estudo no momento em que desejar.

Se você compreendeu as informações e estiver de acordo, por favor, assine esta folha.

**Responsáveis:**

Gerson Antônio Pianetti (orientador) – telefone: 3409-6974

Christian Fernandes (co-orientador) – telefone: 3409-6957

Vinicius Freire Fagundes (mestrando) – telefone: 3318-0240

Luci Maria SantAna Dusse (colaboradora) – telefone: 3409-6880

Av. Antônio Carlos, nº. 6627 – Pampulha – Faculdade de Farmácia - Campus UFMG

**Comitê de Ética em Pesquisa – COEP:** Av. Antônio Carlos, nº. 6627 – Pampulha – Campus UFMG, Unidade Administrativa II. Sala 2005 – 2º andar. CEP: 31270-901. Telefone: 3409-4592.

---

Gerson Antônio Pianetti

---

Christian Fernandes

---

Vinicius Freire Fagundes

---

Luci Maria SantAna Dusse

**ANEXO A**

**Carta de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG  
(COEP-UFMG)**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

**Projeto: CAAE – 01432012.0.0000.5149**

**Interessado(a): Prof. Gerson Antonio Pianetti  
Departamento de Produtos Farmacêuticos  
Faculdade de Farmácia - UFMG**

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 10 de julho de 2012, o projeto de pesquisa intitulado **"Determinação de estatinas em plasma humano empregando cromatografia líquida com colunas de meio de acesso restrito"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

**Prof. Maria Teresa Marques Amaral  
Coordenadora do COEP-UFMG**

## **ANEXO B**

**Apresentações em congresso decorrentes do trabalho**

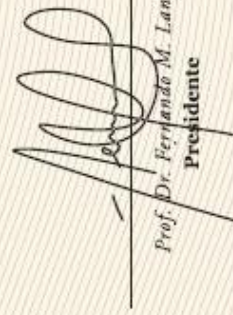
# CERTIFICAÇÃO

## APRESENTAÇÃO DE TRABALHO CIENTÍFICO

Certificamos que o trabalho intitulado "DESENVOLVIMENTO DE COLUNA CROMATOGRÁFICA DE MEIO DE ACESSO RESTRITO PROTEÍNA-IMOBILIZADA E SUA AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO COM COLUNA

COMERCIAL SÍLICA ALQUIL-DIOL", submetido pelos autores Vinicius Freire Fagundes, Camila Prado Leite,

Gerson Antônio Pianetti e Christian Fernandes, foi apresentado no Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas (COLACRO XIV), realizado de 1 a 5 de Outubro de 2012 em Florianópolis (SC), Brasil.

  
Prof. Dr. Fernando M. Lanza  
Presidente

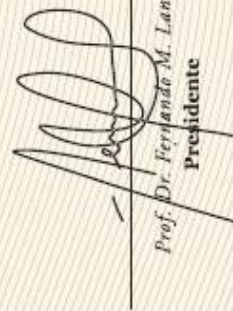




# CERTIFICADO

## APRESENTAÇÃO DE TRABALHO CIENTÍFICO

Certificamos que o trabalho intitulado "DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE ESTATINAS EM PLASMA HUMANO EMPREGANDO CROMATOGRRAFIA LÍQUIDA COM COLUNAS DE MEIO DE ACESSO RESTRITO", submetido pelos autores Vinicius Freire Fagundes, Camila Prado Leite, Gerson Antônio Pianetti e Christian Fernandes, foi apresentado no Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas (COLACRO XIV), realizado de 1 a 5 de Outubro de 2012 em Florianópolis (SC), Brasil.

  
Prof. Dr. Feriando M. Lanças  
Presidente

