

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

JULIANA MACHADO BRÊTAS

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE ANTICOAGULANTES SOBRE PARÂMETROS
DA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS PARA ESTUDOS
FARMACOCINÉTICOS E DE BIODISPONIBILIDADE/BIOEQUIVALÊNCIA DE
NAPROXENO SÓDICO E SUCCINATO DE SUMATRIPTANO**

Belo Horizonte – MG

2014

JULIANA MACHADO BRÉTAS

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE ANTICOAGULANTES SOBRE PARÂMETROS
DA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS PARA ESTUDOS
FARMACOCINÉTICOS E DE BIODISPONIBILIDADE/BIOEQUIVALÊNCIA DE
SUCCINATO DE SUMATRIPTANO E NAPROXENO SÓDICO**

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

Orientador: Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti

Coorientadora: Dra. Isabela da Costa César

Belo Horizonte – MG

2014

B844a Brêtas, Juliana Machado.
Avaliação da influência de anticoagulantes sobre parâmetros da validação de métodos bioanalíticos para estudos farmacocinéticos e de biodisponibilidade/bioequivalência de naproxeno sódico e succinato de sumatriptano / Juliana Machado Brêtas. – 2014.

192 f. : il.

Orientador: Gerson Antônio Pianetti.
Co-Orientadora: Isabela da Costa César.

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

1. CLAE-IES-EM/EM – Teses. 2. Plasma humano – Teses. 3. Anticoagulantes – Teses. 4. Naproxeno sódico e succinato de sumatriptano – Teses. 5. Enxaqueca – Teses. I. Pianetti, Gerson Antônio. II. César, Isabela da Costa. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 543.0873



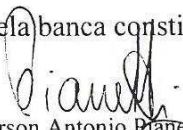
FOLHA DE APROVAÇÃO

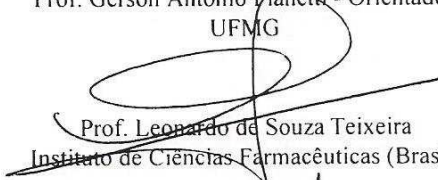
“Avaliação da influência de anticoagulantes sobre parâmetros da validação de métodos bioanalíticos para estudos farmacocinéticos e de biodisponibilidade/bioequivalência de naproxeno sódico e succinato de sumatriptano”

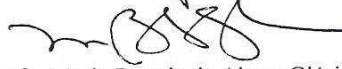
JULIANA MACHADO BRÊTAS

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Aprovada em 05 de maio de 2014, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Gerson Antonio Pianetti - Orientador
UFMG


Prof. Leonardo de Souza Teixeira
Instituto de Ciências Farmacêuticas (Brasil)


Prof. Maria Beatriz de Abreu Glória
UFMG


Profa. Isabela da Costa César - Coorientadora
UFMG

Belo Horizonte, 5 de maio de 2014.

AGRADECIMENTOS

Foram muitos os que me ajudaram na realização desse projeto. Alguns participaram em certos momentos, outros em todos. Mas, de algum modo, todos contribuíram direta ou indiretamente, com seu jeito particular de ser e com as experiências vividas. Meus sinceros agradecimentos...

Ao Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti, por mais uma vez ter confiado em mim e por ter apostado nesse projeto. Por toda dedicação, amizade, disponibilidade, compreensão, empenho em fornecer todas as condições necessárias para o desenvolvimento desse trabalho e, principalmente, por todos os ensinamentos que tanto contribuem para meu crescimento profissional e pessoal.

À Profa. Dra. Isabela da Costa César, pela doce coorientação, refletida nos incontáveis conselhos, ensinamentos e dicas que tanto enriqueceram esse projeto e contribuíram para minha formação como pesquisadora e farmacêutica. Por toda confiança, atenção e amizade durante esses anos.

À Profa. Dra. Cristina Duarte Vianna Soares, pela disponibilidade a apoio no projeto e pela contribuição na minha formação em docência.

Aos Professores da Faculdade de Farmácia, em especial ao Prof. Dr. Christian Fernandes e ao Prof. Dr. Lauro Mello Vieira, pelas contribuições durante a realização do projeto.

Ao Dr. Leonardo de Souza Teixeira e a toda equipe do Instituto de Ciências Farmacêuticas pela parceria e empenho na realização da etapa clínica, a qual foi fundamental para a conclusão do projeto.

À Agência Nacional de Vigilância Sanitária e à Comissão da Farmacopéia Brasileira, por permitir minha atuação profissional durante o mestrado, contribuindo imensamente para minha formação como pesquisadora e farmacêutica.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo e ao programa de Pós-Graduação, pela oportunidade.

A toda equipe do CEBIO, em especial aos amigos Gisele, Evandro, Silvânia, Natália, Letícia, Edson, Vívian, Josiane e Tarciana, por todo apoio e empenho na etapa de obtenção do plasma branco.

À Camila, minha irmã, amiga, estagiária e coorientanda, pelo empenho, apoio e dedicação imensuráveis em todas as fases desse projeto. Todos os questionamentos e sugestões foram fundamentais para enriquecer esse trabalho.

À Edna, pela amizade, dedicação, carinho e cuidado em manter a qualidade dos materiais utilizados e a organização do laboratório. Pela preocupação e torcida constante pelo sucesso do projeto.

A todos os amigos do Laboratório de Controle de Qualidade e do CEDAFAR, em especial, Mariana, Iara, Paula Chellini, Ricardo, Vinícius, Pedro Reis, Geovani, Luciano, Léo, Thiago, Fernando, Naialy, Raquel, Paula Enéas, Matheus, Carlos e Juliana pelas trocas de conhecimento, dicas e ideias tão importantes para nossa formação. Pela amizade construída e por tornarem a caminhada mais fácil ao dividirmos nossas alegrias, angústias, dúvidas e conquistas.

Aos meus amados pais, Tânia e Otto, por terem plantado em mim a paixão pelo conhecimento, proporcionando as condições necessárias para que eu pudesse chegar até aqui, sempre confiando e acreditando em mim. Pelo infinito amor, carinho, cuidado, dedicação e apoio.

Ao Daniel, meu anjo, pelo amor, apoio, companheirismo e confiança incondicionais, acalentando minhas angústias, acalmado minhas ansiedades, iluminando minhas dúvidas e intensificando minhas alegrias. Pela paciência e parceria nesse projeto, compreendendo minhas ausências e ajudando direta e indiretamente a concluir essa etapa.

A todos os amigos e familiares, pelo incentivo, carinho e apoio à minha carreira.

A Deus, por estar comigo em todos os momentos e por guiar meus passos, colocando em meu caminho oportunidades nos momentos certos e me ensinando a encarar os desafios da vida com coragem, confiança, perseverança, fé, respeito e amor.

“Eu quero saber como Deus criou este mundo. Não estou interessado neste ou naquele fenômeno, no espectro deste ou daquele elemento. Eu quero conhecer os pensamentos Dele, o resto são detalhes”.

(Albert Einstein)

RESUMO

A CLAE-EM/EM é a técnica de escolha para análise de fármacos e metabólitos em matrizes biológicas, como em estudos de biodisponibilidade/bioequivalência ou farmacocinética. As altas taxas de seletividade e sensibilidade associadas a essa técnica são amplamente afetadas pela ocorrência de efeito matriz em métodos bioanalíticos, o qual é resultante de diversos tipos de substâncias coeluídas com o analito, como os anticoagulantes utilizados na obtenção de plasma, principal matriz biológica empregada em bioanálise. Os anticoagulantes mais utilizados em bioanálise são heparina e EDTA, e, em caso de coleta em bolsas, solução de citrato de sódio, fosfato de sódio, ácido cítrico, dextrose e adenina (CPDA) ou de citrato, fosfato, dextrose, salina, adenina, glicose e manitol (CPD/SAG-M). A associação de naproxeno (NAP), um anti-inflamatório não esteroidal, com sumatriptano (SUM), um agonista seletivo do receptor 5-hidroxitriptamina_{1B/1D}, é usada para o tratamento de crises de enxaqueca. NAP é uma substância ácida (pKa 4,8) e SUM é básica (pKa 9,63), sendo essa ampla diferença de pH o fator limitante no desenvolvimento dos procedimentos de preparo de amostra, separação cromatográfica e detecção. Nesse estudo avaliou-se o impacto do tipo de anticoagulante (heparina, EDTA ou CPDA), do tipo de íon associado (sódio ou potássio) e da concentração do íon na solução de anticoagulante sobre os parâmetros da validação do método e sobre as medidas farmacocinéticas obtidas na análise de amostras de voluntários sadios na quantificação simultânea de NAP sódico e succinato de SUM em plasma humano por CLAE-EM/EM com ionização por *electrospray* positivo (IES (+)). Para tal, desenvolveu-se e validou-se um método bioanalítico de acordo com a Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 da ANVISA em três matrizes distintas: plasma contendo heparina, EDTA ou CPDA. Após a validação, aplicou-se o método em amostras de voluntários coletadas em tubos contendo heparina ou EDTA. De acordo com os resultados obtidos, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os plasmas contendo cada um dos anticoagulantes analisados em nenhum dos parâmetros da validação e em nenhuma das medidas farmacocinéticas avaliadas. Portanto, o tipo de anticoagulante, o tipo de íon associado e a concentração do íon na solução de anticoagulante não impactam na quantificação simultânea de NAP sódico e succinato de SUM em plasma humano por CLAE-EM/EM com ionização por IES (+).

Palavras-chave: CLAE-EM/EM. IES. Plasma humano. Anticoagulantes. Heparina. EDTA. CPDA. Naproxeno sódico. Succinato de sumatriptano. Enxaqueca.

ABSTRACT

HPLC-MS/MS is the technique of choice for drug and metabolites analysis in biological matrices, such as in bioavailability/bioequivalence or pharmacokinetics studies. The high levels of selectivity and sensitivity associated with this technique are largely affected by the occurrence of matrix effect in bioanalytical methods. Matrix effect results from co-eluting matrix components, such as anticoagulants used to obtain plasma, the main biological matrix employed in bioanalysis. The most commonly used anticoagulants in bioanalysis are heparin and EDTA and a sodium citrate, sodium phosphate, citric acid, dextrose and adenine solution (CPDA) or a citrate, phosphate, dextrose, saline, adenine, glucose and mannitol solution (CPD/SAG-M) are used for blood collection in bags. The combination of naproxen (NAP), a non-steroidal anti-inflammatory, and sumatriptan (SUM), a selective 5-hydroxytryptamine_{1B/1D} receptor agonist, is used for the acute treatment of migraine. NAP is an acidic compound (pKa 4.8) and SUM is a basic compound (pKa 9.63), and this large difference in pH is the limiting factor in the development of procedures for sample preparation, chromatographic separation and detection. In this study we evaluated the impact of the type of anticoagulant (heparin, EDTA or CPDA), the counterion (sodium or potassium) and the ion concentration in the anticoagulant solution on the validation parameters and on the pharmacokinetic measures obtained in the analysis of samples from healthy volunteers in the simultaneous quantification of NAP sodium and SUM succinate in human plasma by HPLC-MS/MS with positive electrospray ionization (ESI (+)). For this purpose, a bioanalytical method was developed and validated according to the ANVISA Resolution RDC no. 27, 17 May 2012 in three different matrices: plasma containing heparin, EDTA or CPDA. After validation, the method was applied on volunteers' samples that were collected in tubes containing heparin or EDTA. According to the results, there was no statistically significant difference between the analyzed plasmas containing each anticoagulant on any of the validation parameters and on any of the pharmacokinetic measures. Therefore, the type of anticoagulant, the associated ion and the ion concentration in the anticoagulant solution do not impact on the simultaneous quantification of NAP sodium and SUM succinate in human plasma by HPLC-MS/MS ionization ESI (+).

Key words: HPLC-MS/MS. ESI. Human plasma. Anticoagulants. Heparin. EDTA. CPDA. Naproxen sodium. Sumatriptan succinate. Migraine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química de SUM.....	57
Figura 2 – Estrutura química de NAP.....	61
Figura 3 – Estruturas químicas de ACE (A) e NAR (B).....	103
Figura 4 – Espectros IES(+) de NAP. (A) Espectro de varredura com íon precursor m/z 231,67. (B) Espectro de fragmentação com o íon produto m/z 185,07.....	105
Figura 5 – Espectros IES(+) de SUM. (A) Espectro de varredura com íon precursor m/z 296,70. (B) Espectro de fragmentação com o íon produto m/z 157,30.....	106
Figura 6 – Espectros IES(+) de ACE. (A) Espectro de varredura com íon precursor m/z 354,80. (B) Espectro de fragmentação com o íon produto m/z 215,00.....	107
Figura 7 – Espectros IES(+) de NAR. (A) Espectro de varredura com íon precursor m/z 336,80 e (B) Espectro de fragmentação com o íon produto principal m/z 97,94.....	108
Figura 8 – Cromatogramas obtidos por CLAE-EM/EM com ionização por IES(+) para NAP, SUM, ACE e NAR na concentração do CQM.....	110
Figura 9 – Cromatogramas obtidos a partir de amostras de HEPA (A), EDTA (B) e CPDA (C) em FM na concentração 4CN.....	118
Figura 10 – Cromatogramas obtidos a partir de amostras de HEPA (A), EDTA (B) e CPDA (C) em plasma na concentração 4CN.....	119
Figura 11 – Cromatogramas obtidos para amostras de plasma branco normal contendo HEPA (A), EDTA (B) e CPDA (C), e para uma amostra de LIQ (D).....	121
Figura 12 – Cromatogramas obtidos para as primeiras amostras de plasma branco contendo HEPA (A), EDTA (B) e CPDA (C) injetadas no sistema CLAE-EM/EM após uma amostra de LSQ, contendo os mesmos anticoagulantes, e para uma amostra de LIQ (D).....	122
Figura 13 – Curvas em solução e em matriz obtidas para NAP, considerando como resposta a área sob o pico de NAP ou a razão A_{NAP}/A_{ACE} , para os três tipos de matriz analisados HEPA (A), EDTA (B) e CPDA (C).....	128

/continua.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES (conclusão)

Figura 14 – Curvas de calibração em solução e em matriz obtidas para SUM, considerando como resposta a área sob o pico de SUM ou a razão entre as áreas sob os picos de SUM e NAR (A_{SUM}/A_{NAR}), para os três tipos de matriz analisados HEPA (A), EDTA (B) e CPDA (C).....	129
Figura 15 – Distribuição dos resíduos obtida para cada nível de concentração de NAP com fatores de ponderação $1/x$ (A) e $1/x^2$ (B) e de SUM sem fator de ponderação (C) e com fator de ponderação $1/x$ (D).....	131
Figura 16 – Curvas de calibração obtidas para NAP (A) e SUM (B).....	133
Figura 17 – Intensidade da hemólise no plasma utilizado na validação (A) e nas amostras dos voluntários (B), (C), (D) e amostra normal (E).....	146
Figura 18 – Cromatogramas obtidos para a amostras de plasma com HEPA (A) ou EDTA (B) do voluntário 2 no tempo de 2:30 horas após administração dos medicamentos.....	147
Figura 19 – Curvas de concentração plasmática <i>versus</i> tempo para NAP e SUM em amostras de plasma contendo HEPA, analisadas a partir de uma curva de calibração preparada em HEPA.....	154
Figura 20 – Curvas de concentração plasmática média <i>versus</i> tempo para NAP e SUM em amostras de plasma contendo HEPA (A) ou EDTA (B) obtidas a partir das três curvas de calibração.....	156

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Solventes e soluções utilizados nos procedimentos descritos na literatura para extração de NAP e/ou SUM de plasma.....	67
Tabela 2 – Condições dos métodos descritos na literatura para quantificação de NAP e/ou SUM por CLAE-EM ou CLAE-EM/EM.....	68
Tabela 3 – Composição das soluções de lavagem e extratoras utilizadas nos testes de EFS para extração simultânea de NAP e SUM em plasma humano.....	78
Tabela 4 – Concentrações das amostras de HEPA, EDTA e CPDA utilizadas no ensaio.....	81
Tabela 5 – Parâmetros espectrométricos para quantificação simultânea de NAP e SUM.....	104
Tabela 6 – TRs para NAP, SUM, ACE e NAR e tempo total de corrida obtidos por CLAE-EM/EM com ionização por IES(+).	110
Tabela 7 – Proposta de diluição das soluções estoque e em plasma de NAP e SUM utilizada no desenvolvimento, validação e aplicação do método bioanalítico.....	112
Tabela 8 – Proposta de diluição das soluções estoque e de trabalho de NAR utilizada no desenvolvimento, validação e aplicação do método bioanalítico.....	113
Tabela 9 – Proposta de diluição da solução estoque/trabalho de ACE utilizada no desenvolvimento, validação e aplicação do método bioanalítico.....	113
Tabela 10 – Taxas de recuperação obtidas nas melhores condições das três técnicas de extração para NAP, SUM, ACE e NAR nas concentrações do CQB e CQA.....	117
Tabela 11 – Taxas de efeito matriz obtidas nas melhores condições das três técnicas de extração para NAP, SUM, ACE e NAR nas concentrações do CQB e CQA.....	117
Tabela 12 – Áreas médias dos vales obtidas no canal de transição de massas de NAP para amostras de HEPA, EDTA e CPDA em FM, nas três concentrações analisadas.....	118
Tabela 13 – $FMNs_{NAP/ACE}$ e $FMNs_{SUM/NAR}$ obtidos a partir dos resultados do ensaio de efeito matriz para os três tipos de matriz analisados (HEPA, EDTA e CPDA).....	123
Tabela 14 – Resultados dos testes F e t para NAP e SUM, nas três matrizes analisadas, considerando a área sob os picos.....	126

/continua.

LISTA DE TABELAS (continuação)

Tabela 15 – Resultados dos testes F e t para NAP e SUM, nas três matrizes analisadas, considerando as razões entre as áreas sob os picos $A_{\text{NAP}}/A_{\text{ACE}}$ e $A_{\text{SUM}}/A_{\text{NAR}}$	127
Tabela 16 – Valores das somas dos erros relativos das concentrações nominais <i>versus</i> as concentrações calculadas em três curvas de calibração, com fatores de ponderação $1/x$ e $1/x^2$ para NAP e sem ponderação e com fator $1/x$ para SUM nas três validações.....	130
Tabela 17 – Equações das retas e respectivos coeficientes de determinação obtidos para as três validações.....	132
Tabela 18 – Dados obtidos para construção das primeiras curvas de calibração de NAP e SUM nas três validações.....	134
Tabela 19 – Valores de CV% intracorrída e intercorrídas obtidos para as três validações.....	136
Tabela 20 – Valores de EPR% intracorrída e intercorrídas obtidos para as três validações.....	137
Tabela 21 – Dados obtidos para NAP e SUM na avaliação das amostras recém-preparadas para as três validações.....	138
Tabela 22 – Dados obtidos na avaliação da ECC para NAP e SUM nas três validações.....	139
Tabela 23 – Dados obtidos na avaliação da ECD para NAP e SUM nas três validações.....	140
Tabela 24 – Dados obtidos na avaliação da ELD para NAP e SUM nas três validações.....	141
Tabela 25 – Dados obtidos na avaliação da EPP para NAP e SUM nas três validações.....	142
Tabela 26 – Dados obtidos na avaliação da ESS à temperatura de trabalho de 22 ± 2 °C para NAP, ACE, SUM e NAR.....	143
Tabela 27 – Dados obtidos na avaliação da ESS à temperatura de armazenamento de 5 ± 3 °C para NAP, ACE, SUM e NAR.....	144
Tabela 28 – Dados antropométricos individuais da população de voluntários sadios que participaram do estudo e os dados antropométricos populacionais.....	145
Tabela 29 – Equações das retas e respectivos coeficientes de determinação obtidos para as três curvas de calibração.....	147

/continua.

LISTA DE TABELAS (conclusão)

Tabela 30 – Dados obtidos para construção das primeiras curvas de calibração de NAP e SUM nas três validações.....	148
Tabela 31 – Concentrações plasmáticas individuais de NAP calculadas a partir de cada uma das três curvas de calibração (HEPA, EDTA, CPDA) em cada tempo de coleta para as amostras coletadas em HEPA.....	150
Tabela 32 – Concentrações plasmáticas individuais de NAP calculadas a partir de cada uma das três curvas de calibração (HEPA, EDTA, CPDA) em cada tempo de coleta para as amostras coletadas em EDTA.....	151
Tabela 33 – Concentrações plasmáticas individuais de SUM calculadas a partir de cada uma das três curvas de calibração (HEPA, EDTA, CPDA) em cada tempo de coleta para as amostras coletadas em HEPA.....	152
Tabela 34 – Concentrações plasmáticas individuais de SUM calculadas a partir de cada uma das três curvas de calibração (HEPA, EDTA, CPDA) em cada tempo de coleta para as amostras coletadas em EDTA.....	153
Tabela 35 – Concentrações plasmáticas médias de NAP nas amostras de plasma de voluntários com HEPA ou EDTA calculadas a partir das três curvas de calibração.....	155
Tabela 36 – Concentrações plasmáticas médias de SUM nas amostras de plasma de voluntários com HEPA ou EDTA calculadas a partir das três curvas de calibração.....	156
Tabela 37 – Parâmetros farmacocinéticos calculados a partir das três curvas de calibração para NAP em plasma com HEPA ou EDTA.....	158
Tabela 38 – Parâmetros farmacocinéticos calculados a partir das três curvas de calibração para SUM em plasma com HEPA.....	159
Tabela 39 – Parâmetros farmacocinéticos calculados a partir das três curvas de calibração para SUM em plasma com EDTA.....	160

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a	Coeficiente linear
ACE	Aceclofenaco
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
AINE	Anti-inflamatório não esteroide
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC_{0-t}	Área sob a curva do tempo zero ao último tempo de coleta quantificado
$ASC_{0-\infty}$	Área sob a curva do tempo zero ao infinito (extrapolada)
b	Coeficiente angular
C_{18}	Sílica ligada a grupos octadecilsilano
CEBIO	Centro de Biotecnologia
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas Simples
CLAE-EM/EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial
cm	Centímetro
$C_{máx}$	Concentração plasmática máxima
CN	Concentração nominal
CNS/MS	Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde
CPDA	Solução de citrato de sódio, fosfato de sódio, ácido cítrico, dextrose e adenina

/continua.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (continuação)

CPD/SAG-M	Solução de citrato, fosfato e dextrose com salina, adenina, glicose e manitol
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
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
COX	Ciclo-oxigenase
CV%	Coeficiente de Variação
Da	Dalton
DPR	Desvio Padrão Relativo
ECC	Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento
ECD	Estabilidade de curta duração
EFS	Extração em fase sólida
ELD	Estabilidade de longa duração
ELL	Extração líquido-líquido
EM	Espectrometria de massas
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EPP	Estabilidade pós-processamento
EPR%	Erro Padrão Relativo
EPT	Extração por precipitação de proteínas
ESS	Estabilidade em solução
eV	Eletrovolt
F	Razão entre as variâncias

/continua.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (continuação)

FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FM	Fase móvel
FMN	Fator de matriz normalizado por padrão interno
g	Grama
<i>g</i>	Força centrífuga
h	Hora
H ₀	Hipótese nula
H _a	Hipótese alternativa
HEPA	Heparina sódica
HM	<i>High mass</i>
ICF	Instituto de Ciências Farmacêuticas de Estudos e Pesquisas
IES	Ionização por <i>Electrospray</i>
IMAO	Inibidores da monoaminoxidase
IMC	Índice de Massa Corpórea
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IPA	Ionização a Pressão Atmosférica
IQPA	Ionização Química à Pressão Atmosférica
Kcal	Quilocaloria
K _{EI}	Constante de eliminação
Kg	Quilograma
kV	Quilovolt
L	Litro
LIQ	Limite inferior de quantificação
LM	<i>Low mass</i>

/continua.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (continuação)

$\log P_{\text{octanol/água}}$	Coeficiente de partição
LSQ	Limite superior de quantificação
M	Molar (Mol/L)
m	Metro
MAO	Monoaminoxidase
MCP	<i>Micro-channel plate</i>
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MM	Massa molecular
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas
MTBE	Metil-terc-butil éter
m/z	Razão massa-carga
N	Tamanho amostral
NAP	Naproxeno
NAR	Naratriptano
ng	Nanograma
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Padrão interno
pKa	Constante de dissociação
r^2	Coeficiente de determinação
s	Segundo
SI	Solução intermediária

/continua.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (conclusão)

SNC	Sistema nervoso central
SPI	Solução de trabalho de padrão interno
SQR	Substância química de referência
SUM	Sumatriptano
t	t de <i>Student</i>
t_a	t da interseção da reta
t_b	t da inclinação da reta
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
$T_{máx}$	Tempo em que a concentração plasmática máxima é atingida
TR	Tempo de retenção
$T_{1/2}$	Meia-vida de eliminação
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UI	Unidade Internacional
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
Vol	Voluntário
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
V	Volt
v/v	Volume por volume
5-HT	5-hidroxitriptamina
α	Nível de significância
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	24
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	28
2.1 Quantificação de fármacos em matrizes biológicas.....	28
2.1.1 <u>Preparo de amostra</u>	30
2.1.2 <u>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas</u>	33
2.1.3 <u>Efeito matriz na ionização por <i>electrospray</i></u>	39
2.1.4 <u>Plasma sanguíneo, anticoagulantes e o efeito matriz</u>	43
2.2 Enxaqueca.....	48
2.3 Tratamento e profilaxia de crises de enxaqueca.....	51
2.3.1 <u>Triptanos</u>	54
2.3.1.1 <u>Succinato de sumatriptano</u>	56
2.3.2 <u>Anti-inflamatórios não esteroides</u>	59
2.3.2.1 <u>Naproxeno sódico</u>	60
2.3.3 <u>Associação de succinato de sumatriptano e naproxeno sódico</u>	63
2.4 Métodos bioanalíticos para quantificação de naproxeno sódico e succinato de sumatriptano em plasma humano.....	65
3 OBJETIVOS.....	70
3.1 Objetivo geral.....	70
3.2 Objetivos específicos.....	70
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	71
4.1 Materiais.....	71
4.1.1 <u>Substâncias químicas de referência (SQR) e medicamentos</u>	71
4.1.2 <u>Amostras de plasma humano</u>	71
4.1.3 <u>Reagentes</u>	72
4.1.4 <u>Acessórios e vidrarias</u>	72

/continua.

SUMÁRIO (continuação)

4.1.5 <u>Equipamentos</u>	73
4.2 Métodos	74
4.2.1 <u>Desenvolvimento de método bioanalítico para quantificação simultânea de naproxeno sódico e succinato de sumatriptano em plasma humano por CLAE-EM/EM</u>	74
4.2.1.1 <u>Determinação dos parâmetros espectrométricos</u>	74
4.2.1.2 <u>Determinação dos parâmetros cromatográficos</u>	75
4.2.1.3 <u>Determinação dos parâmetros de preparo de amostra</u>	76
4.2.2 <u>Avaliação da influência de HEPA, EDTA e CPDA sobre a seletividade do método bioanalítico desenvolvido</u>	80
4.2.3 <u>Validação de método bioanalítico para quantificação simultânea de naproxeno sódico e succinato de sumatriptano em plasma humano coletado com HEPA, EDTA ou CPDA por CLAE-EM/EM</u>	81
4.2.3.1 <u>Seletividade</u>	82
4.2.3.2 <u>Efeito residual</u>	83
4.2.3.3 <u>Efeito matriz</u>	84
4.2.3.3.1 Determinação de acordo com a RDC nº 27.....	85
4.2.3.3.2 Determinação de acordo com outros guias.....	86
4.2.3.4 <u>Linearidade da faixa de trabalho</u>	88
4.2.3.5 <u>Precisão</u>	89
4.2.3.6 <u>Exatidão</u>	90
4.2.3.7 <u>Estabilidade dos analitos em matriz biológica</u>	90
4.2.3.7.1 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento.....	92
4.2.3.7.2 Estabilidade de curta duração.....	92
4.2.3.7.3 Estabilidade de longa duração.....	93
4.2.3.7.4 Estabilidade pós-processamento.....	93

/continua.

SUMÁRIO (continuação)

4.2.3.8 <u>Estabilidade dos analitos e Pls em solução</u>	93
4.2.4 Estudo de avaliação farmacocinética simultânea de naproxeno sódico 275 mg e de succinato de sumatriptano 50 mg sob a forma de comprimidos revestidos	94
4.2.4.1 <u>Etapa clínica</u>	95
4.2.4.2 <u>Etapa analítica</u>	99
4.2.4.3 <u>Etapa estatística</u>	100
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	102
5.1 Desenvolvimento de método bioanalítico para quantificação simultânea de naproxeno sódico e succinato de sumatriptano em plasma humano por CLAE-EM/EM	102
5.1.1 <u>Determinação dos parâmetros espectrométricos</u>	103
5.1.2 <u>Determinação dos parâmetros cromatográficos</u>	108
5.1.3 <u>Determinação dos parâmetros de preparo de amostra</u>	113
5.2 Avaliação da influência de HEPA, EDTA e CPDA sobre a seletividade do método bioanalítico desenvolvido	117
5.3 Validação de método bioanalítico para quantificação simultânea de naproxeno sódico e succinato de sumatriptano em plasma humano com HEPA, EDTA ou CPDA por CLAE-EM/EM	119
5.3.1 <u>Seletividade</u>	119
5.3.2 <u>Efeito residual</u>	121
5.3.3 <u>Efeito matriz</u>	122
5.3.3.1 <u>Determinação de acordo com a RDC nº 27</u>	122
5.3.3.2 <u>Determinação de acordo com outros guias</u>	124
5.3.4 <u>Linearidade da faixa de trabalho</u>	129
5.3.5 <u>Precisão e exatidão</u>	135
5.3.6 <u>Estabilidade dos analitos em matriz biológica</u>	137

/continua.

SUMÁRIO (continuação)

5.3.6.1 <u>Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento</u>	139
5.3.6.2 <u>Estabilidade de curta duração</u>	140
5.3.6.3 <u>Estabilidade de longa duração</u>	141
5.3.6.4 <u>Estabilidade pós-processamento</u>	142
5.3.7 <u>Estabilidade dos analitos e Pls em solução</u>	143
5.3.7.1 <u>Estabilidade à temperatura de trabalho</u>	143
5.3.7.2 <u>Estabilidade à temperatura de armazenamento</u>	144
5.4 Estudo de avaliação farmacocinética simultânea de naproxeno sódico 275 mg e de succinato de sumatriptano 50 mg sob a forma de comprimidos revestidos.....	144
5.4.1 <u>Etapa clínica</u>	144
5.4.2 <u>Etapa analítica</u>	145
5.4.3 <u>Etapa estatística</u>	149
5.5 Considerações finais.....	161
6 CONCLUSÕES.....	163
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	164
APÊNDICE A – Resumo enviado ao 24th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis – PBA 2013.....	182
APÊNDICE B – Resumos enviados ao XIV Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas – COLACRO 2012.....	183
APÊNDICE C – Resumo enviado a XXII Semana de Iniciação Científica da UFMG – SIC 2013.....	185
ANEXO A – Certificado de participação no 24th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis – PBA 2013.....	186
ANEXO B – Certificados de participação no XIV Congresso Latino- Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas – COLACRO 2012.....	187

/continua.

SUMÁRIO (conclusão)

ANEXO C – Certificado de apresentação de trabalho na XXII Semana de Iniciação Científica da UFMG – SIC 2013.....	189
ANEXO D – Parecer Consubstanciado do CEP para estudo de avaliação farmacocinética simultânea de naproxeno sódico 275 mg e succinato de sumatriptano 50 mg sob a forma de comprimidos revestidos.....	190

1 INTRODUÇÃO

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial (CLAE-EM/EM) é a técnica de escolha para análise de fármacos e metabólitos em matrizes biológicas na área farmacêutica (POLSON *et al.*, 2003). Os métodos bioanalíticos utilizados em estudos que objetivam avaliar a biodisponibilidade/bioequivalência ou farmacocinética de medicamentos exigem elevado grau de confiabilidade nos resultados devido ao enorme impacto sobre a saúde pública (BRESSOLE; BROMET-PETIT; AUDRAN, 1996).

O uso de CLAE-EM/EM para determinação ou quantificação de fármacos em fluidos biológicos é uma estratégia na obtenção de um método de análise com alta seletividade e sensibilidade. Entretanto, nos últimos anos, vem sendo reportados diversos exemplos de baixa seletividade em decorrência da supressão ou da indução do sinal analítico causadas por interferentes oriundos da matriz biológica. Substâncias coeluidas com o analito, mas não detectadas, podem reduzir ou aumentar a intensidade do sinal correspondente à transição de massas desse analito, afetando a precisão, exatidão, robustez, seletividade e sensibilidade do método. Esse fenômeno é denominado efeito matriz e sua determinação nas etapas de desenvolvimento e validação é fundamental para assegurar a confiabilidade e seletividade do método (CHAMBERS *et al.*, 2007; KUSHNIR *et al.* 2005; MATUSZEWSKI; CONSTANZER; CHAVEZ-ENG, 2003; SENNBRO *et al.*, 2011a).

A principal matriz biológica utilizada em estudos farmacocinéticos e de biodisponibilidade/bioequivalência é o plasma sanguíneo, embora outras matrizes complexas, tais como soro, urina, bile e tecidos também são utilizadas (BRASIL, 2002; SADAGOPAN *et al.*, 2003). O plasma corresponde a 55% do volume do sangue humano e é constituído por 90% de água e 10% de elementos sólidos, como proteínas, lipídeos, glicose, ácidos, sais, vitaminas, minerais, hormônios e enzimas (CHAMBERS *et al.*, 2007; SOUZA; ELIAS, 2006).

O plasma é obtido após centrifugação do sangue coletado em tubos ou bolsas contendo anticoagulante para minimizar a formação de coágulos sanguíneos, os

quais aprisionam parte do plasma em seu interior, resultando na obtenção de baixo volume de plasma livre. Os anticoagulantes mais utilizados são heparina, ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e, em caso de coleta em bolsas, a mistura de citrato de sódio, fosfato de sódio, ácido cítrico, dextrose e adenina (CPDA) ou citrato, fosfato e dextrose com salina, adenina, glicose e manitol (CPD/SAG-M). Diferentes anticoagulantes podem afetar as propriedades do plasma de modo e intensidade característicos, de acordo com o mecanismo de inibição da coagulação. A alteração da composição da matriz devido à presença de anticoagulantes, bem como de interferentes endógenos, especialmente em casos de lipemia ou hemólise acentuadas, pode impactar na estabilidade dos analitos e na confiabilidade do método de análise pela ocorrência de efeito matriz expressivo (CHAMBERS *et al.*, 2007; SADAGOPAN *et al.*, 2003; SENNBRO *et al.*, 2011a).

O potencial hidrogeniônico (pH) do plasma pode variar de acordo com a concentração de íons e das substâncias presentes. As técnicas de extração, separação e detecção utilizadas em métodos bioanalíticos são intrinsecamente dependentes do pH do meio. Durante o processo de extração, a separação do analito dos demais constituintes da matriz ocorre, em geral, por transferência do meio aquoso para o meio orgânico. Essa separação pode ocorrer por partição da amostra entre duas fases (extração líquido-líquido e em fase sólida com fase ligada) ou por precipitação das proteínas plasmáticas com solvente orgânico em meio ácido ou básico, sendo que o pH do meio e do fármaco influenciam diretamente no resultado obtido (recuperação do analito, degradação e pureza do extrato final) (POLSON *et al.*, 2003; QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001; TRUFELLI *et al.*, 2010). Já nas etapas de separação cromatográfica e de detecção por Espectrometria de Massas (EM), o pH do meio influenciará diretamente na ionização do fármaco e de possíveis interferentes extraídos, impactando sobre a intensidade de sinal, ocorrência de efeito matriz, tempo de corrida, resolução e qualidade dos picos obtidos (CHAMBERS *et al.*, 2007; KING *et al.*, 2000; MURGU, 2009; TRUFELLI *et al.*, 2010; WATERS, 2002).

A ocorrência de interferências em um método bioanalítico não depende apenas do tipo de anticoagulante usado ou da condição do plasma, mas está intrinsecamente

relacionada ao fármaco analisado (KING *et al.*, 2000; SENNBRO *et al.*, 2011b; SØRENSEN, 2011; TRUFELLI *et al.*, 2010). Estabelecer correlações entre a constituição da matriz e sua influência sobre a análise de um determinado fármaco possui enorme impacto positivo no desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos, direcionando o pesquisador no planejamento experimental e, com isso, reduzindo o tempo gasto para tal. Além disso, é possível extrapolar conclusões obtidas com um fármaco para outros que possuam características semelhantes, tais como estrutura química, grupos funcionais e caráter iônico, especialmente para as mesmas classes terapêuticas.

Em determinações simultâneas de dois ou mais fármacos, o impacto da constituição da matriz sobre os parâmetros monitorados em um método bioanalítico é ainda maior, pois além do desafio de se obter uma única condição analítica adequada para todos os analitos, podem ocorrer interações entre os fármacos resultando em novas dificuldades no desenvolvimento do método. Inúmeras associações medicamentosas são utilizadas na terapêutica de diversas doenças, seja em uma mesma formulação ou em apresentações distintas para uso simultâneo (BRASIL, 2004; BRASIL, 2013b).

Os critérios de seleção de um ou mais fármacos para avaliação da influência de anticoagulantes sobre parâmetros da validação de um método bioanalítico variam de acordo com os objetivos e com as condições de realização do estudo. A escolha da associação de succinato de sumatriptano com naproxeno sódico, utilizada no tratamento de crises de enxaqueca, para a realização do presente estudo tem sua justificativa:

- a) na ampla diferença de caráter iônico dos fármacos, permitindo a avaliação da influência dos parâmetros monitorados sobre fármacos de caráter ácido e básico simultaneamente;
- b) nas concentrações plasmáticas máximas ($C_{máx}$) atingidas em tempos semelhantes e relativamente curtos ($T_{máx}$) de aproximadamente 2 horas, facilitando a obtenção de concentrações máximas dos dois fármacos em amostras coletadas com os voluntários ainda em jejum, minimizando interferências decorrentes da alimentação e evitando internação prolongada;

- c) nos efeitos colaterais relativamente leves, preservando o bem estar dos voluntários;
- d) e na ampla utilização da associação no tratamento de crises de enxaqueca.

A Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos para registro e pós-registro de medicamentos no Brasil e exige a aplicação do método validado em amostras contendo o mesmo anticoagulante utilizado na validação. Entretanto, há poucos estudos na literatura investigando a influência de diferentes tipos de anticoagulantes sobre os parâmetros da validação de métodos bioanalíticos, principalmente de anticoagulantes utilizados em bolsas de coleta de sangue, como CPDA. Após a recomendação para utilização do mesmo anticoagulante na validação e aplicação de métodos bioanalíticos, o plasma impróprio para uso em seres humanos (plasma vencido) coletado em bolsas deixou de ser utilizado na validação de métodos. Com isso, um número expressivo de bolsas de plasma sem uso terapêutico é descartado semanalmente e, a coleta de sangue de voluntários exclusivamente para a validação de métodos é feita para suprir a carência de plasma (BRASIL, 2001; BRASIL, 2011).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Quantificação de fármacos em matrizes biológicas

A utilização da bioanálise para quantificação de fármacos e de seus metabólitos em matrizes biológicas, tais como soro, plasma, sangue, urina, e saliva, é fundamental na avaliação e interpretação de estudos clínicos, como os farmacocinéticos, de biodisponibilidade e de bioequivalência, e em estudos não clínicos, como os toxicocinéticos. A qualidade destes estudos, muitas vezes utilizados na solicitação de registro de medicamentos inovadores, genéricos ou similares ou em casos de alterações, inclusões e/ou notificações pós-registro, está diretamente relacionada com a qualidade e confiabilidade dos resultados obtidos (BRASIL, 2002; BRASIL, 2007a; BRASIL, 2007b; CASSIANO *et al.*, 2006; DEVANSHU *et al.*, 2010; EMA, 2011; FDA, 2013; SAVOIE, N. *et al.*, 2009; VISWANATHAN *et al.*, 2007).

Os métodos analíticos utilizados na quantificação de fármacos em matrizes biológicas são denominados como bioanalíticos e caracterizam-se pela associação de técnicas analíticas de separação e detecção com procedimentos de preparo de amostra para extração dos analitos. Considerando o impacto dos resultados fornecidos pela bioanálise na saúde da população, é fundamental que os métodos bioanalíticos sejam bem desenvolvidos, caracterizados e validados, além de um rigoroso controle sobre a precisão e a exatidão de equipamentos e instrumentos, qualidade das substâncias químicas e materiais e qualificação e treinamento dos analistas. Diversos fatores podem influenciar na precisão e exatidão do método bioanalítico, sendo mais impactantes as alterações de laboratórios, analistas, instrumentos, softwares, metodologia, tipo e composição da matriz, espécie animal, procedimento de preparo de amostra e faixa de trabalho (BRASIL, 2003a; BRASIL, 2012; FDA, 2013; VISWANATHAN *et al.*, 2007)

O método bioanalítico, geralmente é definido a partir de modificações e adaptações de métodos previamente publicados no meio científico, já que não existem métodos disponíveis em compêndios oficiais. Em geral, no desenvolvimento de um método bioanalítico são monitorados os parâmetros de recuperação, seletividade, efeito matriz, precisão, exatidão e linearidade da faixa de trabalho. Após o

desenvolvimento, vários ensaios que constituem o processo de validação são conduzidos para demonstrar que o método pode ser utilizado para sua aplicação pretendida. A validação deve demonstrar e assegurar que o método atenda aos critérios estabelecidos por meio de ensaios de precisão, exatidão, efeito residual, seletividade e efeito matriz do método, linearidade da faixa de trabalho e estabilidade dos analitos. Cada etapa e condições do método devem ser investigadas para determinar a extensão na qual as variáveis do processo, como ambiente e matriz, podem afetar a quantificação do analito. A complexidade dos procedimentos de preparo de amostra leva à adoção da técnica de padronização interna na maior parte das aplicações dos métodos bioanalíticos, como em estudos de bioequivalência, principalmente quando são utilizadas técnicas cromatográficas para separação dos analitos. As principais técnicas de separação e detecção utilizadas são a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada à Espectrometria de Massas Simples (CLAE-EM) ou Sequencial (CLAE-EM/EM) (BRASIL, 2003a; DEVANSHU *et al.*, 2010; FDA, 2013; NIESSEN, 2006; SARFARAZ; VIEIRA; CAMPOS, 2007; SAVOIE, N. *et al.*, 2009; VIEIRA; CAMPOS, 2011; VISWANATHAN *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2005).

Os estudos de biodisponibilidade são utilizados para mensurar o impacto de alterações na formulação de um medicamento ou nas propriedades físico-químicas de um fármaco sobre sua farmacocinética. Diversos fatores, como formulação e método de produção, podem afetar a biodisponibilidade e a estabilidade do fármaco, de modo que os fabricantes de medicamentos genéricos ou similares devem demonstrar a bioequivalência com o medicamento referência. Estudos de bioequivalência apresentam, como principal propósito, obter evidências de que uma formulação teste não é diferente, do ponto de vista farmacocinético, de uma formulação referência, sendo que dois medicamentos são considerados bioequivalentes se a biodisponibilidade do fármaco no medicamento teste não for estatisticamente diferente, quanto à velocidade e extensão de absorção e eliminação, da biodisponibilidade no medicamento referência, quando administrados na mesma dose, sob condições experimentais semelhantes. As alterações na biodisponibilidade de um fármaco em um determinado medicamento podem comprometer a resposta clínica e levar à ocorrência de eventos adversos inesperados. Medicamentos bioequivalentes, em geral, apresentam eficácia clínica e

perfil de segurança semelhantes, podendo ser substituídos uns pelos outros (BRASIL, 2002; DEVANSHU *et al.*, 2010; FDA, 2003; FDA, 2013; SHARGEL; WU-PONG; YU, 2005; VIEIRA; CAMPOS, 2011).

2.1.1 Preparo de amostra

A quantificação de fármacos em matrizes biológicas utilizando a CLAE e a EM como técnicas de separação e de detecção, em geral, exige um tratamento prévio da amostra. O preparo de amostra é a etapa inicial e uma das mais críticas do desenvolvimento de métodos bioanalíticos que utilizam CLAE-EM ou CLAE-EM/EM. Amostras biológicas, como sangue, plasma e soro, são matrizes com constituição complexa, contendo proteínas (albumina e glicoproteína α), sais, lipídeos, anticoagulantes e outros inúmeros componentes. Essas substâncias endógenas e exógenas possuem um alto potencial para redução da estabilidade do fármaco na solução final da extração e são, muitas vezes, incompatíveis com as colunas cromatográficas e com os espectrômetros de massas, provocando degradação ou entupimento da coluna e efeito matriz, principalmente quando se utiliza Ionização por *Electrospray* (IES). Desse modo, o preparo de amostra destina-se ao fornecimento de uma solução homogênea, reprodutível, contendo os analitos e o mínimo possível de constituintes da matriz original, para que seja compatível e adequada às técnicas de separação e detecção utilizadas. A extração também pode ser necessária para concentração ou derivatização do analito (CHANG *et al.*, 2007; DEVANSHU *et al.*, 2010; HOPFGARTNER; BOURGOGNE, 2003; KING *et al.*, 2000; QUEIROZ *et al.*, 2001; XU *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2005).

As técnicas de preparo de amostra mais utilizadas para extração de fármacos do plasma sanguíneo são: extração líquido-líquido (ELL); extração por precipitação de proteínas (EPT) e extração em fase sólida (EFS). Além dessas técnicas tradicionais, outras mais modernas, como extração com fluido supercrítico, microextração em fase sólida, extração em membranas sólidas (diálise e ultrafiltração) ou líquidas, são utilizadas em menor escala na rotina dos estudos de biodisponibilidade, bioequivalência e farmacocinética. É comum a associação de mais de uma técnica de preparo de amostra em um único procedimento para aumentar a eficácia da

extração, principalmente quando se almeja a quantificação simultânea de vários analitos. Uma técnica de extração ideal deve ser simples e rápida, com poucas etapas e o máximo possível de automatização do processo, ter baixo custo, altas taxas de recuperação, boa precisão e exatidão para os analitos e fornecer extratos com o mínimo de interferentes possível. É importante citar que atualmente é desejável também que haja baixo consumo de solvente orgânico (CHANG *et al.*, 2007; DEVANSHU *et al.*, 2010; HOPFGARTNER; BOURGOGNE, 2003; KING *et al.*, 2000; MITRA, 2003; QUEIROZ *et al.*, 2001; SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; XU *et al.*, 2007).

Em geral o preparo de amostra é a etapa limitante na velocidade dos métodos bioanalíticos por CLAE-EM ou CLAE-EM/EM, já que essas técnicas permitem a realização de análises muito rápidas e que a extração envolve várias etapas, muitas vezes, com baixo nível de automatização. Em comparação com a operação manual, a automatização do processo de preparo de amostra reduz em até 50% o tempo gasto. Deste modo, numerosos esforços tem sido feitos para reduzir o tempo de preparo de amostras e aumentar a reprodutibilidade dos resultados. Vários procedimentos de EPT, ELL e EFS tem sido realizados por meio de processos automatizados ou semi-automatizados. Entretanto, o custo elevado de aquisição e manutenção dos equipamentos disponíveis para automatização dificulta a implantação nos laboratórios quando se analisa a relação entre custo e benefício (DEVANSHU *et al.*, 2010; HOPFGARTNER; BOURGOGNE, 2003; MITRA, 2003; QUEIROZ *et al.*, 2001; SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; XU *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2005).

A ELL baseia-se nos princípios da solubilidade diferencial e do equilíbrio de partição de moléculas do analito entre duas fases imiscíveis: orgânica e aquosa. Sua eficiência depende da afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão entre os volumes das fases e do pH da amostra. A afinidade pela fase orgânica pode ser aumentada pela formação de par iônico com solutos ionizáveis ou de complexos lipofílicos com íons metálicos, pela adição de sais neutros, para reduzir a solubilidade de compostos orgânicos na fase aquosa, e pelo ajuste do pH, para evitar a ionização de ácidos ou bases. A ELL é uma técnica simples, com custo

relativamente baixo e permite a utilização de vários solventes, o que leva a uma alta seletividade, a uma ampla faixa de solubilidade e a obtenção de extratos bastante limpos, como consequência da escolha de um solvente adequado e da desnaturação parcial das proteínas plasmáticas. Entretanto, a ELL não é muito eficaz para substâncias altamente hidrofílicas, nem para substâncias termicamente instáveis, pois, em geral, possui uma etapa de evaporação do solvente extrator sob aquecimento. Além disso, exige o uso de volumes relativamente altos de amostras e de solventes. Os solventes orgânicos mais utilizados na ELL para extração de fármacos do plasma são éter dietílico, acetato de etila, diclorometano, metil-*tec*-butil éter (MTBE), hexano e tolueno, isolados ou em soluções (CHANG *et al.*, 2007; DEVANSHU *et al.*, 2010; HOPFGARTNER; BOURGOGNE, 2003; NIESSEN, 2006; QUEIROZ *et al.*, 2001; XU *et al.*, 2007).

A EPT é utilizada na quantificação de fármacos em plasma para quebra das ligações existentes entre analitos e proteínas plasmáticas por desnaturação, permitindo a extração e recuperação para posterior análise. Embora seja uma técnica muito simples, rápida e de baixo custo, em geral, a EPT fornece extratos menos sujos que a ELL e a EFS, sendo mais susceptível ao efeito matriz. Sua utilização como precursora de outras técnicas é muito comum e existem diversos tipos de agentes precipitantes, cada um com um mecanismo de precipitação específico. Os solventes orgânicos diminuem a constante dielétrica da matriz e deslocam as moléculas de água dispostas em torno das regiões hidrofóbicas na superfície protéica, facilitando as interações eletrostáticas entre as proteínas e resultando na agregação. As soluções ácidas formam sais insolúveis com os grupos amino carregados positivamente das proteínas em pH abaixo do ponto isoelétrico. Já as soluções concentradas, ou saturadas de sal, precipitam as proteínas por deslocamento das moléculas de água para solvatação do sal. Por fim, os íons metálicos deslocam os prótons dos sítios de ligação coordenada nos aminoácidos expostos, resultando na redução do pH da solução. Embora o aquecimento também cause a desnaturação das proteínas, esse procedimento não é muito utilizado para evitar a degradação dos fármacos. Os agentes precipitantes mais utilizados são metanol, acetonitrila, acetona, etanol, ácido tricloroacético e sulfato de zinco (CHANG *et al.*, 2007;

DEVANSHU *et al.*, 2010; HOPFGARTNER; BOURGOGNE, 2003; NIESSEN, 2006; POLSON *et al.*, 2003; TAYLOR, 2005; XU *et al.*, 2007).

A EFS emprega sorventes dispostos em cartuchos com formato de seringa ou em discos e os mecanismos de retenção são idênticos àqueles envolvidos na CLAE por fase normal, fase reversa ou troca iônica, permitindo a extração de compostos hidrofílicos e/ou lipofílicos, básicos, neutros ou ácidos. Os sorventes disponíveis são similares aos usados na CLAE, embora com tamanho de partícula maior, para assegurar uma permeabilidade razoável. A seletividade, a recuperação e o efeito matriz variam de acordo com os tipos e as quantidades de sorventes e solventes de lavagem e de eluição empregados na extração. Embora a EFS possa fornecer maior reprodutibilidade, extratos mais limpos, altas taxas de recuperação e maior produtividade que a ELL e a EPT, o gasto com a constante aquisição de cartuchos é o fator limitante para a aplicação dessa técnica na rotina de análises dos estudos de bioequivalência, tendo em vista o grande número de amostras (CHANG *et al.*, 2007; DEVANSHU *et al.*, 2010; HOPFGARTNER; BOURGOGNE, 2003; LANÇAS, 2004; NIESSEN, 2006; QUEIROZ *et al.*, 2001; XU *et al.*, 2007).

2.1.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas

Nos últimos anos, a associação da CLAE com a EM/EM e a Ionização a Pressão Atmosférica (IPA) tem substituído quase completamente os detectores espectrofotométricos (ultravioleta/visível), fluorimétricos e eletroquímicos no setor bioanalítico. As fontes de IPA mais utilizadas são a IES e a Ionização Química à Pressão Atmosférica (IQPA). A CLAE-EM/EM é uma técnica analítica altamente eficaz que combina as vantagens da cromatografia (alto poder de purificação dos analitos e de resolução dos picos) com as vantagens da EM sequencial (seletividade e sensibilidade elevadas), resultando na obtenção de métodos precisos, exatos e com alta velocidade de análise. Essas características são desejáveis e fundamentais para métodos bioanalíticos, já que a utilização de matrizes complexas contendo vários analitos, muitas vezes em baixíssimas concentrações, dificulta a separação total dos componentes da matriz, impedindo a identificação inequívoca das

substâncias de interesse com detectores espectrofotométricos, por exemplo. O princípio da EM é a produção de íons a partir dos analitos, os quais são filtrados e detectados em função de sua razão massa/carga (m/z), resultando em um espectro de massas em que apenas os íons selecionados serão detectados. Com isso, tem-se um aumento significativo da seletividade, que é fundamental para a análise de fármacos em matrizes complexas, permitindo a detecção de substâncias com tempos de retenção (TRs) semelhantes ou idênticos (ARDREY, 2003; BANERJEE; MAZUMDAR, 2012; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; DEVANSHU *et al.*, 2010; HOFFMANN; STROOBANT, 2007; HOPFGARTNER; BOURGOGNE, 2003; KUSHNIR *et al.* 2005; MORAES; LAGO, 2003; NIESSEN, 2006; ZHOU *et al.*, 2005).

Um espectrômetro de massas é um instrumento contendo três principais componentes: uma fonte de ionização, responsável pelo fornecimento de íons gasosos para o analisador de massas, seja por simples evaporação da fase móvel (FM) contendo os íons ou por ionização das substâncias na própria fonte; um analisador de massas, o qual separa ou filtra os íons oriundos da fonte de acordo com suas razões m/z ; e um sistema de detecção, com a função de identificar e amplificar o sinal da corrente de íons que vem do analisador e transferi-lo para o sistema de processamento de dados. Os modelos de espectrômetros de massas mais utilizados em bioanálise são, geralmente, compostos por uma interface de IES ou IQPA, analisadores do tipo Quadrupolo, Tempo de Vôo ou *Ion Trap*, isolados ou associados (Quadrupolo-Quadrupolo, Quadrupolo-Tempo de Vôo, etc.) e um detector fotomultiplicador, multiplicador de elétrons ou *micro-channel plate* (MCP). Um espectro de massas é um gráfico da abundância relativa dos íons monitorados em função de suas razões m/z (BANERJEE; MAZUMDAR, 2012; DEVANSHU *et al.*, 2010; HOPFGARTNER; BOURGOGNE, 2003; MORAES; LAGO, 2003; NIESSEN, 2006).

A EM sequencial envolve duas etapas de seleção de íons com razões m/z específicas, de tal modo que a identificação do analito é feita através do estabelecimento da relação entre o íon precursor (isolado no primeiro estágio) e os íons produtos. Os íons de interesse são filtrados em um primeiro analisador de massas e transferidos para uma cela de colisão, onde repetidas colisões com um

gás inerte de elevada energia, geralmente argônio, hélio ou nitrogênio, levam a um aumento na energia potencial do íon, resultando na fragmentação. Os íons secundários formados na cela de colisão passam por um segundo analisador de massas que permite a seleção de um ou mais fragmentos. Em experimentos com Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM), uma ou mais transições de massas específicas de um íon precursor para um íon produto são selecionadas. Além de informações estruturais, o MRM aumenta a seletividade e a sensibilidade do método, favorecendo a aplicação dessa técnica na análise de substâncias presentes em baixas concentrações em matrizes complexas (ARDREY, 2003; BANERJEE; MAZUMDAR, 2012; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; DEVANSHU *et al.*, 2010; HOFFMANN; STROOBANT, 2007; HOPFGARTNER; BOURGOGNE, 2003; NIESSEN, 2006; ZHOU *et al.*, 2005).

Para que o acoplamento da CLAE com a EM seja possível é necessário que as características de cada equipamento não sejam afetadas com a conexão e que não ocorram modificações químicas descontroladas do analito durante a passagem do cromatógrafo para o espectrômetro de massas. Os principais desafios da associação dessas duas técnicas estão na obtenção de um fluxo de FM adequado tanto para a CLAE, quanto para a EM, e na adoção de um mecanismo eficaz para evaporação da FM e ionização dos analitos. Em geral, a vazão do eluente necessária para uma separação cromatográfica adequada é muito superior ao fluxo de entrada na fonte de ionização, o qual deve ser relativamente baixo para que seja possível evaporar todo o líquido e obter os íons na fase gasosa, condição exigida na utilização de espectrômetros de massas (ARDREY, 2003; BANERJEE; MAZUMDAR, 2012; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; ZHOU *et al.*, 2005).

Desse modo, a interface (fonte de ionização), para acoplamento da CLAE com a EM deve ser capaz de remover toda a FM líquida e de transferir os analitos para o estado gasoso, sob a forma ionizada, sem que ocorra degradação térmica ou fragmentação na fonte, além de minimizar a ionização de substâncias indesejáveis oriundas da matriz, favorecendo baixos níveis de ruído e de efeito matriz. Uma alternativa para a redução do fluxo sem prejuízo à separação cromatográfica é o uso de uma conexão tipo T entre a saída do cromatógrafo e a entrada do detector para a

divisão do fluxo. Esse procedimento aumenta a sensibilidade do método por evitar a saturação da fonte, e é adequado para a IES, uma vez que o sinal é dependente da concentração do analito na solução (ARDREY, 2003; BANERJEE; MAZUMDAR, 2012; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; ZHOU *et al.*, 2005).

Na tentativa de minimizar os problemas encontrados no acoplamento da CLAE com a EM foram desenvolvidas várias interfaces. A IES foi uma alternativa para a obtenção de íons no estado gasoso a partir de substâncias pouco voláteis presentes em uma fase líquida que, em muito pouco tempo, teve um crescimento enorme nas análises químicas e bioquímicas. Embora seja normalmente considerada como uma fonte de ionização, a IES é, na realidade, um processo de transferência de íons pré-existentes em solução para a fase gasosa, sendo a ionização na fonte um efeito secundário. A principal vantagem da IES sobre outras interfaces é que a dessolvatação ocorre gradualmente em temperaturas relativamente baixas, ocorrendo pouca ou nenhuma fragmentação na fonte. Isso leva à geração de íons gasosos com exatamente a mesma estrutura e carga das espécies em solução, permitindo a análise de substâncias polares, pouco voláteis e termicamente instáveis. Além disso, a capacidade de produzir íons multiplamente carregados reduz a razão m/z , facilitando a análise de compostos com elevada massa molecular (BANERJEE; MAZUMDAR, 2012; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; HOFFMANN; STROOBANT, 2007; KERBALE; VERKERK, 2009; MORAES; LAGO, 2003; ZHOU *et al.*, 2005).

A IES envolve a formação de um *spray* eletrostático à pressão atmosférica, a partir do qual são geradas pequenas gotas carregadas e dessas são liberados os íons. O *spray* é produzido por meio da aplicação de uma diferença de potencial de 1 a 7 kV entre o capilar por onde a solução contendo o analito é introduzida e um contra-eletrodo, geralmente, um cone de amostragem com temperatura elevada e orifício estreito, permitindo a entrada dos íons no analisador de massas. Caso o potencial elétrico aplicado no capilar seja positivo, os íons positivos migram em direção ao contra-eletrodo negativo, caracterizando o modo de ionização positivo (IES(+)). Na situação contrária (IES(-)), íons negativos migram em direção ao contra-eletrodo positivo (BANERJEE; MAZUMDAR, 2012; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008;

CROTTI *et al.*, 2006; KERBALE; VERKERK, 2009; MORAES; LAGO, 2003; SMERAGLIA; BALDREY; WATSON, 2002).

A diferença de potencial e a evaporação do solvente característicos do processo de dessolvatação promovem o aumento da densidade de cargas na solução e, conseqüentemente, do campo elétrico formado entre o capilar e o contra-eletrodo, provocando uma deformação do líquido na ponta do capilar em formato de cone, denominado cone de Taylor. Após a liberação de gotas altamente carregadas, as quais migram em direção ao contra-eletrodo, o efeito progressivo da dessolvatação leva a um aumento tão grande da densidade de cargas na gota que a repulsão entre os íons superam a tensão superficial do líquido, resultando na liberação de gotículas com uma enorme intensidade de cargas. Esse fenômeno é conhecido como “explosão coulômbica” e é fundamental para a redução progressiva das gotículas culminando na obtenção de íons isolados. O efeito de deformação responsável pela formação do cone de Taylor está presente também nas gotas livres, as quais sofrem a mesma deformação, de modo que durante a explosão são formadas gotículas principais e outras com tamanhos muito inferiores. A dessolvatação é assistida pela energia térmica do ambiente (aquecimento do capilar) e pelo fluxo contínuo de gás seco, geralmente nitrogênio. Esse modelo de formação de íons por fissões sucessivas é chamado Modelo da Carga Residual. Outro modelo que explica a formação de íons (Modelo da Evaporação do Íon) baseia-se na evaporação das gotas carregadas até o ponto em que as cargas presentes começam a sofrer repulsão eletrostática levando à expulsão de íons a partir das gotas (BANERJEE; MAZUMDAR, 2012; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; CROTTI *et al.*, 2006; KERBALE; VERKERK, 2009; MORAES; LAGO, 2003; SMERAGLIA; BALDREY; WATSON, 2002).

As propriedades químicas de substâncias orgânicas de baixo peso molecular influenciam nas características dos íons observados nos seus espectros de massas. Embora o objetivo principal da IES seja a transferência de íons já presentes na solução para a fase gasosa, as voltagens e as temperaturas aplicadas podem levar à produção de novas espécies ionizadas. As reações ácido-base, que resultam na formação de íons semi-moleculares (moléculas protonadas $[M+H]^+$) ou

desprotonadas ($[M-H]^-$) são as mais comuns. Substâncias que apresentam grupamentos básicos, principalmente as aminas, amidas e ésteres, normalmente são analisadas no modo positivo, enquanto que substâncias contendo funções ácidas, tais como ácidos carboxílicos e fenóis, são mais facilmente desprotonadas, sendo analisadas no modo negativo. Entretanto, moléculas cationizadas ou anionizadas ($[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+Cl]^-$, etc.), chamadas de adutos, podem ser formadas através da complexação com cátions (Na^+ , K^+ , NH_4^+) ou ânions (Cl^- , $HCOO^-$, CH_3COO^-) (BANERJEE & MAZUMDAR, 2012; CROTTI *et al.*, 2006; NIESSEN, 2006).

A extensão de formação de íons semi-moleculares ou adutos no interior do capilar pode ser controlada através do ajuste de alguns parâmetros experimentais, como pH da solução, potencial aplicado ao cone de amostragem, temperaturas da fonte de ionização e de dessolvatação, ou pela adição de substâncias que competem pelos cátions ou ânions. Já a formação de íons moleculares (M^{*+} ou M^{**+}) como produto de reações de oxirredução, ocorre em menor escala, já que a maior parte desses analitos não apresentam sistemas com alta densidade eletrônica (sistemas π policonjugados) e que a operação da fonte de ionização como célula eletrolítica depende de vários fatores, como, velocidade de fluxo da solução no capilar, magnitude da corrente e potencial de redução ou oxidação das espécies em solução (BANERJEE & MAZUMDAR, 2012; CROTTI *et al.*, 2006; NIESSEN, 2006).

O desenvolvimento de métodos bioanalíticos utilizando CLAE-EM/EM deve possuir, como primeira etapa, os experimentos de infusão direta no espectrômetro de massas para definição do modo de ionização, íons monitorados e parâmetros da EM, para posterior determinação das condições da CLAE e otimização do preparo de amostra. A escolha de quais íons serão monitorados é feita visando à obtenção de alta sensibilidade e seletividade, além de baixas taxas de efeito matriz, para obtenção de precisão e exatidão adequadas. O controle do pH da FM é fundamental para a ionização dos analitos e os solventes e aditivos mais utilizados como FM são água, acetonitrila, metanol, isopropanol, ácido fórmico, ácido acético, hidróxido de amônio, acetato de amônio e formiato de amônio. Sais não voláteis (fosfatos, boratos, citratos, etc.), substâncias surfactantes e ácidos inorgânicos (ácido

sulfúrico, ácido fosfórico, etc.) não devem ser utilizados. Na bioanálise por CLAE-EM/EM deve-se adotar a utilização de um padrão interno (PI), a fim de obter resultados suficientemente precisos e exatos. O PI pode ser um isótopo do analito ou um análogo estrutural, com propriedades físico-químicas o mais semelhantes possível. Diferenças tais como substituições alifáticas são preferíveis frente a alterações nos grupos funcionais polares (ARDREY, 2003; HOPFGARTNER; BOURGOGNE, 2003; KUSHNIR *et al.* 2005; NIESSEN, 2006).

2.1.3 Efeito matriz na ionização por *electrospray*

Embora a CLAE-EM/EM seja uma técnica robusta, seletiva e com alta sensibilidade, o potencial para ocorrência de efeito matriz na utilização da IES é a principal limitação na análise de matrizes biológicas complexas, principalmente plasma. Esse efeito é caracterizado pela supressão ou indução do sinal analítico em decorrência de interferentes da matriz coeluídos com o analito, e pode comprometer seriamente a precisão, exatidão, sensibilidade, seletividade e linearidade do método bioanalítico, sendo de fundamental importância sua avaliação detalhada durante o desenvolvimento e a validação (BHASKAR *et al.*, 2013; CHAMBERS *et al.*, 2007; DEVANSHU *et al.*, 2010; GILART *et al.*, 2012; GONZALEZ-COVARRUBIAS *et al.*, 2013; HOPFGARTNER; BOURGOGNE, 2003; KRUBE *et al.*, 2011; LEVERENCE *et al.*, 2007; MATUSZEWSKI; CONSTANZER; CHAVEZ-ENG, 2003; MEI *et al.*, 2003; NIESSEN, 2006; TAN *et al.*, 2007; TAYLOR, 2005; TRUFELLI *et al.*, 2010; VAN ECKHAUT *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2007).

Uma ampla variedade de substâncias pode induzir a ocorrência de efeito matriz, especialmente se estiverem presentes em concentrações elevadas no extrato final. Essas substâncias podem ser constituintes da própria matriz ou de diversas fontes externas que entraram em contato com a amostra durante a coleta, preparo ou análise. Os principais agentes endógenos causadores de efeito matriz são sais, surfactantes, substâncias polares, excipientes da formulação e várias moléculas orgânicas, tais como carboidratos, aminas, lípideos, proteínas, peptídeos, fármacos coadministrados, PIs e metabólitos com estrutura química semelhante a do analito. Já os interferentes exógenos mais comuns são anticoagulantes, resíduos de

polímeros, agentes plastificantes dos utensílios de plástico (tubos de coleta, ponteiros, tubos, etc), ftalatos, reagentes para pareamento iônico, ácidos orgânicos, tampões e materiais extraídos dos cartuchos de EFS (CHAMBERS *et al.*, 2007; DEVANSHU *et al.*, 2010; HOPFGARTNER; BOURGOGNE, 2003; KELLER *et al.*, 2008; LEVERENCE *et al.*, 2007; MEI *et al.*, 2003; NIESSEN, 2006; SMERAGLIA; BALDREY; WATSON, 2002; TAYLOR, 2005; TRUFELLI *et al.*, 2010; VAN ECKHAUT *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2005).

Embora o efeito matriz ocorra devido à presença desses agentes no extrato final, a natureza química do analito é determinante de sua susceptibilidade aos impactos da presença de interferentes, culminando na supressão ou indução do sinal analítico. Substâncias polares são mais afetadas pelo efeito matriz de supressão. Esse fato pode ser explicado através do modelo de equilíbrio de partição dentro das gotas, as quais possuem duas fases distintas: fase superficial com alta concentração de cargas; e fase neutra no interior da gota, constituída por moléculas do solvente, eletrólitos e analitos mais polares neutralizados. A maior afinidade por contra-íons faz com que as moléculas polares sejam neutralizadas, ficando “aprisionadas” no interior da gota, o que reduz a concentração de íons gasosos dessas substâncias e, conseqüentemente, o sinal analítico (HOPFGARTNER; BOURGOGNE, 2003; TAYLOR, 2005; TRUFELLI *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2007; SØRENSEN, 2011).

A compreensão dos mecanismos envolvidos na ocorrência de efeito matriz na IES é fundamental para estimar o potencial de supressão ou indução iônica que a matriz pode apresentar e para propor quais são os possíveis agentes causadores de efeito matriz. Embora diversos grupos de pesquisadores tenham discutido e proposto mecanismos para o efeito matriz, o caminho exato ainda não é totalmente compreendido. Qualquer evento que possa reduzir ou aumentar as taxas de formação de gotículas e de íons gasosos pode levar à supressão ou indução iônica, de tal modo que os mecanismos propostos podem ser divididos entre aqueles que ocorrem na fase líquida ou na fase gasosa (BHASKAR *et al.*, 2013; KING *et al.*, 2000; TRUFELLI *et al.*, 2010; VAN ECKHAUT *et al.*, 2009).

Substâncias coeluídas podem reduzir o sinal do analito na fase líquida por meio de quatro mecanismos: competição entre analito e interferentes com mesma carga pelo acesso a superfície das gotículas; aumento da viscosidade e da tensão superficial das gotas; formação de partículas sólidas com o analito pela presença de aditivos não voláteis; e ocorrência de pareamento iônico dos íons da matriz ou da FM com íons do analito previamente formados. Todos esses mecanismos dificultam a transferência de íons para a fase gasosa, reduzindo o sinal analítico. Algumas propriedades físico-químicas, como polaridade e ação surfactante (atividade de superfície) são essenciais para determinar se um interferente irá competir com o analito. Em matrizes biológicas, a alta concentração de compostos endógenos leva a uma saturação da gota, dificultando o acesso do analito à superfície, além de favorecer o aumento da viscosidade e da tensão superficial do líquido. Já na fase gasosa a supressão iônica pode ocorrer devido à perda da carga por meio de reações de neutralização ou de transferência para moléculas polares e neutras (BHASKAR *et al.*, 2013; CHAMBERS *et al.*, 2007; CHIN; ZHANG; KARNES, 2004; DEVANSHU *et al.*, 2010; KING *et al.*, 2000; MATUSZEWSKI; CONSTANZER; CHAVEZ-ENG, 2003; NIESSEN, 2006; TAYLOR, 2005; TRUFELLI *et al.*, 2010; VAN ECKHAUT *et al.*, 2009).

Os mecanismos da indução iônica são ainda menos esclarecidos que na supressão, provavelmente como consequência do menor índice de incidência desse efeito. Uma proposta para a ocorrência do efeito matriz de indução consiste no excesso de analitos na superfície da gota e no acúmulo de cargas, facilitando a transferência dos íons para a fase gasosa. Esse efeito pode ocorrer como consequência das propriedades físico-químicas dos interferentes e do analito, como no caso de interferentes que não são ionizados, ou tem menor facilidade de ionização no modo utilizado para análise (positivo ou negativo), os quais favorecem o posicionamento do analito na superfície. Dependendo das condições da fonte e do processo de evaporação, a competição pelas cargas disponíveis e pelo acesso à superfície das gotículas pode favorecer a ionização do analito (CHAMBERS *et al.*, 2007; LEVERENCE *et al.*, 2007; MATUSZEWSKI; CONSTANZER; CHAVEZ-ENG, 2003; TAYLOR, 2005; ZHOU *et al.*, 2005).

Existem dois principais tipos de efeito matriz: translacional e rotacional. O efeito matriz translacional é constante durante toda a faixa de trabalho utilizada no método, de modo que as curvas de calibração preparadas em matriz e em solução são paralelas, diferindo apenas no intercepto (coeficiente linear). O paralelismo observado é resultado de um efeito matriz causado apenas por influência de interferentes, sem envolvimento do analito. Em um gráfico indicativo de supressão iônica, a curva preparada em matriz está localizada abaixo da curva em solução e, na indução as posições são invertidas. Por outro lado, o efeito matriz rotacional é completamente dependente da concentração do analito, sendo mais expressivo nas concentrações mais altas. Esse efeito pode ser explicado por dois principais mecanismos: saturação da superfície das gotas nos últimos níveis da curva, quando são utilizadas faixas de trabalho muito extensas, dificultando a transferência de todos os íons do analito para a fase gasosa; ou produção dos agentes causadores a partir de interações entre interferentes da matriz e o analito, de modo que quanto maior for a concentração do analito, maior será o efeito supressor ou indutor. No efeito matriz rotacional as inclinações das curvas são diferentes, de modo que na supressão o coeficiente angular da curva em matriz é menor que o da curva em solução e na indução é maior. Os efeitos translacional e rotacional podem ocorrer simultaneamente em decorrência de mais de um tipo de interferente presente, afetando tanto o intercepto quanto a inclinação da curva (CHAMBERS *et al.*, 2007; HOPFGARTNER; BOURGOGNE, 2003; KING *et al.*, 2000; KRUBE *et al.*, 2011; KUSHNIR *et al.* 2005; TRUFELLI *et al.*, 2010; VAN ECKHAUT *et al.*, 2009).

Algumas das diversas alternativas disponíveis para minimizar ou eliminar o efeito matriz incluem: alteração da técnica de preparo de amostra para tornar a amostra mais limpa; modificação das condições cromatográficas, para aumentar a separação entre analito e interferentes; alterações nas condições de ionização (modo positivo para negativo, temperaturas e voltagens); troca por outro tipo de fonte (IES por IQPA), de forma a favorecer a obtenção dos íons gasosos; diluição ou injeção de menor volume da amostra; uso de PI (isótopo do analito ou um análogo estrutural) com TR semelhante ao analito para compensar o efeito matriz; redução do fluxo de entrada na fonte; troca da marca dos cartuchos para EFS e eliminação das fontes de interferentes, como troca dos utensílios de plástico por vidro, escolha adequada dos

frascos para coleta, detergentes para limpeza de vidrarias, tipo de anticoagulante, materiais de limpeza do laboratório, etc (ARDREY, 2003; CHAMBERS *et al.*, 2007; CHIN; ZHANG; KARNES, 2004; DEVANSHU *et al.*, 2010; GILART *et al.*, 2012; HOPFGARTNER; BOURGOGNE, 2003; KRUIVE *et al.*, 2011; LEVERENCE *et al.*, 2007; MATUSZEWSKI; CONSTANZER; CHAVEZ-ENG, 2003; MEI *et al.*, 2003; NIESSEN, 2006; SMERAGLIA; BALDREY; WATSON, 2002; TAYLOR, 2005; TRUFELLI *et al.*, 2010; VAN ECKHAUT *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2005).

2.1.4 Plasma sanguíneo, anticoagulantes e o efeito matriz

O sangue é o tecido fluido que circula pelo organismo entre os diversos órgãos transportando nutrientes, hormônios, eletrólitos, água, resíduos do metabolismo celular e diversas outras substâncias. Composto pelo plasma, que corresponde a aproximadamente 55% do volume total, e pelos elementos celulares (hemácias, plaquetas e leucócitos – neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos), o sangue, geralmente corresponde a cerca de 6 a 8% do peso corporal de adulto. Os leucócitos constituem um eficiente sistema de defesa do organismo contra agentes agressores, tóxicos ou infecciosos, e as plaquetas são corpúsculos ou fragmentos celulares fundamentais aos processos de hemostasia e coagulação sanguínea. As hemácias (glóbulos vermelhos ou eritrócitos) são as células mais numerosas no sangue e responsáveis pelo transporte de oxigênio para os tecidos e pela retirada do gás carbônico resultante do metabolismo celular. São constituídas por aproximadamente 60% de água e 40% de elementos sólidos: hemoglobina (90%), proteínas, substâncias gordurosas, lactato desidrogenase, potássio, magnésio, fosfato, cloro e sódio (CHANG *et al.*, 2007; SOUZA; ELIAS, 2006; YOUNG; BERMES; HAVERSTICK, 2008).

O plasma sanguíneo é um líquido viscoso amarelado que contém aproximadamente 90% de água e 10% de substâncias dissolvidas ou em suspensão, tais como proteínas, lipídeos, glicose, vitaminas, hormônios, enzimas, ácidos e sais orgânicos e minerais. As proteínas plasmáticas, principais componentes do plasma, influenciam as características biofísicas desse fluido, tais como densidade, viscosidade e pressão osmótica, e participam dos processos de nutrição dos tecidos,

coagulação, imunidade, regulação hormonal e equilíbrios eletrolítico e ácido-base. A concentração das proteínas plasmáticas varia de 60 a 80 g/L, sendo três vezes maior do que no líquido intersticial. A maior parte é constituída pela albumina, principal responsável pela manutenção da pressão osmótica coloidal do plasma e pelo transporte de substâncias endógenas e exógenas. Em menor proporção estão as globulinas (α , β e γ -globulinas), relacionadas à formação de anticorpos para a defesa do organismo e pelo transporte de substâncias, e o fibrinogênio, uma proteína fundamental no processo de coagulação do sangue (CHANG *et al.*, 2007; SHARGEL; WU-PONG; YU, 2005; SOUZA; ELIAS, 2006).

As principais matrizes biológicas utilizadas em estudos de biodisponibilidade, bioequivalência e farmacocinética são o plasma e o soro. Sangue total e urina também são utilizados, porém em menor escala. O sangue geralmente é coletado por punção venosa (venopuntura) e o plasma obtido pela centrifugação do sangue total não coagulado. A coagulação sanguínea é evitada através da coleta em tubos ou bolsas contendo anticoagulantes específicos. Para obtenção de soro, o sangue é colhido em tubo sem anticoagulante e deixado coagular por um período de 30 a 60 minutos, à temperatura ambiente. Após este tempo, o tubo é centrifugado e a parte líquida, correspondente ao soro, é separada. Algumas substâncias podem ser dosadas tanto no soro quanto no plasma (ANDRIOLO *et al.*, 2010; BAIN, 2006; CHANG *et al.*, 2007; LEWIS; TATSUMI, 2006; SHARGEL; WU-PONG; YU, 2005; SOUZA; ELIAS, 2006; YOUNG; BERMES; HAVERSTICK, 2008).

As vantagens da utilização de plasma em relação ao soro incluem redução do tempo de espera para a coagulação, obtenção de maior volume de plasma do que de soro e ausência de interferência advinda do processo de coagulação e da lise celular, a qual é mais frequente no soro e aumenta as concentrações de substâncias, como hemoglobina livre, potássio, magnésio, fosfato, cloro, sódio, amônia e lactato. Os resultados de análises em plasma são mais representativos da situação *in vivo*, quando comparados aos do soro, principalmente para fármacos com altas taxas de ligação às proteínas plasmáticas (albuminas e globulinas), as quais podem ser aprisionadas nos coágulos sanguíneos. Por outro lado, o plasma apresenta algumas desvantagens, como a interferência causada pelos anticoagulantes durante a análise por CLAE-EM/EM com IES e a maior formação de coágulos durante o

armazenamento sob-refrigeração ou congelamento em decorrência dos níveis de fibrinogênio e de alguns fatores da coagulação livres (ANDRIOLO *et al.*, 2010; BAIN, 2006; LEWIS; TATSUMI, 2006; SHARGEL; WU-PONG; YU, 2005; SOUZA; ELIAS, 2006; YOUNG; BERMES; HAVERSTICK, 2008).

Existem diversos tipos de tubos e bolsas para a coleta de sangue venoso. Eles diferem entre si pelo tipo de aditivo presente, volume e forma do aditivo (seco ou em solução). É de suma importância que os tubos ou bolsas sejam completamente preenchidos, pois muitos aditivos são colocados no tubo com base no volume nominal, de modo que a coleta de um volume inferior pode ser prejudicial à função do aditivo e à análise, devido à maior concentração. Para obtenção do plasma durante um estudo de biodisponibilidade, bioequivalência ou farmacocinética são coletados de 5 a 10 mL de sangue venoso por venopuntura a cada tempo de coleta com uma seringa hipodérmica em tubos com anticoagulante. O volume coletado depende da sensibilidade do ensaio e do número total de amostras coletadas durante o estudo completo. Existe uma variedade de anticoagulantes comerciais disponíveis, tais como heparina, EDTA, fluoreto, citrato e oxalato de sódio e, em caso de coleta em bolsas, CPDA e CPD/SAG-M. Esses anticoagulantes inibem a coagulação por meio de diferentes mecanismos, o que leva a intensidades de inibição distintas para cada anticoagulante. As concentrações dos anticoagulantes em relação ao volume de sangue devem estar dentro do intervalo de: 12 a 30 UI/mL para heparina sódica ou lítica; 1,2 a 2,0 mg/mL para EDTA dissódico (Na_2), dipotássico (K_2) ou tripotássico (K_3) anidro; e na proporção 1:6 (v/v) \pm 10% (CPDA:sangue) para CPDA (ANDRIOLO *et al.*, 2010; BAIN, 2006; CHUANG *et al.*, 1998; DEVANSHU *et al.*, 2010; ISO, 2002; LEWIS; TATSUMI, 2006; LI; ZHANG; TSE, 2011; SADAGOPAN *et al.*, 2003; SENNBRO *et al.*, 2011b; YOUNG; BERMES; HAVERSTICK, 2008).

A heparina é um polissacarídeo sulfatado disponível como sais de sódio, lítio, potássio e amônio, todos os quais evitam adequadamente a coagulação através da interação com a antitrombina. Essa interação aumenta em mais de 1000 vezes a atividade intrínseca dessa enzima, inativando a trombina e vários fatores da coagulação, tais como os fatores II, VII, IX, X, XI, e impedindo a conversão do fibrinogênio em fibrina. A heparina não altera o tamanho das células vermelhas,

minimizando a ocorrência de hemólise e não sofre fortemente os impactos de erros de diluição no caso de coleta inferior ao volume nominal do tubo (BAIN, 2006; FREITAS *et al.*, 2008; GONZALEZ-COVARRUBIAS *et al.*, 2013; HANDIN; LUX; STOSSEL, 2003; LEWIS; TATSUMI, 2006; LI; ZHANG; TSE, 2011; SADAGOPAN *et al.*, 2003; SENNBRO *et al.*, 2011a; SOUZA; ELIAS, 2006; YOUNG; BERMES; HAVERSTICK, 2008).

O EDTA atua como um agente quelante, ligando-se a cátions bivalentes como Ca^{2+} e o Mg^{2+} . Como várias enzimas envolvidas na cascata da coagulação dependem do cálcio livre como cofator, sua retirada por complexação com o EDTA impede a coagulação sanguínea em múltiplas etapas. Os sais de EDTA Na_2 , K_2 e K_3 são eficazes, sendo que os dois últimos são mais solúveis. Quando na concentração correta, apenas o EDTA K_3 produz contração das hemácias, favorecendo a hemólise. Entretanto, na coleta de volume inferior ao rotulado, levando à obtenção concentração de EDTA superior aos limites preconizados, qualquer sal de EDTA provoca a retração celular. Por ser um anticoagulante mais efetivo que a heparina, as amostras de plasma obtidas a partir do sangue coletado com EDTA apresentam menor índice de formação de coágulos durante o armazenamento. Esses coágulos devem ser retirados antes do início da análise, para evitar entupimento total ou parcial das ponteiros utilizadas na retirada de alíquotas de plasma, e consequente perda da precisão e exatidão dos resultados (BAIN, 2006; FREITAS *et al.*, 2008; GONZALEZ-COVARRUBIAS *et al.*, 2013; HANDIN; LUX; STOSSEL, 2003; LEWIS; TATSUMI, 2006; LI; ZHANG; TSE, 2011; SADAGOPAN *et al.*, 2003; SENNBRO *et al.*, 2011a; YOUNG; BERMES; HAVERSTICK, 2008).

A solução de CPDA consiste em uma mistura de agentes anticoagulantes e conservadores das características dos componentes celulares do sangue e do plasma, como manutenção do pH durante o armazenamento. O citrato possui o mesmo mecanismo de ação que o EDTA sendo, porém, menos efetivo. O fosfato de sódio atua tanto na manutenção do pH do plasma, quanto como anticoagulante, devido à formação de sais com o cálcio (BAIN, 2006; FREITAS *et al.*, 2008; GONZALEZ-COVARRUBIAS *et al.*, 2013; HANDIN; LUX; STOSSEL, 2003; LEWIS; TATSUMI, 2006; SENNBRO *et al.*, 2011a; YOUNG; BERMES; HAVERSTICK, 2008).

Além das possíveis influências dos anticoagulantes (variação do tipo, contra-íon (tipo ou número) ou concentração), muitos erros que ocorrem nas etapas iniciais da coleta do sangue, separação e armazenamento do plasma podem afetar os resultados analíticos e favorecer a ocorrência de efeito matriz. A padronização da coleta, transporte e processamento do sangue é fundamental para minimizar a variabilidade entre as amostras de um mesmo voluntário e de voluntários diferentes. Além da ocorrência de hemólise, outras variáveis no procedimento de coleta podem impactar seriamente o estudo analítico, favorecendo a ocorrência de efeito matriz (GONZALEZ-COVARRUBIAS *et al.*, 2013; MEI *et al.*, 2003; SENNBRO *et al.*, 2011a; SØRENSEN, 2011; YOUNG; BERMES; HAVERSTICK, 2008).

A oclusão venosa com o uso de torniquete para a coleta do sangue reduz o fluxo sanguíneo (estase venosa) provocando mudanças na composição do sangue, como a absorção de água e pequenas moléculas para o interior das células e consequente concentração dos materiais não dissolvidos no sangue, como sais, lipídeos, proteínas e substâncias ligadas às proteínas. Esse aumento, observado em um índice de até 15% na estase prolongada, torna a amostra menos representativa da real concentração plasmática do fármaco no organismo e mais susceptível à ocorrência de efeito matriz, já que os interferentes estão mais concentrados. Outros fatores que podem intensificar o efeito matriz são o bombeamento do punho durante a coleta, devido ao aumento nas concentrações de potássio, fosfato e lactato plasmático, e a coleta do sangue com o voluntário sentado, o que provoca aumento nas concentrações de proteínas, cálcio, hemoglobina livre, renina, catecolaminas, fosfatase alcalina, colesterol e ferro. Entretanto, deve sempre ser considerado, que mesmo uma amostra coletada com diferentes anticoagulantes, contendo altas concentrações de interferentes, lipemia ou hemólise acentuada pode não ser fonte de efeito matriz, dependendo das propriedades físico-químicas do analito e das condições de preparo de amostra, separação cromatográfica e ionização (GONZALEZ-COVARRUBIAS *et al.*, 2013; MEI *et al.*, 2003; SENNBRO *et al.*, 2011a; SØRENSEN, 2011; YOUNG; BERMES; HAVERSTICK, 2008).

2.2 Enxaqueca

A enxaqueca é uma desordem neurovascular crônica, recorrente e complexa que, geralmente tem início na infância, adolescência ou início da vida adulta. Essa doença, que afeta de 10% a 20% da população mundial, é uma fonte significativa de custos médicos e indiretos, como a redução da produtividade profissional durante uma crise. A frequência de ocorrência de enxaqueca é cerca de três vezes maior em mulheres do que nos homens (BARTLESON; CUTRER, 2010; CHEN *et al.*, 2006; INTERNATIONAL HEADACHE SOCIETY, 2004; MICHAEL *et al.*, 2012; SANDERS-BUSH; HAZELWOOD, 2012; SHESHALA; KHAN; DARWIS, 2012; PATEL *et al.*, 2012; TROY, 2005).

A enxaqueca é caracterizada por dor de cabeça latejante ou pulsante, moderada a grave e, em geral, unilateral, com duração variável de horas a dias e seguida por intervalos livres de dor prolongada. A frequência das crises de enxaqueca geralmente varia de 1 a 2 por ano a 1 a 4 por mês. Outros sintomas normalmente presentes na enxaqueca são náusea, vômito, fotofobia, hiperacusia, falta de apetite, poliúria, diarreia, visão turva, congestão nasal, palidez, sudorese, inchaço ou sensibilidade no couro cabeludo, rigidez na nuca e aura. A intensidade da dor geralmente aumenta gradualmente, sendo agravada por esforços físicos, luz, som e odores, e reduzida em estados de repouso e sono. Embora a cefaleia unilateral seja prevalente, em mais de 40% dos casos de enxaqueca há dor de cabeça bilateral e irradiada para o pescoço, principalmente nos casos sem aura (AMINOFF; SIMON; GREENBERG, 2009; CHEN *et al.*, 2006; INTERNATIONAL HEADACHE SOCIETY, 2004; MICHAEL *et al.*, 2012; SANDERS-BUSH; HAZELWOOD, 2012; SHESHALA; KHAN; DARWIS, 2012; PATEL *et al.*, 2012; TROY, 2005).

A aura é um fenômeno neurológico transitório de origem cerebral ou tronco cerebral que ocorre antes ou durante a dor de cabeça, com duração de até 60 minutos, atingindo de 15 a 30% dos pacientes. Os sintomas da aura podem ser visuais, sensoriais ou motores, sendo os visuais mais frequentes, ocorrendo em até 99% dos casos de aura. Em mais de 50% dos casos não há efeitos sensoriais ou motores. Os sintomas visuais são expressos como escotomas cintilantes: áreas de alteração no

campo de visão que piscam, começando perto do centro de visão e, em seguida, espalhando para as laterais como linhas em ziguezague pretas e brancas ou, em alguns casos, coloridas. Pode ocorrer também a indefinição ou perda de parte do campo de visão (hemianopsia). A aura sensorial é o segundo tipo mais comum, ocorrendo em 30% a 40% dos casos. É expressa como uma sensação de formigamento com pontadas que se inicia em um lado da mão e do braço e se espalha para a região do nariz e boca, progredindo para uma fase de dormência. Distúrbios da fala, vertigem e problemas motores são sintomas menos comuns (AMINOFF; SIMON; GREENBERG, 2009; INTERNATIONAL HEADACHE SOCIETY, 2004; OLESEN; WELCH; TFELT-HANSEN, 2006; TROY, 2005).

Existem quatro estágios de desenvolvimento da crise de enxaqueca possíveis de ocorrer, mas não obrigatoriamente presentes em todas as crises (INTERNATIONAL HEADACHE SOCIETY, 2004). O primeiro estágio, denominado pródromo ou estágio prévio, ocorre em aproximadamente 60% dos casos de enxaqueca precedendo a cefaleia ou a aura em horas ou dias por meio de sintomas tais como, alterações de humor (irritação, depressão ou euforia), fadiga, desejo por certos alimentos, rigidez muscular (especialmente no pescoço), constipação ou diarreia e sensibilidade a odores e sons (AMINOFF; SIMON; GREENBERG, 2009; BECKER, 2012; BUZZI *et al.*, 2005; LYNN; NEWTON; RAE-GRANT, 2004; ROSSI; AMBROSINI; BUZZI, 2005; SAMUELS; ALLAN, 2009). O estágio de aura precede a cefaleia característica da enxaqueca, exceto nos casos de enxaqueca silenciosa, em que não ocorre dor (OLESEN; WELCH; TFELT-HANSEN, 2006). Após o estágio de aura ocorre o estágio de cefaleia, em que os sintomas mais característicos da enxaqueca, como dor de cabeça latejante unilateral, são expressos (INTERNATIONAL HEADACHE SOCIETY, 2004). O quarto e último estágio de uma crise (pós-dromo) consiste em um conjunto de sintomas persistentes por dias após o fim da dor de cabeça principal, tais como sensação dolorida na região da cefaleia durante a crise, dificuldades cognitivas, redução de raciocínio, cansaço, fraqueza, sensação de ressaca, desconforto gastrintestinal e alterações de humor, variando de bem estar e euforia a depressão e mal estar (KELMAN, 2006; TROY, 2005).

As causas da enxaqueca ainda não estão consolidadas, havendo apenas hipóteses, sendo algumas sólidas e outras pouco embasadas. Entretanto, acredita-se que a

ocorrência de enxaqueca está relacionada a uma combinação entre fatores genéticos e ambientais. Os fatores estão presentes em cerca de dois terços dos casos de enxaqueca, principalmente nas enxaquecas com aura. Diversos outros fatores podem agir como gatilhos desencadeadores das crises. Os fatores mais impactantes são os fisiológicos, como estresse, fome, fadiga, influências hormonais (período menstrual, menarca, uso de contraceptivos orais, gravidez, perimenopausa e menopausa), seguidos pelos psicológicos (depressão, ansiedade e transtorno bipolar), alimentares e ambientais (qualidade do ar e iluminação) (AMINOFF; SIMON; GREENBERG, 2009; BARTLESON; CUTRER, 2010; FRIEDMAN; DE VER DYE, 2009; OLESEN; WELCH; TFELT-HANSEN, 2006; TROY, 2005).

O mecanismo biológico completo da cefaleia que ocorre durante uma crise de enxaqueca ainda não está completamente estabelecido, embora haja várias teorias já consolidadas abordando alguns mecanismos (JHEE *et al.*, 2001; OLESEN *et al.*, 2009). As hipóteses existentes consideram a influência de potenciais mudanças na circulação cefálica e vascular, a inflamação cerebral localizada e o papel da serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) e seus receptores (BARTLESON; CUTRER, 2010; HABERER *et al.*, 2010; JHEE *et al.*, 2001; SANDERS-BUSH; HAZELWOOD, 2012; OLESEN; WELCH; TFELT-HANSEN, 2006).

Na proposta prevalente para a etiologia da enxaqueca, os pontos chave são os vasos sanguíneos extracerebrais e intracranianos que nutrem, dentre outros tecidos, as meninges. Durante uma crise de enxaqueca, esses vasos dilatam e o aumento do fluxo sanguíneo expande intensamente os vasos de menor calibre das meninges. Esta dilatação vascular ativa os receptores nociceptivos dos nervos sensoriais perivasculares originando a dor pulsante. Além disso, a dilatação dos vasos sanguíneos das meninges desencadeia a liberação de peptídeos vasoativos, que promovem a sensibilização das fibras sensoriais trigeminais, induzindo a resposta inflamatória neurogênica. Com isso, estímulos antes inócuos, como as pulsações dos vasos sanguíneos e as alterações da pressão intracraniana, são percebidos como dolorosos, intensificando a cefaleia e outros sintomas da enxaqueca, como náuseas, vômitos e fotofobia (DULÉRY *et al.*, 1997; JHEE *et al.*, 2001; MCLOUGHLIN *et al.*, 1996; OLESEN *et al.*, 2009; TROY, 2005).

Há diversas evidências firmando o papel da 5-HT como mediador chave da enxaqueca. Dentre elas, as mais significativas são: a variação das concentrações da 5-HT no plasma e nas plaquetas durante as fases da crise de enxaqueca; a elevação das concentrações urinárias da 5-HT e de seus metabólitos durante a maior parte das crises; e o desencadeamento da enxaqueca por fármacos, como reserpina e fenfluramina, que liberam esse mediador nos sítios de armazenamento intracelulares (DULÉRY *et al.*, 1997; SANDERS-BUSH; HAZELWOOD, 2012).

A 5-HT é um neurotransmissor do sistema nervoso central (SNC), um regulador do músculo liso no sistema cardiovascular e no trato gastrointestinal e um ativador da agregação plaquetária, influenciando o controle sobre temperatura corporal, contração muscular, humor, ritmo circadiano, sono, apetite, memória, regulação hormonal e função sexual. Essa multiplicidade de funções dificulta a definição de um mecanismo preciso para a etiologia da enxaqueca e mesmo sendo conhecida a participação da 5-HT em processos fisiológicos, os sítios e modos de ação ainda não estão completamente estabelecidos. A 5-HT é rapidamente metabolizada e é encontrada em altas concentrações nas células enterocromafins ao longo do trato gastrointestinal, em grânulos de armazenagem das plaquetas e em todo o SNC. Várias classes e subclasses de receptores da 5-HT tem sido identificados, totalizando quatorze subtipos. De todos os receptores já identificados, dois, em particular, estão envolvidos na etiologia da enxaqueca: o 5-HT_{1B} e o 5-HT_{1D}. Esses receptores, que atuam como autorreceptores em terminações axônicas inibindo a liberação de 5-HT e favorecendo a vasoconstrição, são o foco de diversas pesquisas sobre enxaqueca e de vários fármacos seletivos. O desenvolvimento de fármacos que agem seletivamente em um ou mais subtipos dos receptores 5-HT vem crescendo progressivamente, aumentando a eficácia terapêutica e minimizando os efeitos adversos no tratamento da enxaqueca (DULÉRY *et al.*, 1997; JHEE *et al.*, 2001; MCLOUGHLIN *et al.*, 1996; SANDERS-BUSH; HAZELWOOD, 2012).

2.3 Tratamento e profilaxia de crises de enxaqueca

A fisiopatologia ainda não consolidada e a variabilidade das respostas inter e intrapacientes tornam a terapia da enxaqueca bastante complexa e desafiadora. Em

geral, o tratamento envolve o controle sintomático agudo durante uma crise e a prevenção por retirada dos gatilhos e por uso de medicamentos (BARTLESON; CUTRER, 2010; SANDERS-BUSH; HAZELWOOD, 2012).

Com o amplo desenvolvimento farmacológico para tratamento e prevenção da enxaqueca, há diversas opções de fármacos em formulações simples ou em associações em dose-fixa disponíveis. Para determinação da melhor opção terapêutica, é necessária ampla avaliação de cada paciente, considerando fatores como tolerabilidade, recorrência da cefaleia, relação da dor com o ciclo menstrual, tempo para início do alívio, dentre outros (JHEE *et al.*, 2001).

O tratamento profilático é recomendado para pacientes que sofrem com 2 a 3 crises por mês, visando reduzir a incidência e a gravidade das crises. Em geral, os medicamentos são administrados diariamente e incluem anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), bloqueadores de canais de cálcio, ergotamina, diidroergotamina, metisergina, bloqueadores β -adrenérgicos, inibidores da monoaminoxidase (IMAO), ácido valpróico e antidepressivos tricíclicos. Entretanto, pacientes utilizando medicamentos profiláticos podem, ainda, apresentar crises de enxaqueca (SRINVASU *et al.*, 2000; TROY, 2005).

No tratamento das crises de enxaqueca são utilizados um ou mais fármacos para alívio dos sintomas, especialmente cefaleia e náuseas. A eficácia dos medicamentos anti-enxaqueca varia de acordo com a ausência ou presença de aura, extensão e intensidade da dor, fatores ambientais e genéticos e duração da crise. Todos os medicamentos são mais eficazes se administrados no início da crise, enquanto a dor ainda é leve (1 a 2 horas após o início) e antes da sensibilização central completa ou dor moderada a grave, aumentando a probabilidade de alívio prolongado da dor, sem a necessidade de medicação extra (BARTLESON; CUTRER, 2010; BERGES *et al.*, 2010; SANDERS-BUSH; HAZELWOOD, 2012; TROY, 2005).

O perfil farmacocinético dos medicamentos anti-enxaqueca deve ser considerado na busca pelo tratamento ideal, já que um medicamento eficaz para enxaqueca deve ser rapidamente absorvido, capaz de penetrar no SNC e ter início de ação imediato e prolongado para evitar a reincidência da cefaleia. A biodisponibilidade tem um

impacto significativo na farmacodinâmica de um fármaco, uma vez que boas taxas de absorção, distribuição, metabolização e eliminação, estão relacionadas a melhores resultados clínicos, com menos efeitos adversos e alívio mais rápido e prolongado da dor. A rápida disponibilização dos fármacos utilizados no tratamento das crises de enxaqueca nos seus sítios de ação é um fator crucial na prevenção ou redução da sensibilização das vias centrais da dor (JHEE *et al.*, 2001; WALLS *et al.*, 2004). Um fator agravante é a gastroparesia ou redução da absorção gastrointestinal de fármacos durante a crise, além de náuseas e vômitos, frequentemente associados a um episódio, atrasando ou diminuindo a absorção dos fármacos (DUQUESNOY *et al.*, 1998; JHEE *et al.*, 2001; WALLS *et al.*, 2004).

A reincidência da cefaleia consiste na repetição ou agravamento da dor após um período de alívio induzido por terapia e deve ser considerada na escolha do melhor tratamento. A recorrência não necessariamente indica ineficácia do medicamento, podendo ser resultado de um efeito terapêutico com duração inferior à da fase de cefaleia ou de efeitos adversos em decorrência do uso excessivo de medicamentos. Por isso, tanto na profilaxia quanto no tratamento agudo, o uso frequente ou abusivo de triptanos, ergotaminas e analgésicos pode levar a cefaleias mais graves e mais frequentes (INTERNATIONAL HEADACHE SOCIETY, 2004; JHEE *et al.*, 2001).

O tratamento inicial de pacientes com sintomas leves a moderados de uma crise de enxaqueca, geralmente consiste, além da retirada dos gatilhos, na utilização de AINEs, como naproxeno (NAP), ibuprofeno ou paracetamol, e antieméticos, como metoclopramida. Quando a terapia primária não é satisfatória, outros agentes, mais específicos para enxaqueca, tais como triptanos e ergotaminas, ou associações medicamentosas são usados. Entretanto, uma das consequências negativas do uso de associações é o risco de interações medicamentosas (TROY, 2005).

Antes da introdução dos agonistas 5-HT_{1B/1D} seletivos, os alcalóides do esporão-do-centeio (ergot) foram amplamente utilizados no tratamento agudo da enxaqueca, mesmo sem um mecanismo de ação exato estabelecido, já que os múltiplos efeitos farmacológicos desses agentes dificultam a compreensão da farmacodinâmica envolvida (SANDERS-BUSH; HAZELWOOD, 2012). Entretanto, a baixa seletividade dos alcalóides do esporão-do-centeio, os quais interagem não somente com os

receptores da 5-HT, mas também com receptores de dopamina e catecolamina, fez com que os triptanos conquistassem a preferência no tratamento da enxaqueca. Outros fatores colaboradores para a redução da utilização dos alcalóides do esporão-do-centeio são a absorção gastrintestinal errática, que contribui para grande variação na resposta do paciente, e os efeitos adversos frequentes, por vezes, graves e prolongados. Os principais efeitos adversos são náuseas, vômitos, fraqueza nas pernas, dores musculares, dentre outros semelhantes aos observados com triptanos (JHEE *et al.*, 2001; SANDERS-BUSH; HAZELWOOD, 2012).

Novos tratamentos para a prevenção da enxaqueca, como a toxina botulínica e novos antiepilépticos, tem mecanismos de ação únicos, provavelmente não relacionados a 5-HT. A metoclopramida intravenosa é amplamente utilizada em urgências hospitalares para alívio das náuseas. Lidocaína intranasal e dexametasona são outras opções para o tratamento dos sintomas associados às crises de enxaqueca, sendo que a administração de dexametasona intravenosa em associação ao tratamento padrão reduz a recorrência de cefaleia (COLMAN; FRIEDMAN; BROWN, 2008; SANDERS-BUSH; HAZELWOOD, 2012).

2.3.1 Triptanos

Os triptanos são um grupo de fármacos que tem como base molecular a triptamina e que possuem a farmacologia baseada no agonismo seletivo dos receptores de 5-HT_{1B/1D}, por apresentarem interação potente com esses receptores e fraca ou ausente com outros subtipos de 5-HT, ou com receptores α_1/α_2 -adrenérgicos, β -adrenérgicos, dopaminérgicos, colinérgicos muscarínicos e benzodiazepínicos. São utilizados no tratamento de primeira escolha da enxaqueca com cefaleia moderada a grave, com ou sem aura, ou para pacientes com sintomas leves que não respondem aos analgésicos simples, sendo eficazes para dor e náusea em mais de 75% dos casos. Entretanto, os triptanos não são indicados para o tratamento profilático da enxaqueca (BARTLESON; CUTRER, 2010; FERRARI *et al.*, 2008; JHEE *et al.*, 2001; SANDERS-BUSH; HAZELWOOD, 2012; PATEL *et al.*, 2012).

Objetivando desenvolver vasoconstritores seletivos da circulação extracraniana, a introdução dos triptanos na década de 1990 revolucionou o tratamento da

enxaqueca, trazendo melhor tolerância e maior e mais duradouro alívio para dor e náusea, em contrapartida aos efeitos adversos intensos observados com os alcalóides do esporão-do-centeio (CHEN *et al.*, 2006; FERRARI *et al.*, 2008; SANDERS-BUSH; HAZELWOOD, 2012). Sumatriptano (SUM), o primeiro dessa classe, tornou-se disponível para uso clínico nos Estados Unidos em 1992 e, desde então, vários outros triptanos foram aprovados. A segunda geração de triptanos tem maior biodisponibilidade oral. Os compostos disponíveis incluem SUM, naratriptano, rizatriptano, zolmitriptano, almotriptano, eletriptano e frovatriptano, sendo que o SUM também é comercializado em associações em dose-fixa com NAP (FERRARI *et al.*, 2008; JHEE *et al.*, 2001; MCLOUGHLIN *et al.*, 1996; SANDERS-BUSH; HAZELWOOD, 2012).

Considerando a hipótese consolidada de que a 5-HT é um mediador chave na patogênese da enxaqueca, e de que os receptores vasculares da 5-HT do tipo 1B, expressos nas células do músculo liso dos vasos sanguíneos intracranianos, e 1D, expressos nas fibras sensoriais do nervo trigêmeo, desempenham um papel importante na mediação da vasoconstrição, os triptanos tornaram-se a base para o tratamento agudo das crises de enxaqueca (BOULTON; DUNCAN; VACHHARAJANI, 2003; CHEN *et al.*, 2006; HABERER *et al.*, 2010; JHEE *et al.*, 2001; SANDERS-BUSH; HAZELWOOD, 2012; PATEL *et al.*, 2012; TROY, 2005).

O mecanismo de ação dos agonistas dos receptores 5-HT_{1B/1D} tem sido exhaustivamente estudado, levando a algumas hipóteses. A teoria mais relevante considera que os triptanos agem como vasoconstritores dos vasos sanguíneos intracranianos dilatados durante uma crise de enxaqueca, incluindo as anastomoses arteriovenosas, promovendo o alívio da dor. Outra hipótese relevante baseia-se na observação de que ambos os receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} atuam como autorreceptores pré-sinápticos, modulando a liberação de neurotransmissores das terminações neuronais. Os triptanos podem bloquear a liberação de neuropeptídeos pró-inflamatórios no nível da terminação nervosa, no espaço perivascular, reduzindo a transmissão dos impulsos para o núcleo caudal do trigêmeo, e consequentemente a dor (CHEN *et al.*, 2006; GE *et al.*, 2004; HABERER *et al.*, 2010; SANDERS-BUSH; HAZELWOOD, 2012; PATEL *et al.*, 2012).

A escolha do triptano adequado para tratamento de crises de enxaqueca em um determinado paciente deve considerar não apenas a eficácia, mas também início da ação, recorrência da cefaleia, tolerância e via de administração. O tratamento deve iniciar o mais rápido possível após o início da crise de enxaqueca. As formas farmacêuticas orais dos triptanos são as mais convenientes para uso, mas podem não ser práticas em pacientes com náuseas e vômitos associados à enxaqueca. Nenhum dos triptanos pode ser utilizado concomitantemente, em um intervalo de 24 horas, com um alcalóide do esporão-do-centeio ou com outro triptano, e o uso excessivo pode levar a cefaleias. Triptanos administrados por via oral podem causar parestesias, astenia e fadiga, rubor, sensação de pressão, aperto ou dor no peito, pescoço e mandíbula, sonolência, tonturas, náuseas e sudorese (BARTLESON; CUTRER, 2010; JHEE *et al.*, 2001; SANDERS-BUSH; HAZELWOOD, 2012).

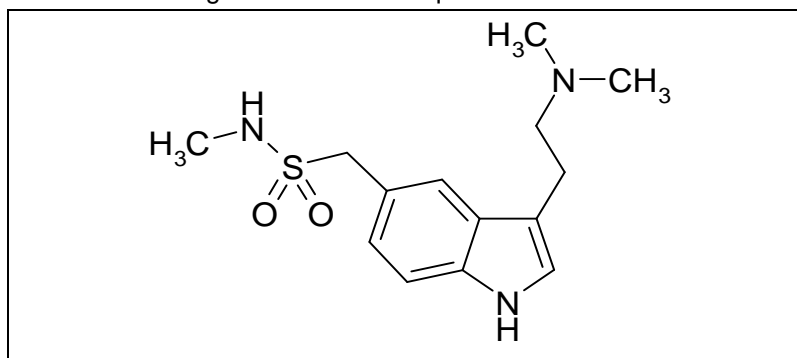
A elevada taxa inicial de absorção e os altos níveis plasmáticos atingidos até 2 horas após a administração parecem ser o foco da eficácia terapêutica dos triptanos, uma vez que impactam sobre a farmacodinâmica e a neurobiologia das crises de enxaqueca. Se o fármaco chega rapidamente e em concentrações suficientes aos seus sítios de ação específicos, a sensibilização central e, portanto, toda a sintomatologia típica das crises de enxaqueca é evitada. Os perfis farmacocinéticos distintos dos triptanos oferecem ajustes no tratamento de acordo com o perfil do paciente (FERRARI *et al.*, 2008; JHEE *et al.*, 2001; TFELT-HANSEN, 2007).

2.3.1.1 Succinato de sumatriptano

Succinato de sumatriptano (succinato de 3-[2-(dimetilamino)etil]-N-metil-1H-indol-5-metanossulfonamida) foi o primeiro fármaco aprovado especificamente desenvolvido para o tratamento de crises de enxaqueca. Estruturalmente semelhante ao neurotransmissor 5-HT, SUM (Figura 1) se liga seletivamente aos receptores 5-HT_{1B/1D}, promovendo a constrição dos vasos sanguíneos cranianos dilatados durante a cefaleia da enxaqueca, aliviando a dor. Essa propriedade faz com que SUM seja altamente eficaz para o tratamento agudo da enxaqueca e definido como fármaco de escolha primária no tratamento da enxaqueca moderada a grave (BARBANTI; LE PERA; CRUCCU, 2007; BOULTON; DUNCAN; VACHHARAJANI, 2003; CHENG *et al.*, 1998; DUNNE; ANDREW, 1996; DUQUESNOY *et al.*, 1998; GE *et al.*, 2004;

JHEE *et al.*, 2001; SHESHALA; KHAN; DARWIS, 2012; SRINVASU *et al.*, 2000; XU; BARTLETT; STEWART, 2001).

Figura 1 – Estrutura química de SUM.



SUM é comercialmente disponível em formulações orais, subcutâneas e intranasais. A dose oral recomendada é de 25 a 100 mg, podendo ser repetida após 2 horas, até uma dose total de 200 mg/dia. Após tratamento com SUM, o funcionamento cognitivo normal é atingido de 0,5 a 2,25 horas após a administração e a recorrência da cefaleia ocorre em 25 a 40% dos pacientes, em geral, 15 horas após a primeira dose (BERGES *et al.*, 2010; BRASIL, 2013a; EDWARDS *et al.*, 2012; JHEE *et al.*, 2001; SANDERS-BUSH; HAZELWOOD, 2012; SHESHALA; KHAN; DARWIS, 2012; SRINVASU *et al.*, 2000; XU; BARTLETT; STEWART, 2001).

Succinato de SUM é um pó branco a esbranquiçado, facilmente solúvel em água, solução salina e clorofórmio, levemente solúvel em metanol e praticamente insolúvel em hidrocarbonetos. De acordo com a literatura consultada, possui dois valores de pKa: pKa₁ de 9,63 e pKa₂ maior que 12 e log P_{octanol/água} de 0,65 (SHESHALA; KHAN; DARWIS, 2012; TROY, 2005).

SUM é extensivamente metabolizado no fígado pelo metabolismo de fase I via monoaminoxidase do tipo A, dando origem a um análogo do ácido indolacético, farmacologicamente inativo, além de outros metabólitos minoritários. SUM e seus metabólitos são conjugados pelo metabolismo de fase II a ácido e éster glicurônico. Embora esse fármaco seja uma conquista significativa no tratamento da enxaqueca, após administração oral, apenas 14% alcança a circulação sistêmica devido ao metabolismo de primeira passagem pelo fígado e à absorção incompleta. É

rapidamente absorvido após administração oral e é distribuído principalmente nos tecidos, não atravessando a barreira hemato-encefálica, provavelmente devido à baixa lipofilicidade, mas ligando à melanina, podendo acumular em órgãos ricos nesse pigmento, como o olho. No entanto, nenhuma reação adversa dessa propriedade tem sido observada em seres humanos. Além disso, SUM é recuperado intacto no leite materno em baixas concentrações. O volume de distribuição de SUM é de 2,4 L/Kg (CHENG *et al.*, 1998; JHEE *et al.*, 2001; SANDERS-BUSH; HAZELWOOD, 2012; SRINVASU *et al.*, 2000; TFELT-HANSEN, 2007; TROY, 2005).

A farmacocinética de SUM é linear após administração oral de até 400 mg, com exceção da taxa de absorção, que possui um aumento dose-dependente com o tempo. O perfil farmacocinético não é significativamente afetado por crise de enxaqueca, idade ou gênero. A alimentação não tem efeito sobre a biodisponibilidade, mas retarda o $T_{m\acute{a}x}$ por 0,5 horas, sendo que em condições normais esse parâmetro é de 1 a 3 horas. Em níveis terapêuticos, cerca de 10 a 21% de SUM está ligado às proteínas plasmáticas. A $T_{1/2}$ é de 1 a 2 horas e a eliminação ocorre principalmente por rotas não renais, sendo a depuração renal de SUM e de seus metabólitos de apenas 20% da depuração total. No entanto, mesmo com uma taxa baixa, eles excedem a taxa de filtração glomerular, indicando secreção tubular renal ativa (JHEE *et al.*, 2001; SANDERS-BUSH; HAZELWOOD, 2012; SRINVASU *et al.*, 2000; TFELT-HANSEN, 2007).

Os valores farmacocinéticos obtidos após administração de 25 mg de SUM por via oral foram: $C_{m\acute{a}x}$ de 16,5 ng/mL obtida após 1,5 horas, $T_{1/2}$ de 1,7 horas e área sob a curva do tempo zero ao infinito (extrapolada) ($ASC_{0-\infty}$) de 8,7 ng_xh/mL (DUQUESNOY *et al.*, 1998). Já após administração de 100 mg de SUM por via oral, os valores farmacocinéticos obtidos foram: $C_{m\acute{a}x}$ de 43,10 ng/mL obtida após 1,6 horas, $T_{1/2}$ de 1,2 horas e $ASC_{0-\infty}$ de 171,87 ng_xh/mL (FERRARI *et al.*, 2008). Após administração oral de 300 mg de SUM, a $C_{m\acute{a}x}$ é de 112 ng/mL (TFELT-HANSEN, 2007).

Os efeitos adversos comuns causados por SUM incluem aperto ou pressão no peito, pescoço e/ou garganta, falta de ar, palpitações e ansiedade. SUM é fortemente contra indicado em pacientes com doença arterial coronária pré-existente e em pessoas com fatores de risco para essa doença, como hipertensão, hipercolesterolemia e diabetes. A incidência de interações medicamentosas entre SUM e outros fármacos é muito comum, uma vez que é amplo o uso simultâneo a outros medicamentos adicionais, como analgésicos, antidepressivos e sedativos. Entretanto, em geral, a tolerabilidade do SUM não é afetada pelo uso simultâneo de inibidores seletivos da recaptção da 5-HT, antidepressivos tricíclicos, contraceptivos orais, medicamentos cardiovasculares e respiratórios, NAP e alcalóides do esporão-do-centeio. Já foram descritas interações farmacocinéticas de SUM com propranolol, flunarizina, butorfanol, pizotifeno e etanol (JHEE *et al.*, 2001; SRINVASU *et al.*, 2000; Imigran[®]; TROY, 2005).

2.3.2 Anti-inflamatórios não esteroides

A grande maioria dos AINEs são ácidos orgânicos, geralmente com alta absorção por via oral, altamente ligados às proteínas plasmáticas e excretados tanto por filtração glomerular como por secreção tubular. São comumente utilizados como terapia de primeira linha no tratamento da enxaqueca leve a moderada e podem ser combinados com triptanos e antieméticos (GROSSER; SMYTH; FITZGERALD, 2012; HABERER *et al.*, 2010).

A resposta inflamatória é caracterizada mecanicamente por vasodilatação local transitória, aumento da permeabilidade capilar e infiltração de leucócitos e células fagocíticas. Nociceptores, terminais periféricos de fibras aferentes primárias que percebem a dor, podem ser ativados por vários estímulos, como calor, ácidos ou pressão. As prostaglandinas reduzem o limiar para estímulo dos nociceptores, provocando sensibilização periférica. Os AINEs inibem a síntese de prostaglandinas, reduzindo a sensibilização central decorrente da ativação de células gliais no tronco cerebral e, conseqüentemente a inflamação das meninges (GROSSER; SMYTH; FITZGERALD, 2012; HABERER *et al.*, 2010; TROY, 2005).

O principal mecanismo de ação dos AINEs consiste na inibição reversível e competitiva da atividade das prostaglandinas sintases, também conhecidas por ciclo-oxigenase (COX), impedindo a conversão do ácido aracdônico em prostaglandina. A COX possui pelo menos duas isoformas, a COX-1 e a COX-2. A COX-1 catalisa a biossíntese de prostaglandinas, que são importantes para a manutenção das funções fisiológicas, tais como a síntese da prostaciclina, que por sua vez é citoprotetora quando liberada pela mucosa gástrica ou anti-trombogênica quando liberada pelo endotélio vascular. A COX-2 produz prostaglandinas, que estão envolvidas em processos patofisiológicos, como inflamação, febre e dor. Desse modo, a inibição da COX-2 leva a grande parte das ações antipiréticas, analgésicas e anti-inflamatórias dos AINEs, ao passo que a inibição simultânea da COX-1 resulta em efeitos adversos indesejáveis sobre o trato gastrintestinal. A maioria dos AINEs tradicionais são inibidores não seletivos da COX, inibindo tanto a COX-1 quanto a COX-2 (ELSINGHORST *et al.*, 2011; GROSSER; SMYTH; FITZGERALD, 2012; TROY, 2005).

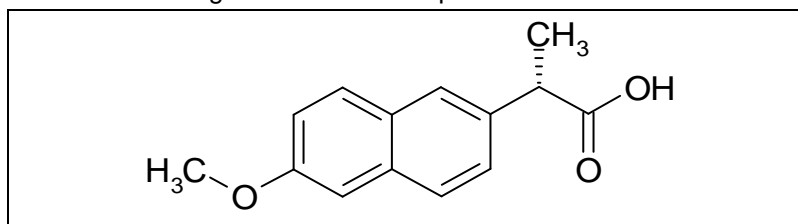
Os derivados do ácido propiônico, incluindo o NAP, são aprovados para utilização no tratamento de artrite reumatóide, osteoartrite, dor, espondilite ancilosante, artrite gotosa aguda, tendinite, bursite, enxaqueca e dismenorreia primária. Os principais representantes dessa classe de AINEs são ibuprofeno, NAP, flurbiprofeno, fenoprofeno e cetoprofeno. Os derivados do ácido propiônico são inibidores reversíveis não seletivos da COX, apresentando os efeitos terapêuticos e adversos comuns a outros AINEs (ELSINGHORST *et al.*, 2011; GROSSER; SMYTH; FITZGERALD, 2012; PALMA-AGUIRRE *et al.*, 2009; PATEL *et al.*, 2012).

2.3.2.1 Naproxeno sódico

Naproxeno (ácido 2-(6-metoxinaftalen-2-il)-propanóico) (Figura 2) é um AINE derivado do ácido propiônico que possui propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e antipiréticas, agindo sobre diversas síndromes de dor e inflamatórias. Na enxaqueca, é utilizado tanto no tratamento profilático, quanto no agudo, aliviando a dor por meio da propriedade analgésica, enquanto o efeito anti-inflamatório diminui a inflamação neurogênica nas fibras sensoriais trigeminais. NAP é administrado

exclusivamente como o enantiômero ativo, o de configuração S, formulado como ácido livre ou como sal de sódio correspondente (ELSINGHORST *et al.*, 2011; JHEE *et al.*, 2001; MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2004; PALMA-AGUIRRE *et al.*, 2009; PATEL *et al.*, 2012; SRINVASU *et al.*, 2000; VALITALO *et al.*, 2012; FLANAX[®]; TROY, 2005).

Figura 2 – Estrutura química de NAP.



NAP é comercializado como comprimidos simples ou revestidos de liberação imediata, comprimidos revestidos de liberação retardada ou controlada e cápsulas gelatinosas, contendo de 200 a 750 mg de NAP ou NAP sódico, e como suspensão oral. Além disso, está disponível em associações em dose-fixa com pseudoefedrina, paracetamol, esomeprazol e SUM (BRASIL, 2013a; GROSSER; SMYTH; FITZGERALD, 2012).

NAP sódico (sal sódico do ácido 2-(6-metoxinaftalen-2-il)-propanóico) é um pó branco cristalino de sabor amargo, praticamente insolúvel em água a pH 2, completamente solúvel em água a pH 8, solúvel em etanol, clorofórmio e éter nas proporções de 1/25, 1/15 e 1/40, respectivamente. De acordo com a literatura consultada, possui constante de dissociação (pKa) de 4,15 a 4,80 a 25 °C e coeficiente de Partição ($\log P_{\text{octanol/água}}$) de 3,18 a 3,62 (GILART *et al.*, 2012; MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2004; NOCHE *et al.*, 2011; TROY, 2005; YOON *et al.*, 2010).

A absorção de NAP sódico é mais rápida do que a da forma ácida apresentando níveis plasmáticos significantes e alívio da dor dentro de 0,5 horas após a administração e, por isso, é amplamente utilizado. NAP é completamente absorvido no trato gastrointestinal, sendo que alimentos retardam a taxa, mas não a extensão da absorção. A absorção é acelerada pela administração concomitante de

bicarbonato de sódio, mas retardada pelo óxido de magnésio ou pelo hidróxido de alumínio. NAP sódico atinge o líquido sinovial, cruza a barreira placentária e aparece no leite de mulheres lactantes em aproximadamente 1% da concentração plasmática materna (ELSINGHORST *et al.*, 2011; FLANAX[®]; GROSSER; SMYTH; FITZGERALD, 2012; PALMA-AGUIRRE *et al.*, 2009; PATEL *et al.*, 2012; VALITALO *et al.*, 2012; TROY, 2005).

NAP sódico é extensivamente metabolizado a 6-O-desmetilnaproxeno no fígado pelo metabolismo de fase I e, tanto NAP quanto 6-O-desmetilnaproxeno, são conjugados pelo metabolismo de fase II a ácido e sulfato glicurônico, dando origem a cinco possíveis conjugados. Desse modo, as vias metabólicas mais importantes são a glucuronidação direta e desmetilação de cerca de 30% do NAP pelo CYP1A2 e CYP2C9 (ELSINGHORST *et al.*, 2011; FLANAX[®]; GROSSER; SMYTH; FITZGERALD, 2012; PALMA-AGUIRRE *et al.*, 2009; PATEL *et al.*, 2012; VALITALO *et al.*, 2012; TROY, 2005).

A biodisponibilidade oral de NAP sódico é de aproximadamente 95%, o volume de distribuição de 0,16 L/Kg e a meia-vida de eliminação ($T_{1/2}$) varia de 12 a 21 horas, independente da forma química ou da formulação. Em níveis terapêuticos, mais de 99% de NAP sódico está ligado às proteínas plasmáticas, principalmente à albumina sérica. $C_{máx}$ são obtidas de 1 a 4 horas após administração oral e o estado estacionário é obtido após 2 a 4 dias. Aproximadamente 95% da dose ingerida é eliminada pela urina, principalmente como conjugados de NAP e do seu metabólito inativo 6-desmetilnaproxeno, e 3%, ou menos, pelas fezes. Além disso, a taxa de excreção de metabólitos quase coincide com a taxa de eliminação de NAP sódico do plasma (ELSINGHORST *et al.*, 2011; FLANAX[®]; GROSSER; SMYTH; FITZGERALD, 2012; PALMA-AGUIRRE *et al.*, 2009; PATEL *et al.*, 2012; VALITALO *et al.*, 2012; TROY, 2005).

Os valores obtidos para os parâmetros farmacocinéticos após administração de 220 mg de NAP sódico por via oral foram: $C_{máx}$ de 43700 ng/mL obtida após 1,1 horas, $T_{1/2}$ de 18,5 horas e $ASC_{0-\infty}$ de 626.000 ng_xh/mL (ELSINGHORST *et al.*, 2011). Já após administração de um comprimido em dose-fixa combinada de NAP

sódico 275 mg e paracetamol 300 mg, os valores farmacocinéticos obtidos para NAP foram: $C_{m\acute{a}x}$ de 60980 ng/mL em 1 hora, $T_{1/2}$ de 20,6 horas e $ASC_{0-\infty}$ de 1.098.550 ng_xh/mL (PALMA-AGUIRRE *et al.*, 2009).

Os efeitos adversos comuns causados por NAP incluem efeitos gastrointestinais, no SNC (sonolência, dor de cabeça, tontura, sudorese, fadiga, depressão e ototoxicidade), dermatológicos (prurido), dentre outros. Podem ocorrer interações medicamentosas entre NAP e outros fármacos que tenham alta taxa de ligação às proteínas plasmáticas, como anticoagulantes do tipo cumarínicos, sulfonamidas ou sulfoniluréias, outros AINEs e hidantoínas (FLANAX[®]; GROSSER; SMYTH; FITZGERALD, 2012).

2.3.3 Associação de succinato de sumatriptano e naproxeno sódico

SUM e NAP são fármacos amplamente utilizados no tratamento de crises de enxaqueca, tanto em formulações individuais quanto em associação em dose-fixa (ainda não disponível no Brasil). A base para uso terapêutico dessa associação está em dados clínicos que comprovam o aumento da eficácia no tratamento agudo da enxaqueca com o uso concomitante de um triptano e de um AINE, frente ao uso isolado de um dos dois fármacos. Com vários processos vasculares e inflamatórios envolvidos na fisiopatologia da enxaqueca, a utilização de associações medicamentosas multimecanísticas é uma abordagem ideal para o tratamento das crises. Triptanos e AINEs possuem ação sinérgica, tendo como alvos aspectos distintos dos processos vasculares e inflamatórios envolvidos na cefaleia da enxaqueca, prevenindo ou reduzindo tanto a ativação periférica das vias centrais da dor durante os estágios iniciais de uma crise de enxaqueca quanto à sensibilização central tardia. Como resultado, tem-se um alívio mais rápido e prolongado da dor, reduzindo a necessidade de medicação extra (BERGES *et al.*, 2010; HABERER *et al.*, 2010; MICHAEL *et al.*, 2012; PATEL *et al.*, 2012).

O uso da associação em dose-fixa combinada de SUM e NAP ou o uso simultâneo em formulações separadas permite a administração de uma segunda dose 24 horas após a dose inicial, mas proíbe a utilização de outros triptanos nas 24 horas que

seguem a primeira dose. Desse modo, a medicação extra deve incluir um segundo comprimido de SUM/NAP ou comprimidos de succinato de SUM ou de NAP sódico, sempre respeitando a dose máxima diária. Não há diferença no perfil de segurança e nos efeitos adversos de SUM/NAP frente ao obtido para SUM ou NAP administrados isoladamente. A associação em dose-fixa combinada Treximet[®] da GlaxoSmithKline, aprovada em 15 de abril de 2008 pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de crises de enxaqueca, contém 119 mg de succinato de SUM (equivalente a 85 mg de SUM base livre) e 500 mg de NAP sódico. Ainda não há genéricos disponíveis, pois a primeira patente só expira em 2017 (BERGES *et al.*, 2010; FDA, 2014; HABERER *et al.*, 2010; MICHAEL *et al.*, 2012; PATEL *et al.*, 2012).

O perfil farmacocinético único da associação SUM/NAP apoia a vantagem terapêutica obtida com o uso dessa formulação. As $C_{m\acute{a}x}$ de SUM são obtidas logo após a administração de SUM/NAP e o NAP oferece cobertura estendida por muito tempo após a redução das concentrações plasmáticas de SUM. Independente do tipo de formulação (dose-fixa combinada ou dois comprimidos), a base do perfil farmacocinético distinto de SUM/NAP em relação à administração isolada de NAP ou SUM, pode estar na contribuição de SUM para a absorção retardada de NAP, através da redução da motilidade gástrica e na possível interação das propriedades ácidas de NAP e básicas de SUM alterando a absorção, distribuição, metabolismo e excreção dos fármacos. Não há diferenças estatisticamente significativas entre os perfis farmacocinéticos de SUM e NAP na associação em dose-fixa combinada ou em comprimidos distintos. Além disso, não foram observados efeitos significativos na farmacocinética de SUM/NAP em administração simultânea a alimentos ou durante uma crise de enxaqueca (HABERER *et al.*, 2010; SRINVASU *et al.*, 2000).

Os valores farmacocinéticos obtidos após administração de 85 mg de SUM/500 mg de NAP sódico por via oral foram: $C_{m\acute{a}x}$ de 37,9 - 76,9 ng/mL obtida após 0,75 - 1,0 hora, $T_{1/2}$ de 2,24 - 2,46 horas, $ASC_{0-\infty}$ de 208 ng_xh/mL e constante de eliminação (K_{El}) de 0,327 h⁻¹, para SUM e $C_{m\acute{a}x}$ de 40,6 - 61,54 µg/mL obtida após 4,0 - 6,0 horas, $T_{1/2}$ de 14,0 - 16,7 horas, $ASC_{0-\infty}$ de 791.300 - 1.132.000 ng_xh/mL e K_{El} de 0,05 h⁻¹, para NAP (PATEL *et al.*, 2012; BERGES *et al.*, 2010).

2.4 Métodos bioanalíticos para quantificação de naproxeno sódico e succinato de sumatriptano em plasma humano

Vários métodos bioanalíticos para quantificação isolada de NAP ou SUM em plasma humano estão descritos na literatura, havendo uma enorme variedade de detetores utilizados, tais como espectrofotométricos (ultravioleta/visível), fluorimétricos, eletroquímicos e espectrômetros de massas. Em todos os métodos que utilizam a EM como técnica de detecção, NAP foi ionizado no modo negativo, com perda de um próton ($[M-H]^-$) e SUM no modo positivo, ganhando um próton ($[M+H]^+$), seja na IQPA ou na IES. Os procedimentos de extração também variam amplamente, sendo utilizadas técnicas convencionais de preparo de amostra: ELL; EPT e EFS. Shah *et al.* (2011), Khan *et al.* (2011), Ge *et al.* (2004) e Rhim *et al.* (2008) associaram ELL com EPT para NAP ou SUM e Duléry *et al.* (1997) associaram EPT com EFS para SUM. Em geral foram utilizadas colunas cromatográficas empacotadas com sílica ligada a grupos octadecilsilano (C_{18}), prevalecendo o uso de eluição isocrática.

Em contrapartida, métodos bioanalíticos para quantificação simultânea de NAP e SUM em plasma humano são escassos na literatura. Patel *et al.* (2012) descreveram os desafios para extração e detecção simultânea de NAP e SUM em plasma e não conseguiram bons resultados para ELL ou EPT, sendo necessário utilizar a EFS, uma técnica com custo elevado. Michael *et al.* (2012) associaram EPT com ELL para obtenção de um procedimento de extração simultânea de NAP e SUM eficaz. Entretanto, a detecção foi realizada no modo positivo para SUM e no modo negativo para NAP. Berges *et al.* (2010) e Haberer *et al.* (2010) utilizam dois procedimentos de extração, sendo SUM extraído por EFS e NAP por EPT. Embora a opção por extrações isoladas não tenha sido justificada no trabalho, tem-se a impressão de que os autores não conseguiram desenvolver uma técnica para extração simultânea dos dois fármacos, já que o método bioanalítico foi desenvolvido para quantificação simultânea de NAP e SUM em plasma humano.

Os solventes e soluções utilizados nos procedimentos descritos em diferentes referências da literatura para extração de NAP e/ou SUM de plasma estão relatados

na Tabela 1 e as condições dos métodos descritos para quantificação de NAP e/ou SUM por CLAE-EM ou CLAE-EM/EM na Tabela 2.

Tabela 1 – Solventes e soluções utilizados nos procedimentos descritos na literatura para extração de NAP e/ou SUM de plasma.

ELL				
Fármaco	Referências	Aditivos	Solventes para extração	Solventes para ressuspensão
NAP/SUM	MICHAEL <i>et al.</i> , 2012.	Hidróxido de sódio.	MTBE e diclorometano.	Solução orgânica resultante.
NAP	CHMIELEWSKA <i>et al.</i> , 2006; KHAN <i>et al.</i> , 2011; SHAH <i>et al.</i> , 2011; SLATTERY; LEVY, 1979; ZAGHLOUL <i>et al.</i> , 2003.	Ácidos ou solventes precipitantes.	Clorofórmio, acetato de etila, éter e diclorometano.	FM ou mistura de água com metanol ou acetonitrila.
SUM	BOULTON; DUNCAN; VACHHARAJANI, 2003; GE <i>et al.</i> , 2004; SHESHALA; KHAN; DARWIS, 2012; YADAV <i>et al.</i> , 2011.	Bases ou solventes precipitantes.	MTBE, diclorometano e acetato de etila.	FM ou metanol.
EPT				
Fármaco	Referências	Aditivos	Solventes precipitantes	
NAP/SUM	MICHAEL <i>et al.</i> , 2012.	-	Ácido tricloroacético a 60%.	
NAP	CHEN <i>et al.</i> , 2005; ELSINGHORST <i>et al.</i> , 2011; NASIR <i>et al.</i> , 2011; PALMA-AGUIRRE <i>et al.</i> , 2009; ZHANG <i>et al.</i> , 2009.	Ácidos.	Metanol, acetonitrila.	
SUM	RAO <i>et al.</i> , 2012.	-	Acetonitrila.	
EFS				
Fármaco	Referências	Cartuchos	Solventes para lavagem	Solventes para extração
NAP/SUM	PATEL <i>et al.</i> , 2012.	Fase-reversa (Strata-X).	Metanol, água e acetato de amônio.	FM.
NAP	DUNNE; ANDREW, 1996; FARRAR; LETZIGA; GILLBET, 2002; KHAN <i>et al.</i> , 2010; NOBILIS <i>et al.</i> , 2003.	Fase-reversa (Supelclean, Oasis HLB, Bond Elut).	Metanol, água e tampões com diversos valores de pH.	Metanol, diclorometano ou mistura de metanol e tampão fosfato pH 7,0.
SUM	CHENG <i>et al.</i> , 1998; DULÉRY <i>et al.</i> , 1997; MCLOUGHLIN <i>et al.</i> , 1996; TAN <i>et al.</i> , 2007.	Ciano (BakerBond) e fase-reversa (Bond Elut).	Metanol, água e tampões com diversos valores de pH.	Metanol, acetonitrila, água, acetato de amônio, trietilamina e ácido clorídrico.

Tabela 2 – Condições dos métodos descritos na literatura para quantificação de NAP e/ou SUM por CLAE-EM ou CLAE-EM/EM.

Referência	Fármaco	Coluna	Fase Móvel	Ionização/ Detecção	Razão m/z ¹	Dose ² (mg)	Faixa de trabalho
BERGES <i>et al.</i> , 2010	NAP SUM	-	-	-	-	500 85	0,1 - 100 µg/mL 0,1 - 100 ng/mL
HABERER <i>et al.</i> , 2010	NAP SUM	-	-	-	-	500 85	0,5 - 100 µg/mL 0,1 - 140 ng/mL
MICHAEL <i>et al.</i> , 2012	NAP SUM	C ₁₈ , 250 x 2,1 mm, 5 µm	Acetonitrila:ácido acético 0,05% (3:2)	IES(-)-EM IES(+)-EM	228,8 296,0	-	-
PATEL <i>et al.</i> , 2012	NAP SUM	C ₁₈ , 50 x 2,1 mm, 1,7µm	Metanol:acetonitrila:acetato de amônio 4,0 mM (70:10:20)	IES(+)-EM/EM	231,1 → 185,1 296,2 → 58,1	500 85	0,05 - 100 µg/mL 0,05 - 100 ng/mL
MARZO <i>et al.</i> , 1997	NAP	-	-	-	-	502	1 - 100 µg/mL
LÖFFLER; TERNES, 2003	NAP	C ₁₈ , 125 x 3 mm, 5 µm	Acetonitrila:solução de ácido acético pH 2.9 (gradiente)	APCI(-)-EM/EM	229,0 → 185,0	-	-
CHEN <i>et al.</i> , 2005	NAP	C ₁₈ , 100 x 3,0 mm, 3,5 µm	Acetonitrila:ácido acético 0,1%, pH 4 (65:35)	IES(-)-EM	229,0	-	-
PALMA-AGUIRRE <i>et al.</i> , 2009	NAP	-	-	-	-	275	1 - 50 µg/mL
GRACIA-LOR; SANCHO; HERNÁNDEZ, 2010	NAP	Polietoxilsilano, 50 x 2,1 mm, 1,7µm	Acetato de amônio 0,1 mM e ácido fórmico 0,01% em metanol e em água (gradiente)	IES(-)-EM/EM	229,2 → 185,2	-	-
DUBREIL-CHÉNEAU <i>et al.</i> , 2011	NAP	C ₁₈ , 150 x 2 mm, 5 µm	Acetonitrila:ácido acético 1 mM (gradiente)	IES(-)-EM/EM	229,0 → 169,0	-	-
ELSINGHORST <i>et al.</i> , 2011	NAP	C ₁₈ , 50 x 4,6 mm, 5 µm	Acetonitrila:acetato de amônio 2 mM, pH 4,0 (70:30)	IES(-)-EM/EM	229 → 185	220	0,1 - 50,0 µg/mL
SØRENSEN, 2011	NAP	Éter ligado a fenil, 150 x 2 mm, 4 µm	Ácido acético 0,1% em metanol e em água (gradiente)	IES(-)-EM/EM	229 → 185	-	-
GILART <i>et al.</i> , 2012	NAP	C ₁₈ , 100 x 4,6 mm, 2,7 µm	Acetonitrila:solução de ácido acético pH 2.8 (gradiente)	IES(-)-EM/EM	229 → 140	-	-

Tabela 2 – Condições dos métodos descritos na literatura para quantificação de NAP e/ou SUM por CLAE-EM ou CLAE-EM/EM. (continuação)

MCLOUGHLIN <i>et al.</i> , 1996	SUM	Ciano, 250 x 4,6 mm, 5 µm	Acetonitrila:metanol:ácido trifluoroacético 0,1% (36:6:58)	IES(+)-EM/EM	296 → 157	100	0,5 - 50 ng/mL
DULÉRY <i>et al.</i> , 1997	SUM	C ₁₈ , 150 x 2 mm, 4 µm	Acetonitrila:acetato de amônio 20 mM (gradiente)	IES(+)-EM	296,1	-	-
CHENG <i>et al.</i> , 1998	SUM	C ₁₈ , 30 x 4,6 mm, 5 µm	Metanol:acetato de amônio 0,05 M, pH 7 (15:85)	APCI(+)-EM/EM	296 → 58	25	0,2 - 20 ng/mL
DUQUESNOY <i>et al.</i> , 1998	SUM	-	-	-	-	25	1,0 - 30 ng/mL
SRINVASU <i>et al.</i> , 2000	SUM	-	-	-	-	100	1,56 - 50 ng/mL
XU; BARTLETT; STEWART, 2001	SUM	C ₂ , 220 x 4,6 mm, 10 µm	Ácido fórmico 0,1%: (acetonitrila:metanol (6:1)) (90:10)	IES(+)-EM/EM	296,4 → 58; 157; 201; a251	-	-
BOULTON; DUNCAN; VACHHARAJANI, 2003	SUM	C ₈ , 100 x 4,6 mm, 5 µm	Metanol:água:ácido fórmico (90:10:0,1)	IES(+)-EM/EM	296,0 → 251,0	-	-
GE <i>et al.</i> , 2004	SUM	-	-	-	-	100	1 - 100 ng/mL
TAN <i>et al.</i> , 2007	SUM	C ₁₈ , 50 x 4,6 mm, 5 µm	Metanol:acetato de amônio 5 mM (20:80)	IES(+)-EM/EM	296,4 → 58,1	-	-
FERRARI <i>et al.</i> , 2008	SUM	-	-	-	-	100	3 - 90 ng/mL
YADAV <i>et al.</i> , 2011	SUM	C ₁₈ , 50 x 2,1 mm, 5 µm	Acetonitrila:ácido acético 0,1% (85:15)	IES(+)-EM/EM	296,09 → 251,06	-	-
RAO <i>et al.</i> , 2012	SUM	C ₁₈ , 250 x 4,6 mm, 5 µm	Acetonitrila:acetato de amônio 20 mM, pH 3,5 (40:60)	IES(+)-EM/EM	296,14 → 251,08; 201,13; 158,09	-	-

¹ Razão massa/carga.² Comprimidos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a influência de anticoagulantes sobre parâmetros da validação de métodos bioanalíticos para estudos farmacocinéticos e de biodisponibilidade/bioequivalência de NAP sódico e succinato de SUM.

3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar diferentes técnicas de extração para quantificação simultânea de NAP sódico e succinato de SUM em plasma humano por CLAE-EM/EM.
- b) Definir a melhor técnica de extração e validar o método bioanalítico desenvolvido para os três anticoagulantes avaliados no estudo (heparina, EDTA e CPDA).
- c) Comparar e estabelecer os impactos dos diferentes anticoagulantes utilizados sobre os parâmetros da validação do método bioanalítico, tais como efeito matriz, recuperação e estabilidades.
- d) Aplicar o método bioanalítico validado em um estudo de avaliação farmacocinética simultânea de naproxeno sódico 275 mg e de succinato de sumatriptano 50 mg sob a forma de comprimidos revestidos, sendo as amostras de plasma dos voluntários coletadas em tubos contendo heparina ou EDTA como anticoagulante.
- e) Comparar e estabelecer os impactos da utilização de anticoagulantes diferentes nas amostras dos voluntários e nas amostras da curva de calibração sobre as concentrações calculadas a partir da equação da reta.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Substâncias químicas de referência (SQR) e medicamentos

- a) Aceclofenaco SQR (Sigma-Aldrich Brasil Ltda – São Paulo, Brasil), lote 070M4701V, 10 de janeiro de 2018;¹
- b) cloridrato de naratriptano SQR (*United States Pharmacopeial* – USP – Rockville, USA), lote G0I229, lote corrente;
- c) naproxeno sódico SQR (USP – Rockville, USA), lote J1H092, lote corrente;
- d) succinato de sumatriptano SQR (USP – Rockville, USA), lote G0L156, lote corrente;
- e) FLANAX[®], comprimidos revestidos de naproxeno sódico 275 mg (Bayer S.A. – São Paulo, Brasil), lote X20165, validade: fevereiro de 2016;
- f) Imigran[®], comprimidos revestidos de succinato de sumatriptano 50 mg (GlaxoSmithKline Pharmaceuticals S.A. – Poznan, Polônia), lote TE2794V, validade: maio de 2015.

4.1.2 Amostras de plasma humano

- a) Amostras de plasma branco (plasma de voluntários que não estavam fazendo uso de qualquer medicação) coletadas em tubos contendo heparina sódica como anticoagulante (doação do Centro de Biotecnologia – CEBIO – Belo Horizonte, Brasil);
- b) amostras de plasma branco coletadas em tubos contendo EDTA K₃ como anticoagulante (doação do CEBIO – Belo Horizonte, Brasil);
- c) amostras de plasma branco coletadas em bolsas contendo CPDA como anticoagulante (doação da Fundação Hemominas – Belo Horizonte, Brasil);

¹ Embora não seja uma SQR farmacopeica, o padrão de aceclofenaco utilizado no desenvolvimento, validação e aplicação do método, está de acordo com o preconizado pelo artigo 10 da Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012, por se tratar de uma SQR caracterizada, com documentação e laudo analítico emitidos pelo fabricante contendo as informações exigidas.

d) amostras de plasma de voluntários coletadas em tubos contendo heparina sódica ou EDTA K₃ como anticoagulante (doação do Instituto de Ciências Farmacêuticas de Estudos e Pesquisas – ICF – Aparecida de Goiânia, Brasil).

4.1.3 Reagentes

- a) Água ultrapura;
- b) reagentes de grau analítico: acetato de amônio; acetato de etila; acetona; ácido acético glacial; ácido fórmico; diclorometano; hidróxido de amônio, isopropanol, MTBE; sulfato de amônio;
- c) reagentes de grau cromatográfico: acetonitrila e metanol.

4.1.4 Acessórios e vidrarias

- a) Balões volumétricos calibrados;
- b) bastões de vidro;
- c) béqueres;
- d) bolsas para coleta de plasma de 450 mL contendo CPDA;
- e) cartucho para extração em fase sólida STRATATMX – 1 mL, PHENOMENEX;
- f) coluna cromatográfica empacotada com C₁₈ de 50 mm x 4,6 mm e diâmetros de partícula de 5 µm ZORBAX Eclipse Plus, Agilent;
- g) frascos de vidro para soluções;
- h) frasco tipo *vial* de 12 x 32 mm com tampa de rosca e septos de silicone;
- i) kit para filtração de soluções a vácuo;
- j) membrana de celulose regenerada para filtração com 47 mm de diâmetro e poros de 0,45 µm, SARTORIUS;
- k) microtubos de 1,5 e 2,0 mL;
- l) pipetas graduadas;
- m) ponteiras de 200 e 1000 µL para uso em micropipetas;
- n) ponteiras de 1,25; 2,50; 5,00 e 12,00 mL para pipetador automático HandyStep[®], BRAND;
- o) provetas;
- p) tubos criogênicos de 2,0 e 3,5 mL;

- q) tubos de ensaio de vidro 10,0 x 1,0 cm e 12,5 x 1,5 cm;
- r) tubos de fundo cônico tipo Falcon de 15 e 50 mL;
- s) tubos para coleta de plasma de 9 mL contendo heparina sódica;
- t) tubos para coleta de plasma de 6 mL contendo EDTA K₃;
- u) tubos tipo *insert* de fundo plano de 250 µL.

4.1.5 Equipamentos

- a) Agitador tipo vórtex MS1, IKA;
- b) balança analítica com precisão de 0,01 mg BP 211 D, SARTORIUS;
- c) banho de ultra-som 1510R-MT, BRANSON;
- d) bomba de vácuo ME 2, VACUUBRAND;
- e) bomba para infusão direta 100, KD Scientific;
- f) centrífuga MR 23i, JOUAN;
- g) concentrador de amostras TecVap TE-0194, TECNAL;
- h) freezer vertical -70 °C UTL-2186, REVCO;
- i) micropipeta 20 a 200 µL FINNPIPETTE[®] F3, Thermo SCIENTIFIC;
- j) micropipetas P1000, P200 e P20, GILSON;
- k) pipetador automático HandyStep[®], BRAND;
- l) potenciômetro DM-20, DIGIMED;
- m) refrigerador 240, CONSUL;
- n) secador de ar DAS1, PNEUDRI MIDAS;
- o) sistema CLAE-EM/EM composto por: amostrador automático 2777, WATERS; forno de colunas CHM, WATERS; bomba binária 1525µ, WATERS; espectrômetro de massas equipado com fonte de IES Quattro LC, WATERS; software MassLynx 4.1., WATERS;
- p) sistema de purificação de água Direct-Q, MILLIPORE.

4.2 Métodos

4.2.1 Desenvolvimento de método bioanalítico para quantificação simultânea de naproxeno sódico e succinato de sumatriptano em plasma humano por CLAE-EM/EM

O desenvolvimento do método bioanalítico utilizado nesse estudo consistiu na determinação dos parâmetros espectrométricos, cromatográficos e de preparo de amostras, para análise simultânea de NAP e SUM em plasma humano. Visando reduzir o número de variáveis durante o desenvolvimento do método, todos os parâmetros foram determinados em ensaios realizados com plasma contendo heparina sódica. As bases utilizadas para o desenvolvimento do método foram dados obtidos da literatura consultada sobre métodos já desenvolvidos (ver item 2.4) e sobre as características físico-químicas e farmacocinéticas dos fármacos (ver itens 2.2.1.1; 2.2.2.1 e 2.2.3).

Para a quantificação de NAP e SUM, foi aplicada a técnica de padronização interna, utilizando como PIs substâncias com estruturas, características físico-químicas e TRs semelhantes aos dos analitos, que não reajam com componentes da matriz ou com os analitos e que não estejam presentes na matriz das amostras. A escolha dos PIs constituiu parte do desenvolvimento do método, sendo, também, considerados no estabelecimento das condições espectrométricas, cromatográficas e de extração (NIESSEN, 2006; SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; WAINER; LOUGH, 1996;).

4.2.1.1 Determinação dos parâmetros espectrométricos

No desenvolvimento de métodos por CLAE-EM/EM, a primeira etapa consiste na otimização dos parâmetros espectrométricos determinantes para a detecção dos fármacos no espectrômetro de massas. Para tal, foram feitas infusões diretas, através da injeção diretamente no espectrômetro de massas de soluções individuais de NAP, SUM e de candidatos a PI (ibuprofeno, aceclofenaco, ácido mefenâmico, diclofenaco e naratriptano) a 500 ng/mL em uma mistura de metanol:água (1:1), com fluxo de 1200 µL/h. Durante esse procedimento determinou-se as transições de

massas (íon precursor – íon produto) mais intensas e adequadas para cada fármaco, otimizando o modo de ionização (IES positivo (+) ou negativo (-)), as voltagens, como as do capilar e do cone, as temperaturas da fonte e de desolvatação, a resolução de massas baixas e altas (LM - *Low mass* e HM - *High mass*), dentre outros parâmetros. A melhor voltagem de colisão para obtenção dos íons produtos nos espectros de fragmentação (*Daughter Scan*) foi avaliada após a definição dos íons precursores mais intensos através dos espectros de varredura de massas (*MS Scan*).

O fator limitante durante todas as etapas de desenvolvimento do método bioanalítico é a ampla diferença de pKa entre NAP e SUM. Para NAP a ionização por IES(-) é favorável, uma vez que, por ser um ácido orgânico, tem a tendência de perder um próton. Entretanto, como SUM é uma base nitrogenada, a ionização por IES(+) é a melhor opção. Para a quantificação simultânea de NAP e SUM por IES, é necessário encontrar o modo de ionização mais adequado para os dois fármacos, além de PIs com comportamento de ionização semelhante a cada analito. Além da solução de metanol:água (1:1), soluções acidificadas e basificadas também foram testadas na infusão direta, visando favorecer a ionização dos fármacos (PATEL *et al.*, 2012)

4.2.1.2 Determinação dos parâmetros cromatográficos

O ajuste da composição e da proporção da FM foi feito considerando, principalmente, a ampla diferença de pKa entre os analitos.

Após definição dos parâmetros cromatográficos, a viabilidade e a sensibilidade do método, até então analítico, foram testadas nas faixas de concentração necessárias para avaliação farmacocinética de NAP e SUM. A escolha da faixa de trabalho foi feita estimando, com base em dados da literatura, os valores das $C_{máx}$ dos analitos após administração de dose oral única de 50 mg de succinato de SUM e de 275 mg de NAP sódico em voluntários saudáveis. Isso porque as concentrações do limite inferior de quantificação (LIQ) e do limite superior de quantificação (LSQ) são calculadas a partir da concentração mais alta que se pretende analisar. Considerando a variabilidade interindividual, o LSQ deve corresponder a até 2,2

vezes a $C_{m\acute{a}x}$ esperada e o LIQ deve permitir a quantificação dos fármacos a até, no mínimo 3 a 5 $T_{1/2}$. A definição do valor do LIQ nessas condições é necessária para a determinação dos parâmetros farmacocinéticos $T_{1/2}$, K_{El} e $ASC_{0-\infty}$ (BRASIL, 2003a; BRASIL, 2006; BRASIL, 2012; VIEIRA; CAMPOS, 2011).

Os demais pontos da curva de calibração foram definidos em intervalos proporcionalmente espaçados e, para monitorar a precisão e a exatidão do método, preparou-se uma curva de calibração em solução (FM) com 7 pontos injetados em duplicata e em ordem crescente de concentração, além de controles de qualidade (CQ) nas concentrações baixa (CQB), média (CQM) e alta (CQA), injetados em triplicata. As concentrações dos CQs correspondem a 75 - 85% do LSQ para o CQA, a até 3 vezes o LIQ para o CQB e a aproximadamente o meio da curva de calibração para o CQM. Embora a Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 preconize o CQM como uma amostra de CQ com concentração próxima à média entre o LIQ e o LSQ, optou-se por definir a concentração desse controle entre o quarto e o quinto nível da curva para maior homogeneidade da distribuição dos CQ entre os níveis de concentração, permitindo um monitoramento mais eficaz do método bioanalítico (BRASIL, 2012).

4.2.1.3 Determinação dos parâmetros de preparo de amostra

A terceira e última etapa do desenvolvimento do método bioanalítico consiste no estabelecimento de uma técnica de extração dos fármacos do plasma com altas taxas de recuperação e baixos índices de efeito matriz. Essa etapa foi desafiadora por envolver a extração de dois fármacos, com características opostas, como valores de pKa, polaridade e ligação às proteínas plasmáticas, de tal modo que, provavelmente uma determinada técnica seria adequada para um fármaco, mas ineficaz para o outro (PATEL *et al.*, 2012).

Considerando a dificuldade envolvida no desenvolvimento de uma técnica para extração simultânea de NAP e SUM e, visando obter a melhor condição possível, foram avaliadas as três técnicas convencionais de preparo de amostra: ELL; EPT e EFS. Para cada técnica foram incluídas variáveis abrangendo, principalmente, uma ampla faixa de pH. Em cada teste foram avaliados os parâmetros seletividade, efeito

matriz e recuperação em triplicata nas concentrações de CQB e CQA. Para avaliação da seletividade foram utilizadas amostras de plasma branco. A avaliação do efeito matriz foi feita por comparação de amostras de plasma branco extraídas e adicionadas dos analitos e PIs na última etapa da extração com amostras em solução, através da equação (1).

$$\text{Efeito matriz} = \frac{\text{Área sob o pico na amostra de plasma} \times 100}{\text{Área sob o pico na amostra em solução}} - 100 \quad (1)$$

A recuperação foi avaliada através da comparação de amostras de plasma branco adicionadas de NAP e SUM antes da extração com amostras em solução, sendo expressa como a porcentagem da concentração nominal declarada do analito ou PI na matriz biológica que foi efetivamente extraída no processo, conforme a equação (2). Para evitar diferenças de ionização dos fármacos entre as amostras extraídas e em solução, optou-se por utilizar FM como solução de ressuspensão na última etapa da extração. As soluções de PIs foram adicionadas na primeira etapa da extração em todas as amostras. Não há limites para aprovação da recuperação, já que consiste em um ensaio de qualidade. Portanto, não é necessário que a recuperação seja 100%, mas desejável que as taxas de recuperação dos analitos e dos PIs sejam precisas e constantes dentro da faixa de trabalho (BRASIL, 2003a; FDA, 2013).

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Área sob o pico na amostra em solução} \times 100}{\text{Área sob o pico na amostra extraída}} \quad (2)$$

Os cálculos dos valores de recuperação e de efeito matriz foram feitos com as devidas correções matemáticas das diluições, concentrações e perdas teóricas dos procedimentos de extração, para que os valores obtidos não fossem sub ou superestimados, resultando em conclusões errôneas sobre a melhor técnica.

Os testes de EPT foram realizados com três solventes precipitantes: metanol; acetonitrila e acetona. Cada solvente foi avaliado com adição de ácido, base ou puro. Também foi avaliada a utilização de ácido tricloroacético a 60% como agente precipitante. No procedimento padrão utilizado, foram adicionados 25 µL de cada

solução de PI, totalizando 50 μL , a um microtubo contendo 250 μL de plasma adicionado de NAP e SUM. Após agitação em vórtex por 20 segundos, foram acrescentados 500 μL de agente precipitante acidificado, basificado ou neutro e o microtubo foi submetido à agitação em vórtex por 60 segundos e centrifugação a 22639 g por 5 minutos a 5 $^{\circ}\text{C}$. Uma alíquota de 200 μL do sobrenadante foi transferida para *vial* com *insert* e 20 μL foram injetados no sistema CLAE-EM/EM. Para avaliação do efeito matriz, a amostra utilizada na comparação consistiu no produto da extração de plasma branco pelo mesmo procedimento, sendo que ao final, 200 μL do sobrenadante foram misturados a 200 μL de uma solução contendo analitos e PIs na mesma concentração do sobrenadante obtido na extração do plasma adicionado de NAP e SUM.

A avaliação da EFS foi feita por meio de quatro testes variando a solução de lavagem e a solução extratora, com alteração da acidez, basicidade e polaridade, para favorecer a extração dos analitos (Tabela 3). Foram utilizados cartuchos de base polimérica para extração em fase reversa de compostos polares e apolares, resistentes a variações de pH de 1 a 14. Antes da extração propriamente dita, cada cartucho foi submetido ao condicionamento com 1 mL de metanol e ao equilíbrio com 1 mL de água ultrapura, sendo que, após cada adição de solvente ou amostra, os cartuchos foram centrifugados em tubos de 10,0 x 1,0 cm a 1986 g por 2 minutos a 5 $^{\circ}\text{C}$ para aumentar a velocidade de vazão do fluido pelo cartucho.

Tabela 3 – Composição das soluções de lavagem e extratoras utilizadas nos testes de EFS para extração simultânea de NAP e SUM em plasma humano.

Teste	Solução de lavagem	Solução extratora
I	Metanol:água (20:80)	Metanol:acetonitrila:água:ácido acético (60:30:10:0,1)
II	Ácido acético 2% em metanol:água (5:95)	Hidróxido de amônio 2% em metanol:água (50:50)
III	Hidróxido de amônio 2% em metanol:água (5:95)	Ácido acético 2% em metanol:água (50:50)
IV	Metanol:água (20:80)	1 ^a - Hidróxido de amônio 2% em metanol:água (50:50)
		2 ^a - Ácido acético 2% em metanol:água (50:50)

Para a extração, foram adicionados 25 µL de cada solução de PI, totalizando 50 µL, a um microtubo contendo 250 µL de plasma adicionado de NAP e SUM e, após agitação em vórtex por 20 segundos, o volume total de 300 µL foi transferido para o cartucho de extração. Após incorporação da amostra na base polimérica, 1 mL da solução de lavagem foi passado pelo cartucho, o qual foi, posteriormente, transferido para um tubo limpo. Adicionou-se 500 µL da solução extratora e o extrato obtido foi coletado e transferido para *vial* com *insert*, sendo injetados 20 µL no sistema CLAE-EM/EM. Para avaliação do efeito matriz a amostra utilizada na comparação consistiu no produto da extração de plasma branco pelo mesmo procedimento, sendo que ao final, 250 µL do extrato foram misturados a 250 µL de uma solução contendo analitos e PIs na mesma concentração do extrato obtido na extração do plasma adicionado de NAP e SUM.

Os testes de ELL foram realizados com variações na solução extratora e no aditivo adicionado para variar o pH do meio (hidróxido de amônio, ácido fosfórico ou fórmico) ou a solubilidade dos analitos na fase aquosa (sulfato de amônio). O procedimento padrão consistiu na adição de 25 µL de cada solução de PI, totalizando 50 µL, a um tubo de 10,0 x 1,0 cm contendo 250 µL de plasma adicionado de NAP e SUM, além de 25 µL do aditivo. Após agitação em vórtex por 15 segundos, foram acrescentados 2 mL de solução extratora e o tubo foi submetido à agitação em vórtex por 60 segundos e centrifugação a 1986 g por 5 minutos a 5 °C. Uma alíquota de 1600 µL do sobrenadante foi transferidas para tubo de 12,5 x 1,5 cm e evaporada em banho a 60 °C sob corrente de ar seco. Ao resíduo seco foram adicionados 200 µL de FM e, após agitação em vórtex por 30 segundos, transferidos para *vial* com *insert*, sendo injetados 20 µL no sistema CLAE-EM/EM. Para avaliação do efeito matriz, a amostra utilizada na comparação consistiu no produto da extração de plasma branco pelo mesmo procedimento, sendo que ao final, o resíduo seco foi reconstituído com 200 µL de uma solução contendo analitos e PIs na mesma concentração do sobrenadante obtido na extração do plasma adicionado de NAP e SUM.

Após escolha da melhor técnica de extração, foi preparada uma curva de calibração e CQs com amostras extraídas nos mesmos níveis e replicatas descritos no item 4.2.1.2, para confirmar a linearidade, a sensibilidade, a precisão e a exatidão do

método bioanalítico desenvolvido para quantificação de NAP e SUM, antes do início da validação propriamente dita.

4.2.2 Avaliação da influência de HEPA, EDTA e CPDA sobre a seletividade do método bioanalítico desenvolvido

Visando avaliar a influência de heparina sódica (HEPA), EDTA K₃ (denominado apenas como EDTA) e CPDA sobre a seletividade do método bioanalítico desenvolvido, elaborou-se um ensaio, considerando a variação da concentração de anticoagulantes nos tubos ou bolsas de coleta. Foram utilizados tubos contendo EDTA com volume nominal de 4 mL ou contendo HEPA com volume nominal de 9 mL e bolsas contendo CPDA com capacidade para coleta de 450 mL de sangue. O ensaio foi realizado em solução (FM) para verificar se os anticoagulantes são detectados nos canais de transições de massas dos analitos e dos PIs, gerando zonas de indução ou supressão da linha de base, e em plasma para verificar se após a extração o efeito indutor ou supressor permanece, indicando que os anticoagulantes foram extraídos.

Foram utilizadas as mesmas condições de extração, separação e detecção do método bioanalítico desenvolvido e a análise foi feita em três concentrações dos anticoagulantes equivalente a uma, duas e quatro vezes a concentração nominal (1CN, 2CN, 4CN). As amostras de HEPA e de EDTA foram preparadas através da coleta de sangue ou adição de FM em volumes correspondentes a 1,0; 0,5 ou 0,25 vezes a capacidade nominal do tubo, levando à 1CN, 2CN ou 4CN. No preparo das amostras de CPDA foi utilizada uma bolsa de coleta com volume de plasma correspondente à capacidade nominal (1CN). Para obtenção das concentrações 2CN e 4CN em plasma e das três concentrações em FM, utilizou-se uma bolsa de coleta nova para retirada da solução de anticoagulante e diluição em FM ou no plasma obtido a partir da primeira bolsa. As concentrações das amostras de HEPA, EDTA e CPDA estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 – Concentrações das amostras de HEPA, EDTA e CPDA utilizadas no ensaio.

Nível	Concentração		
	HEPA	EDTA	CPDA
1CN	0,093 mg/mL ¹	1,800 mg/mL	0,140 mL/mL ²
2CN	0,186 mg/mL	3,600 mg/mL	0,280 mL/mL
4CN	0,372 mg/mL	7,200 mg/mL	0,560 mL/mL

¹ Equivalente à 14 UI de heparina sódica

² Equivalente à 3,682 mg de citrato de sódio diidratado, 0,4578 mg de ácido cítrico monoidratado, 0,3108 mg de fosfato de sódio monobásico monoidratado, 4,466 mg de dextrose monoidratada e 0,0385 mg de adenina.

A influência de HEPA, EDTA e CPDA sobre a seletividade do método bioanalítico desenvolvido foi avaliada através da seguinte sequência analítica:

- a) 2 amostras 1CN de HEPA, EDTA ou CPDA em FM;
- b) 2 amostras 2CN de HEPA, EDTA ou CPDA em FM;
- c) 2 amostras 4CN de HEPA, EDTA ou CPDA em FM;
- d) 2 amostras 1CN de HEPA, EDTA ou CPDA em plasma;
- e) 2 amostras 2CN de HEPA, EDTA ou CPDA em plasma;
- f) 2 amostras 4CN de HEPA, EDTA ou CPDA em plasma;

A análise dos resultados consistiu na avaliação visual dos cromatogramas obtidos em busca de efeitos indutores ou supressores nos canais de transições de massas dos analitos e dos PIs próximos aos TRs. Tomando como base os critérios de aceitação do ensaio de seletividade proposto na Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 da ANVISA, a presença de interferentes nos TRs dos fármacos só seria aceita se a área sob os picos ou vales fosse inferior a 20% das áreas dos analitos no LIQ e a 5% das áreas dos PIs. No caso da existência de algum efeito, os impactos da interferência deveriam ser considerados, sendo avaliada a necessidade de alteração das condições de extração e/ou separação do método.

4.2.3 Validação de método bioanalítico para quantificação simultânea de naproxeno sódico e succinato de sumatriptano em plasma humano coletado com HEPA, EDTA ou CPDA por CLAE-EM/EM

O método bioanalítico desenvolvido para quantificação simultânea de NAP e SUM em plasma humano por CLAE-EM/EM foi validado de acordo com as recomendações da Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 da ANVISA, por ser a norma vigente no Brasil para validação de métodos bioanalíticos aplicados em

estudos de biodisponibilidade/bioequivalência e farmacocinética. Todos os cálculos foram feitos com auxílio dos softwares Masslynx 4.1 e Microsoft Excel 2010.

Foram realizadas três validações completas, sendo uma para cada matriz avaliada: plasma coletado com HEPA, EDTA ou CPDA. O objetivo inicial era a avaliação exclusiva dos impactos dos tipos de anticoagulantes (heparina, EDTA e mistura citrato/fosfato/dextrose/adenina/ácido cítrico) sobre os parâmetros preconizados pela norma vigente no Brasil para validação métodos bioanalíticos. Como forma de minimizar os possíveis interferentes, foi almejada a utilização de soluções contendo apenas sódio como íon associado: heparina sódica; EDTA Na₂ e solução de CPDA (citrato de sódio, fosfato de sódio, ácido cítrico, dextrose e adenina). Entretanto, todas as diversas empresas fornecedoras de tubos para coleta de sangue consultadas não possuíam tubos com EDTA Na₂, sendo necessária a alteração da proposta original e a utilização de EDTA K₃ como um dos anticoagulantes analisados. Desse modo, foram avaliados os impactos não apenas dos tipos de anticoagulante, mas também do tipo de íon associado (sódio ou potássio) e da concentração desses íons na solução de anticoagulante, já que a concentração de sódio no CPDA é muito superior à concentração desse íon na heparina sódica.

Para cada validação, foram realizados os ensaios de seletividade, efeito residual, efeito matriz, linearidade da faixa de trabalho, precisão, exatidão e estabilidade dos analitos em plasma e em solução, conforme as especificações de cada ensaio. No início de cada validação, foi feita a adição de padrão a amostras plasma branco com soluções de NAP e SUM nas concentrações da curva de calibração e dos CQs em volumes suficientes para a realização de todos os ensaios previstos. Após o preparo e fracionamento em tubos criogênicos, todas as amostras foram congeladas a -70 °C, sendo descongeladas no momento da execução de cada ensaio.

4.2.3.1 Seletividade

Para avaliação da seletividade, foram analisadas amostras de plasma branco de seis fontes distintas, sendo quatro amostras de plasma normal, uma de plasma lipêmico e uma de plasma hemolisado. O plasma hemolisado é um plasma que

contém componentes celulares das hemácias lisadas em um grau específico e o plasma lipêmico possui alto teor de lipídeos e é proveniente de coleta pós-prandial.

As áreas sob os picos dos cromatogramas dessas amostras foram comparadas com aquelas obtidas a partir de amostras extraídas na concentração do LIQ. A presença de picos interferentes nos TRs dos fármacos só foi aceita quando a área sob os picos foi inferior a 20% das áreas dos analitos no LIQ e a 5% das áreas dos PIs. Caso alguma amostra estivesse fora desses limites, ela deveria ser rejeitada e outras seis amostras de plasma deveriam ser testadas. Se houvesse interferência em uma ou mais amostras do segundo grupo acima dos limites estabelecidos, o método deveria ser alterado visando eliminá-la.

A seletividade do método foi avaliada através da seguinte sequência analítica:

- a) 4 amostras de plasma branco normal;
- b) 1 amostra de plasma branco lipêmico;
- c) 1 amostra de plasma branco hemolisado;
- d) 2 amostras de LIQ.

O ensaio de seletividade da validação com o plasma contendo CPDA foi realizado, não apenas com seis amostras, mas com todas as amostras utilizadas durante a validação e aplicação do método, por haver um menor controle das condições de alimentação e utilização de medicamentos pelos voluntários anteriormente à coleta.

4.2.3.2 Efeito residual

Para avaliação do efeito residual, foram realizadas três injeções da mesma amostra de plasma branco aprovada no ensaio de seletividade, sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma amostra extraída de LSQ. As áreas sob os picos dos cromatogramas das amostras de plasma branco foram comparadas com aquelas obtidas a partir de amostras extraídas na concentração do LIQ. A presença de picos interferentes nos TRs dos fármacos só foi aceita quando a área sob os picos foi inferior a 20% das áreas dos analitos no LIQ e a 5% das áreas dos PIs. Caso houvesse efeito residual inevitável, procedimentos específicos, como aumento do

número de ciclos de lavagem da seringa ou alteração da composição das soluções de lavagem, deveriam ser adotados na execução do método, evitando que a precisão e a exatidão fossem afetadas.

A existência de efeito residual no método foi avaliada através da seguinte sequência analítica:

- a) 1 injeção da amostra de plasma branco normal;
- b) 1 amostra de LSQ;
- c) 2 injeções da amostra de plasma branco normal;
- d) 1 amostra de LIQ.

4.2.3.3 Efeito matriz

Para validação do efeito matriz foram também utilizadas algumas recomendações de outros guias, já que esse é o parâmetro crucial na avaliação da influência de anticoagulantes em um método bioanalítico e que o procedimento proposto na Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012, não abrange todos os aspectos do efeito matriz: efeito rotacional e efeito translacional. Os guias complementares utilizados foram: Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos do FDA – *Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation*, 2013; Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos da *European Medicines Agency (EMA) – Guideline on bioanalytical method validation*, 2011 e Guia de Validação de Métodos de Ensaio Químicos do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), 2007 e 2011.

A determinação do efeito matriz foi realizada por meio de dois procedimentos, sendo o primeiro a reprodução exata do procedimento proposto pela Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012, e o segundo uma adaptação dos procedimentos de outros guias.

O efeito matriz do método foi avaliado através da seguinte sequência analítica:

- a) 4 amostras de CQB em solução (FM);
- b) 4 amostras de CQM em solução (FM);
- c) 4 amostras de CQA em solução (FM);

- d) 4 amostras de plasma branco normal, 2 de plasma branco lipêmico e 2 de plasma branco hemolisado, extraídas e adicionadas de solução (FM) contendo analitos na concentração do CQB e PIs na última etapa da extração;
- e) 4 amostras de plasma branco normal, 2 de plasma branco lipêmico e 2 de plasma branco hemolisado, extraídas e adicionadas de solução (FM) contendo analitos na concentração do CQM e PIs na última etapa da extração;
- f) 4 amostras de plasma branco normal, 2 de plasma branco lipêmico e 2 de plasma branco hemolisado, extraídas e adicionadas de solução (FM) contendo analitos na concentração do CQA e PIs na última etapa da extração.

4.2.3.3.1 Determinação de acordo com a RDC nº 27

O procedimento proposto pela Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 é muito semelhante ao procedimento do Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos da EMA (*Guideline on bioanalytical method validation*, 2011). Esses guias consideram a relação existente entre o efeito de interferentes da matriz sobre o analito e sobre seu PI. Essa relação, em detrimento do valor de efeito matriz absoluto para um analito, é interessante, pois caso o PI sofra efeito matriz semelhante ao sofrido pelo analito, a função do PI de reproduzir possíveis perdas ou variações do analito durante o procedimento do método, está sendo adequadamente cumprida (NIESSEN, 2006).

O efeito matriz foi avaliado segundo a Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 através da comparação de amostras de plasma branco extraídas e adicionadas dos analitos e PIs na última etapa da extração com amostras em solução, nas concentrações de CQB e CQA. Para que a única diferença entre a composição das amostras extraídas e em solução fosse possíveis interferentes extraídos da matriz, optou-se por utilizar FM como solução de ressuspensão, evitando diferenças de ionização dos analitos e PIs entre as amostras. Foram analisadas oito amostras de fontes distintas, sendo quatro normais, duas lipêmicas e duas hemolisadas. Para cada amostra foi obtido o fator de matriz normalizado por PI (FMN), conforme a equação (3). O critério de aceitação utilizado foi de que o Coeficiente de Variação (CV%) dos FMNs relativos a todas as amostras deveria ser inferior a 15%. Caso o valor obtido fosse superior a 15%, devido ao resultado discrepante das amostras de plasma hemolisado, novo CV% dos FMNs sem essas amostras poderia ser

calculado, impedindo, entretanto, a análise de amostras de plasma hemolisado na aplicação do método.

$$FMN = \frac{\text{Área sob o pico do analito em matriz}/\text{Área sob o pico do PI em matriz}}{\text{Área sob o pico do analito em solução}/\text{Área sob o pico do PI em solução}} \quad (3)$$

4.2.3.3.2 Determinação de acordo com outros guias

Embora a Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 considere variações da intensidade de efeito matriz entre as concentrações na faixa de trabalho, através da análise do efeito matriz no CQB e no CQA, o procedimento proposto não avalia o efeito matriz rotacional. Essa avaliação é fundamental para assegurar que durante a análise das amostras de voluntários, aquelas coletadas próximas à $C_{\text{máx}}$, não terão suas concentrações sub ou superestimadas em decorrência de supressão ou indução do sinal analítico com maior intensidade nas concentrações mais altas da curva.

Nenhum dos guias direcionados à validação de métodos bioanalíticos para estudos de biodisponibilidade/bioequivalência traz recomendações sobre qual procedimento deve ser adotado na avaliação do efeito matriz, nem sobre quais parâmetros devem ser monitorados, não ficando clara a necessidade de avaliar a influência sobre a inclinação da curva de calibração. Desse modo, para elaboração do procedimento utilizado nesse estudo, foram considerados guias para validação de métodos em que o objetivo principal da realização do ensaio é identificar a ausência de efeito matriz para utilização de uma curva em solução durante a rotina de análise. Tanto a indústria farmacêutica quanto as agências reguladoras recomendam que a validação de métodos bioanalíticos para estudos de biodisponibilidade e bioequivalência deve ser realizada utilizando como amostras da curva de calibração e dos controles de qualidade, a matriz biológica branca adicionada do analito nas concentrações desejadas (ZHOU *et al.*, 2005).

Visando avaliar o efeito matriz rotacional e translacional, e comparar com as conclusões obtidas sobre a aprovação do método de acordo a Resolução RDC nº 27

de 17 de maio de 2012, foi elaborado um procedimento tomando como base o Guia de Validação de Métodos de Ensaio Químicos do INMETRO de 2007, mas considerando algumas recomendações do Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos do FDA (*Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation*, 2013) e do Guia de Validação de Métodos de Ensaio Químicos do INMETRO de 2011, para adequação às condições de realização do ensaio disponíveis.

O procedimento para avaliação do efeito matriz rotacional e translacional consistiu no preparo de duas curvas de calibração com três concentrações distintas, preparadas em quadruplicata, correspondentes ao CQB, CQM e CQA. A primeira curva foi composta por amostras preparadas em solução (FM) e a segunda por amostras de plasma branco normal extraídas e adicionadas dos analitos e PIs na última etapa da extração.

Com os resultados obtidos, após confirmação da linearidade das curvas em solução e em matriz, aplicou-se o teste F (*Fischer-Snedecor*), para avaliação da homogeneidade das variâncias dos resíduos das curvas. Esse teste confronta a hipótese nula (H_0) de que as variâncias dos resíduos não diferem entre si (há homoscedasticidade) com a hipótese alternativa (H_a) de que as variâncias dos resíduos diferem entre si (há heteroscedasticidade). Para a H_0 não ser rejeitada, o valor de $F_{\text{calculado}}$ deve ser menor que o de $F_{\text{crítico}}$ a um nível de significância (α) de 0,05.

De acordo com o resultado do teste F , aplicou-se o teste t (*Student*) para comparação das inclinações e das interseções, utilizando o teste t com variâncias combinadas, se as variâncias fossem homogêneas e o teste t com variâncias distintas, se as variâncias fossem heterogêneas. Esse teste avalia a H_0 de que as inclinações e interseções não diferem entre si e a H_a de que as inclinações e interseções diferem entre si. Para a H_0 não ser rejeitada, os valores de $t_{\text{calculado}}$ da inclinação da reta (t_b) e da interseção da reta (t_a) devem ser menores que o valor de $t_{\text{crítico}}$ a um α de 0,05. Para aprovação do ensaio de avaliação do efeito matriz, os valores de t_b e de t_a deveriam ser inferiores aos valores de $t_{\text{crítico}}$. Caso situação oposta fosse obtida, o efeito matriz seria considerado crítico para a análise.

Os testes F e t foram aplicados para NAP e SUM, inicialmente, considerando a área sob o pico de cada analito e, posteriormente, considerando as razões entre as áreas sob os picos de NAP ou SUM e seus PIs (A_{SUM}/A_{PI} e A_{NAP}/A_{PI}). Essa análise foi feita com o objetivo de avaliar se o PI utilizado corrigiria possíveis efeitos sobre a inclinação ou interseção da curva.

4.2.3.4 Linearidade da faixa de trabalho

A linearidade da faixa de trabalho foi avaliada por meio de três curvas de calibração extraídas e analisadas em, pelo menos dois dias diferentes e por dois analistas. Cada curva consistiu de duas amostras Branco (amostras de plasma branco), duas amostras Zero (amostras de plasma branco com adição dos PIs no início da extração) e duas amostras de cada um dos níveis de concentração dos analitos. De acordo com a Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012, a curva de calibração deve ser construída com, no mínimo, seis concentrações diferentes (seis pontos). Considerando a ampla faixa de trabalho de NAP, com três ordens de magnitude, optou-se por utilizar sete níveis de concentração na curva de calibração, para que a distribuição dos pontos ao longo da faixa de concentração fosse mais homogênea. As soluções de PI foram adicionadas na primeira etapa da extração em todas as amostras da curva de calibração, exceto nas amostras Branco.

A equação que representa a relação entre a resposta do instrumento e as concentrações conhecidas do analito, foi plotada priorizando o modelo matemático mais simples possível, utilizando um fator de ponderação com o menor valor para a soma dos erros relativos das concentrações nominais *versus* os valores calculados pela equação da curva, caso a variância do erro não fosse constante em toda a faixa de trabalho. As respostas obtidas para as amostras Branco e Zero não foram utilizadas na equação da curva de calibração e a concentração de cada ponto da curva foi calculada considerando a razão entre a área dos analitos e a área dos PIs.

Para aprovação da faixa de trabalho proposta, foram considerados os desvios das concentrações calculadas para cada ponto em relação às concentrações nominais.

O desvio máximo permitido foi de 20% para o LIQ e de 15% para os demais níveis de concentração. Qualquer ponto com desvio acima do valor preconizado foi excluído, não sendo utilizado para o cálculo da equação da reta e, nenhum ponto aprovado foi excluído. A curva de calibração foi considerada aprovada quando teve 75% dos pontos (10 pontos) com desvios inferiores aos descritos, além de no mínimo seis níveis de concentração, incluindo o LIQ e o LSQ, aprovados conforme os critérios de aceitação preconizados.

Para avaliação da precisão e exatidão do método, foram extraídas e analisadas simultaneamente a cada curva de calibração, amostras em sextuplicata de CQ em cinco concentrações: LIQ; CQB; CQM; CQA e controle de qualidade de diluição (CQD). Um CQD é uma amostra adicionada dos analitos em concentração superior ao LSQ, analisada por meio de procedimento e proporção de diluição pré-definidos. Nesse estudo a concentração do CQD foi o dobro da concentração do CQA, sendo diluída através da adição de plasma branco na proporção de 1:1 (v/v). As soluções de PI foram adicionadas na primeira etapa da extração em todos os CQs.

A linearidade da faixa de trabalho, a precisão e a exatidão do método foram avaliadas através da seguinte sequência analítica:

- a) 2 amostras Branco;
- b) 2 amostras Zero;
- c) 2 amostras de cada um dos 7 níveis de concentração da curva de calibração;
- d) 6 amostras de LIQ;
- e) 6 amostras de CQB;
- f) 6 amostras de CQM;
- g) 6 amostras de CQA;
- h) 6 amostras de CQD.

4.2.3.5 Precisão

A avaliação da precisão intracorrida e intercorridas foi feita simultaneamente à determinação da linearidade da faixa de trabalho, como descrito no item 4.2.3.4. O Desvio Padrão Relativo (DPR) ou CV%, foi utilizado para expressar a precisão do

método, sendo calculado com base em todos os valores obtidos, conforme a equação (4). Não foram admitidos valores superiores a 15%, exceto para o LIQ, para o qual se admitiu valores menores ou iguais a 20%.

$$CV\% = \frac{\text{Desvio padrão} \times 100}{\text{Concentração média experimental}} \quad (4)$$

4.2.3.6 Exatidão

A avaliação da exatidão intracorrida e intercorridas foi feita simultaneamente à determinação da linearidade da faixa de trabalho, como descrito no item 4.2.3.4. O Erro Padrão Relativo (EPR%), foi utilizado para expressar a exatidão do método, sendo calculado com base em todos os valores obtidos, conforme a equação (5). Não foram admitidos valores fora da faixa de $\pm 15\%$ do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual não se admitiu valores fora da faixa de $\pm 20\%$ do valor nominal.

$$EPR\% = \frac{(\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal}) \times 100}{\text{Valor nominal}} \quad (5)$$

4.2.3.7 Estabilidade dos analitos em matriz biológica

A estabilidade de NAP e SUM em plasma humano foi demonstrada em quatro condições específicas: estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento (ECC); estabilidade de curta duração (ECD); estabilidade de longa duração (ELD) e estabilidade pós-processamento (EPP). Em todos os ensaios de estabilidade, foram extraídas simultaneamente a uma curva de calibração, amostras em quadruplicata de CQB e CQA, sendo adicionadas soluções dos PIs na primeira etapa da extração e analisadas imediatamente após submissão às condições do ensaio.

Visando evitar a obtenção de falsas conclusões sobre a estabilidade dos analitos nas condições testadas, as amostras de CQB e CQA utilizadas em cada ensaio foram preparadas a partir de uma amostra de plasma contendo NAP e SUM provenientes de um único procedimento de adição de padrão. Imediatamente após o

preparo e fracionamento em tubos criogênicos com os volumes necessários para cada ensaio de estabilidade, todas as amostras foram congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, exceto um conjunto de amostras de CQB e CQA. Esse conjunto foi imediatamente extraído e analisado junto com uma curva de calibração para verificar se houve alguma falha na adição de padrão ao plasma branco, levando a concentrações inferiores ou superiores ao valor nominal. As amostras congeladas foram utilizadas apenas se, como o resultado desse ensaio inicial, as amostras de CQ apresentaram desvios de concentração dentro da faixa de $\pm 15\%$ do valor nominal. Caso contrário, o procedimento de adição de padrão ao plasma e análise das amostras recém-preparadas deveria ser repetido novamente.

A seguinte sequência analítica foi utilizada para análise das amostras recém-preparadas:

- a) 2 amostras Branco;
- b) 2 amostras Zero;
- c) 2 amostras de cada um dos 7 níveis de concentração da curva de calibração;
- d) 4 amostras de CQB;
- e) 4 amostras de CQA.

Os conjuntos de CQB e CQA fracionados e congelados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura de armazenamento também das amostras de voluntários, foram submetidos às condições de cada ensaio de estabilidade, sendo analisados simultaneamente a uma curva de calibração recém-preparada. A determinação dos períodos de avaliação da estabilidade dos analitos em cada uma das condições testadas (ECC, ECD, ELD e EPP) nas três matrizes (plasma humano contendo HEPA, EDTA ou CPDA) foi feita considerando:

- a) a estimativa do tempo em que as amostras dos voluntários poderiam vir a ficar submetidas às diferentes condições de temperatura durante o preparo e análise;
- b) a logística do laboratório para realização dos ensaios, como período de funcionamento diurno, cronograma de análises, pausas para manutenções e calibrações dos equipamentos, etc.

A estabilidade foi demonstrada quando não se observou desvio superior a 15% da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal, sendo que todas as concentrações obtidas foram incluídas no cálculo da média.

As ECC, ECD e EPP foram avaliadas através da seguinte sequência analítica:

- a) 2 amostras Branco;
- b) 2 amostras Zero;
- c) 2 amostras de cada um dos 7 níveis de concentração da curva de calibração;
- d) 4 amostras de CQB e 4 amostras de CQA da ECC;
- e) 4 amostras de CQB e 4 amostras de CQA da ECD;
- f) 4 amostras de CQB e 4 amostras de CQA da EPP.

A ELD foi avaliada através da seguinte sequência analítica:

- a) 2 amostras Branco;
- b) 2 amostras Zero;
- c) 2 amostras de cada um dos 7 níveis de concentração da curva de calibração;
- d) 4 amostras de CQB e 4 amostras de CQA da ELD.

4.2.3.7.1 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

O ensaio de ECC avaliou a estabilidade dos analitos em plasma humano após ciclos de congelamento a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e descongelamento completo a temperatura de trabalho de $22 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. O número de ciclos foi definido com base na previsão da quantidade de descongelamentos a que as amostras de voluntários pudessem vir a ser submetidas durante a análise. A cada ciclo, as amostras foram mantidas congeladas por no mínimo 12 horas. As amostras foram extraídas e analisadas após o último descongelamento.

4.2.3.7.2 Estabilidade de curta duração

A ECD dos analitos em plasma humano mantido a temperatura de trabalho foi avaliada por um período específico para amostras de plasma humano contendo HEPA, EDTA ou CPDA, respectivamente. A duração da ECD foi definida com base

na previsão do tempo máximo a que as amostras de plasma humano descongeladas poderiam vir a ficar a temperatura de trabalho antes do início da extração. A temperatura do laboratório é controlada, sendo mantida a 22 ± 2 °C. As amostras foram extraídas e analisadas após o período do ensaio.

4.2.3.7.3 Estabilidade de longa duração

A ELD dos analitos em plasma humano mantido a -70 °C foi avaliada por um período específico para amostras de plasma humano contendo HEPA, EDTA ou CPDA, respectivamente. A duração da ELD foi definida com base na previsão do tempo gasto para análise de todas as amostras de voluntários abrangendo o intervalo entre a coleta da primeira amostra até a análise da última. As amostras foram descongeladas, extraídas e analisadas após o período do ensaio.

4.2.3.7.4 Estabilidade pós-processamento

A solução obtida ao término da extração, mistura de substâncias extraídas do plasma, incluindo analitos, solventes orgânicos e aquosos, possui constituição completamente distinta da matriz original (plasma humano). Após a extração, todas as amostras são mantidas no amostrador automático a 5 ± 3 °C até o término da análise. A EPP deve abranger o intervalo compreendido entre o término da extração e a análise da última amostra da corrida analítica mais longa do estudo. Desse modo, a EPP dos analitos na solução final da extração mantida no amostrador automático foi avaliada por um período específico para amostras de plasma humano contendo HEPA, EDTA ou CPDA, respectivamente.

4.2.3.8 **Estabilidade dos analitos e PIs em solução**

Durante toda a validação e aplicação do método são utilizadas soluções contendo NAP e SUM para adição de padrão ao plasma branco no preparo das amostras da curva de calibração e dos CQs, além de soluções contendo os PIs para adição no início da extração. A estabilidade em solução (ESS) dos analitos e dos PIs foi avaliada sob as temperaturas de trabalho (22 ± 2 °C) e de armazenamento ($5 \pm$

3 °C) por um período superior ao que as soluções foram expostas a essas condições.

Para avaliação da ESS sob as condições preconizadas, soluções de trabalho em duas concentrações, LIQ e LSQ, foram obtidas em triplicata, por diluições a partir das soluções primárias recém-preparadas. As soluções dos PIs utilizadas no ensaio foram dez vezes mais diluídas que as soluções de trabalho, para corresponder à concentração dos PIs em plasma após a adição. Todas as soluções foram preparadas utilizando a mistura de metanol:água (1:1, v/v) como solução diluente. Após o preparo, cada solução foi fracionada em dois *vials* devidamente lacrados para impedir a evaporação. Os primeiros *vials* foram imediatamente analisados e os segundos deixados a temperatura de trabalho pelo período do ensaio, sendo submetidos à análise ao término desse período, para avaliação da ESS à temperatura de trabalho. As amostras recém-preparadas (primeiros *vials*) foram transferidas para um refrigerador com temperatura controlada mantida a 5 ± 3 °C após o término da análise e, ao final do período do ensaio, foram novamente analisadas.

A conclusão sobre a ESS dos analitos e PIs foi obtida através da comparação entre a média das áreas sob os picos obtidas a partir das soluções recém-preparadas com as obtidas para as soluções submetidas às condições dos ensaios, conforme a equação (6). As soluções foram consideradas estáveis quando não se observou variações superiores a 10%.

$$\text{Variação\%} = \frac{(\text{Área média Experimental} - \text{Área média Referência}) \times 100}{\text{Área média Referência}} \quad (6)$$

4.2.4 Estudo de avaliação farmacocinética simultânea de naproxeno sódico 275 mg e de succinato de sumatriptano 50 mg sob a forma de comprimidos revestidos.

A determinação dos impactos da utilização de anticoagulantes diferentes nas amostras dos voluntários e nas amostras da curva de calibração sobre as concentrações calculadas a partir da equação da reta, foi realizada por meio de um

estudo de avaliação farmacocinética simultânea de NAP sódico 275 mg e de succinato de SUM 50 mg sob a forma de comprimidos revestidos.

4.2.4.1 Etapa clínica

A etapa clínica foi realizada na Unidade Clínica do ICF, em Aparecida de Goiânia – Goiás, que conta com infraestrutura completa para realização de estudos clínicos e para socorrer e dar atendimento às intercorrências habituais relacionadas ao procedimento ou a eventos adversos dos fármacos em estudo. O corpo de profissionais incluiu médicos, enfermeiros, técnicos em enfermagem e farmacêuticos. Apesar de não existir Unidade de Terapia Intensiva (UTI) no local, uma UTI móvel ficou de plantão no ICF a disposição dos voluntários por 6 horas após a administração dos medicamentos, além de um médico intensivista para prestar os primeiros socorros, caso fosse necessário.

O protocolo contendo todas as informações do estudo e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foram submetidos, via Plataforma Brasil, ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do ICF credenciado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde (CNS/MS) para apreciação. O TCLE consiste em um documento contendo uma explanação da natureza e dos objetivos do estudo. O termo, aceito e assinado pelo voluntário antes da admissão, enfatiza que o estudo tem a finalidade de pesquisa e que o voluntário: não pode esperar qualquer efeito terapêutico; terá todos os registros que possam o identificar mantidos em sigilo; é livre para se retirar a qualquer momento do estudo, sem obrigação de fornecer algum motivo e sem que isto cause qualquer prejuízo no seu atendimento junto ao ICF. O estudo somente foi iniciado após avaliação e aprovação pelo CEP, sendo conduzido de acordo com as diretrizes e normas de pesquisa envolvendo seres humanos das Resoluções RE nº 466 de 12 de dezembro de 2012 e RE nº 251 de 07 de agosto de 1997 do Conselho Nacional de Saúde e RE nº 1170 de 19 de abril de 2006 da ANVISA.

Todo o estudo foi delineado de forma a permitir a obtenção dos parâmetros farmacocinéticos livres da interferência de qualquer fator estranho que pudesse

influenciar de forma negativa a comparação dos anticoagulantes. Para isso, as condições dos voluntários e os procedimentos da etapa clínica foram padronizados ao máximo, de modo que o estudo foi do tipo monocêntrico, aberto, prospectivo, com um tratamento, em um período e truncado em 6 horas. Foram selecionados 4 voluntários sadios (02 indivíduos do sexo masculino e 02 indivíduos do sexo feminino), sem restrições quanto ao grupo étnico, com idade de 18 a 50 anos e Índice de Massa Corpórea (IMC) compreendido na faixa de 18,50 a 24,90, podendo variar até 15% quanto ao limite superior (18,50 a 28,63). Os voluntários foram ressarcidos no valor de R\$ 350,00 relativo às despesas e tempo despendido durante o estudo, conforme preconizado pela Resolução RE nº 466 de 12 de dezembro de 2012. Todos os voluntários assistiram a uma palestra explicativa e foram submetidos à avaliação clínica, a qual é composta por 3 etapas: anamnese para avaliação da saúde geral do voluntário e da existência de algum fator que restringisse sua participação no estudo; realização de exames laboratoriais bioquímicos e hematológicos; e avaliação das condições emocionais para participação no estudo. Apenas voluntários considerados “aprovados” na avaliação clínica foram aceitos, sendo submetidos a uma nova avaliação clínica imediatamente antes da internação, além da avaliação clínica da alta, realizada ao final do estudo.

A verificação da ausência de sinais ou sintomas evidentes de doenças cardíacas, hepática, renal, pulmonar, neurológica, gastrointestinal ou hematológica, foi feita através dos exames pré-clínicos: eletrocardiograma; hemograma completo (leucograma, eritrograma); exames de urina e fezes (protoparasitológico); exames sorológicos (hepatite B, hepatite C e HIV 1 e 2); e bioquímica sanguínea (glicose no sangue, proteínas totais, albumina, transaminases, fosfatase alcalina, creatinina, ureia, ácido úrico, bilirrubina total e frações, colesterol e triglicérides), além de β HCG para mulheres, o qual foi repetido no momento da internação por meio de fita reagente com detecção em urina. Após o término do estudo, todos os exames pré-estudo foram repetidos, com exceção dos exames de fezes, hepatites B e C, HIV 1 e 2 e eletrocardiograma. Os voluntários foram avaliados quanto aos seguintes critérios de exclusão:

a) hipersensibilidade conhecida a NAP sódico ou a succinato de SUM ou a outros compostos quimicamente relacionados;

- b) participação em outro estudo dentro dos seis meses que antecederam o início desse estudo;
- c) uso de medicação regular dentro das 2 semanas ou 5 meias-vidas (o que tiver maior duração) que antecederam o início do estudo, sendo permitido apenas o uso de anticoncepcional para mulheres;
- d) histórico de abuso de álcool ou drogas ou ingestão de bebidas alcoólicas nas 24 horas que antecederam o estudo;
- e) fumante inveterado (fuma mais de 5 cigarros por dia) ou uso de tabaco nas 24 horas que antecederam o estudo;
- f) uso de bebidas ou alimentos contendo cafeína e xantinas (chá preto e mate, café, refrigerantes a base de cola, guaraná, alimentos contendo chocolate, etc.) e bebidas energéticas nas 24 horas que antecederam o estudo;
- g) uso de vitaminas ou produtos naturais (incluindo suplementos com gárglicos) nos 07 dias que antecederam o estudo;
- h) consumo, dentro de 30 dias antes do estudo, de drogas indutoras (barbitúricos, carbamazepina, fenitoína, glicocorticóide, omeprazol, etc.) e/ou inibidoras (antidepressivos, cimetidina, diltiazem, macrolídeos, imidazólicos, neurolépticos, verapamil, fluorquinolonas, anti-histamínicos, etc.) do metabolismo hepático, organotóxicas ou que apresentem $T_{1/2}$ longo (maior que 50 h);
- i) uso de IMAO duas semanas antes do estudo;
- j) histórico clinicamente significativo e/ou presença de doença gastrointestinal (diarreia crônica, doença inflamatória do intestino, etc.), sintomas gastrointestinais presentes (diarreia, vômito, etc.), doença hepática ou renal, ou outra condição conhecida que pudesse interferir na absorção, distribuição, metabolismo, ou excreção do medicamento;
- k) doação ou perda de 450 mL ou mais de sangue dentro dos 3 meses que antecederam o estudo;
- l) mulheres em período de amamentação.

Os voluntários foram recebidos na Unidade Clínica do ICF por volta das 19 horas do dia anterior ao início das coletas e receberam o jantar até às 21 horas, permanecendo em jejum até 4 horas após a administração da medicação (7 horas da manhã seguinte), quando receberam o almoço. A ingestão de líquidos foi proibida

durante o período de 7 horas antes da administração dos medicamentos até 2 horas após. Durante esse intervalo a única ingestão de líquidos consistiu em 200 mL de água durante a administração dos medicamentos. A fim de manter a padronização do estudo, a dieta (alimentos e líquidos) foi padronizada para todos os voluntários. Para minimizar a obtenção de amostras de plasma lipêmico não foram incluídos nas refeições alimentos gordurosos ou fritos. A composição do jantar de chegada fornecido até às 21 horas e do almoço fornecido à partir das 11 horas foi: arroz branco; feijão; filé de frango grelhado; moranga ao molho/batata sautê; salada verde e uma fruta (banana ou maçã).

Pela manhã, todos os voluntários receberam, por via oral, dois comprimidos, sendo um comprimido revestido de FLANAX[®] 275 mg (Roche) e um comprimido revestido de Imigran[®] 50 mg (GlaxoSmithKline), contendo NAP sódico e succinato de SUM como princípios ativos, respectivamente. Os voluntários foram orientados a engolir os medicamentos inteiros, sem quebrá-los ou mastigá-los, e a permanecer sentados (posição de 90°) durante o período de 1 hora após a administração dos medicamentos. Os voluntários foram acompanhados pela equipe de enfermagem durante todo o período de confinamento através da aferição constante dos sinais vitais: pressão arterial, frequência cardíaca (medição no pulso) e temperatura corporal.

As coletas foram realizadas por meio de cateter intravenoso heparinizado introduzido em veia superficial do voluntário. Em cada um dos tempos de coleta preconizados (pré-dose e 0h15, 0h30, 1h, 1h30, 2h, 2h30, 3h, 3h30, 4h, 5h e 6h após a administração do medicamento), foram coletadas 2 amostras de 15 mL de sangue em tubos contendo ou heparina sódica ou EDTA K₃ como anticoagulante, totalizando 24 amostras (12 amostras de 15 mL para cada anticoagulante). Após cada coleta, o cateter intravenoso foi lavado com 1 mL de solução de heparina sódica, a qual foi retirada antes da próxima coleta, para evitar a contaminação dos tubos de EDTA ou aumento da concentração de heparina nas amostras coletadas em tubos contendo esse anticoagulante.

Logo após a coleta, os tubos, devidamente identificados com os códigos dos princípios ativos, número do voluntário, tempo de coleta e anticoagulante, foram centrifugados a 1986 g por 5 minutos a 4 °C e o plasma separado em tubos criogênicos, os quais foram transferidos para freezer a -70 °C. Todas as amostras foram enviadas para o Laboratório de Controle de Qualidade Bioanalítico da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) via transporte aéreo, em caixa de isopor contendo gelo seco em quantidade suficiente para manter as amostras congeladas a -70 °C durante todo o transporte.

4.2.4.2 Etapa analítica

A quantificação simultânea de NAP sódico e de succinato de SUM nas amostras dos voluntários foi realizada através do mesmo método bioanalítico desenvolvido e validado em uma única sequência analítica. As concentrações dos analitos foram calculadas três vezes, a partir de cada uma das três curvas de calibração inclusas na sequência analítica e preparadas em plasma contendo heparina, EDTA ou CPDA. Cada curva consistiu de duas amostras Branco, duas amostras Zero e duas amostras de cada um dos níveis de concentração dos analitos. As respostas obtidas para as amostras Branco e Zero não foram utilizadas na equação da curva de calibração e a concentração de cada ponto da curva foi calculada considerando a razão entre a área dos analitos e a área dos PIs.

Para aprovação da corrida analítica, foram considerados os desvios das concentrações calculadas para cada ponto da curva de calibração em relação às concentrações nominais. O desvio máximo permitido foi de 20% para o LIQ e de 15% para os demais níveis de concentração. Qualquer ponto com desvio acima do valor preconizado foi excluído, não sendo utilizado para o cálculo da equação da reta e, nenhum ponto aprovado foi excluído. A curva de calibração foi considerada aprovada quando teve 75% dos pontos (10 pontos) com desvios inferiores aos descritos, além de no mínimo seis níveis de concentração, incluindo o LIQ e o LSQ, aprovados conforme os critérios de aceitação preconizados. Além disso, foram admitidos um máximo de 33% do total de CQs e um máximo de 50% dos CQs de cada nível de concentração com desvios superiores a 15%.

As amostras dos voluntários foram analisadas através da seguinte sequência analítica:

- a) Curva de calibração em plasma com HEPA;
- b) Amostras de CQ (CQB, CQM e CQA), em plasma com HEPA, distribuídas entre as amostras em estudo de forma balanceada e em igual número de replicatas de cada nível de CQ;
- c) Amostras de plasma com HEPA dos 4 voluntários do estudo;
- d) Curva de calibração em plasma com EDTA;
- e) Amostras de CQ (CQB, CQM e CQA), em plasma com EDTA, distribuídas entre as amostras em estudo de forma balanceada e em igual número de replicatas de cada nível de CQ;
- f) Amostras de plasma com EDTA dos 4 voluntários do estudo;
- g) Curva de calibração em plasma com CPDA;
- h) Amostras de CQ (CQB, CQM e CQA), em plasma com CPDA, distribuídas entre as amostras em estudo de forma balanceada e em igual número de replicatas de cada nível de CQ.

4.2.4.3 Etapa estatística

A etapa estatística foi conduzida tomando como base as Resoluções RE nº 898 de 29 de maio de 2003 e RE nº 1170 de 19 de abril de 2006. Essa etapa incluiu a escolha de um delineamento experimental e de um tamanho amostral de modo a permitir a comparação estatística entre os anticoagulantes e a avaliação farmacocinética simultânea da biodisponibilidade de NAP sódico e de succinato de SUM.

Após cálculo das concentrações de NAP e SUM no plasma com HEPA ou EDTA a partir das três curvas de calibração (plasma com HEPA, EDTA ou CPDA), foram elaboradas curvas de concentração plasmática *versus* tempo para ambos os fármacos. Os parâmetros farmacocinéticos $C_{máx}$, $T_{máx}$ e área sob a curva do tempo zero ao último tempo de coleta quantificado (ASC_{0-t}) foram avaliados para NAP e SUM. Como SUM possui $T_{1/2}$ relativamente curta, foi possível também calcular a K_{EI} ,

a $ASC_{0-\infty}$ e a $T_{1/2}$ com o cronograma de coleta proposto, uma vez que esse abrangeu a faixa de no mínimo 3 a 5 $T_{1/2}$. A avaliação da significância do efeito de cálculo dos parâmetros farmacocinéticos de NAP e SUM nas amostras de voluntários a partir das diferentes curvas de calibração testadas foi feita através da aplicação da técnica de Análise de Variância (ANOVA) com um α de 0,05. Todos os cálculos e análises estatísticas foram realizados através do software Excel[®] 2010.

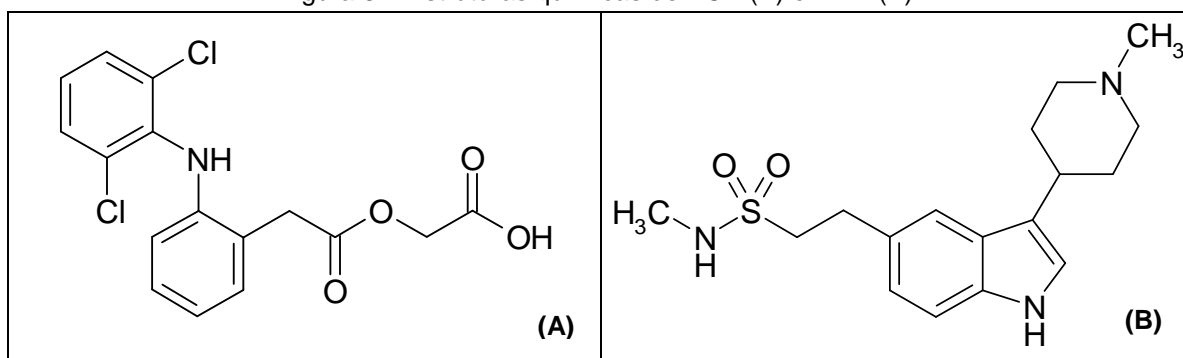
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento de método bioanalítico para quantificação simultânea de naproxeno sódico e succinato de sumatriptano em plasma humano por CLAE-EM/EM

O desenvolvimento do método bioanalítico é a etapa crucial para a obtenção de bons resultados na validação e na aplicação do método. Estudos de farmacocinética e de biodisponibilidade/bioequivalência exigem métodos bioanalíticos de elevada qualidade, principalmente por envolver voluntários humanos, os quais não podem ser submetidos ao estudo sem a certeza de que seus sacrifícios resultarão em um benefício para a sociedade. Essa certeza só é garantida se o método bioanalítico tiver sido desenvolvido previamente, de forma a assegurar que os fluídos biológicos obtidos dos voluntários serão analisados com a confiabilidade necessária.

Pelo fato de NAP e SUM apresentarem estruturas e propriedades físico-químicas muito diferentes e, como consequência, comportamentos químicos distintos durante as etapas de preparo e análise das amostras, optou-se por trabalhar com um PI para cada analito. Dentre os fármacos analisados como candidatos a PI, aceclofenaco (ACE) e naratriptano (NAR) possuem características físico-químicas mais semelhantes à NAP e SUM, respectivamente. ACE (ácido oxiacético 2-[2-[2-[(2,6-dicloropenil)amino]fenil]acetil]) possui pKa de 4,7 e $\log P_{\text{octanol/água}}$ de 4,51, enquanto NAR (N-Metil-3-(1-metil-4-piperidinil)-1-H-indol-5-etanosulfonamida) possui dois valores de pKa: pKa₁ de 9,1 e pKa₂ de 11,55 e $\log P_{\text{octanol/água}}$ de 1,97 (KANG; KIMB, 2008; OJHA; RATHOD; PADH, 2009; RHIM *et al.*, 2008; SIGMA-ALDRICH, 2012; USP, 2009). Ibuprofeno, ácido mefenâmico e diclofenaco foram avaliados como candidatos a PI de NAP, mas não foram adequados, conforme descrito nos itens 5.1.2 e 5.1.3. Desse modo, optou-se por utilizar ACE e NAR como PIs de NAP e SUM, respectivamente. As estruturas químicas dos PIs estão representadas na Figura 3.

Figura 3 – Estruturas químicas de ACE (A) e NAR (B).



5.1.1 Determinação dos parâmetros espectrométricos

Como NAP e SUM tem estruturas e comportamento de ionização muito diferentes, foram avaliados os modos IES(+) e IES(-). NAP foi ionizado no modo negativo, devido à presença do grupo de ácido carboxílico, e SUM no modo positivo, por possuir duas aminas secundárias e uma terciária em sua estrutura, suscetíveis a protonação. Entretanto, como durante a infusão direta das soluções dos fármacos no espectrômetro de massas ambos foram facilmente protonados no modo positivo, fornecendo íons com intensidade adequada, a ionização por IES(+) foi escolhida para quantificação simultânea de NAP e SUM. O espectrômetro de massas foi operado no modo MRM. Alguns parâmetros são definidos para o método de análise, sendo constantes para todos fármacos. Os parâmetros espectrométricos gerais e específicos para cada fármaco e seus respectivos valores estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Parâmetros espectrométricos para quantificação simultânea de NAP e SUM.

Parâmetros comuns a todos os fármacos					
Parâmetros da fonte IES (+)		Parâmetros do analisador de massas			
Parâmetro	Valor	Parâmetro	Valor		
Capilar	2,75 kV	Resolução de massas LM 1	10,0		
Extrator	3 V	Resolução de massas HM 1	10,0		
<i>RF Lens</i>	0,5 V	<i>Ion Energy 1</i>	0,5		
Temperatura da fonte	100 °C	Entrada	10		
Temperatura de dessolvatação	350 °C	Saída	10,0		
Fluxo do gás de dessolvatação	500 L/h	Resolução de massas LM 2	7,5		
		Resolução de massas HM 2	7,5		
		<i>Ion Energy 2</i>	1,0		
		Multiplicador de sinal	650		
Parâmetros específicos para cada fármaco					
Fármaco	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Dwell time (s)	Cone (V)	Energia de colisão (eV)
Sumatriptano	296,70	157,30	0,500	25,00	20,00
Naproxeno	231,67	185,07	0,500	25,00	15,00
Naratriptano	336,80	97,94	0,500	30,00	30,00
Aceclofenaco	354,80	215,00	0,500	30,00	25,00

As transições de massas com maiores intensidades foram obtidas a partir da infusão de NAP, SUM, NAR e ACE isolados em solução de metanol:água (1:1) a 500 ng/mL, com fluxo de 1200 µL/h. É possível verificar a presença de adutos de sódio ($[M+Na]^+$) no espectro de varredura de massas de NAP e SUM com razão m/z de 253,68 e 318,67, respectivamente, sendo o aduto de sódio para NAP bastante intenso, além de aduto de potássio ($[M+K]^+$ m/z 334,70) no espectro de SUM. Entretanto, visando favorecer a precisão e a exatidão do método, foram escolhidos como íons precursores apenas íons protonados ($[M+H]^+$), pois a intensidade de formação de um aduto pode não ser constante durante toda a validação e aplicação do método, em decorrência de flutuações na concentração do íon formador do aduto, o qual pode ser considerado um contaminante do método, já que não é um componente fixo das soluções utilizadas na extração e da FM. Os espectros de varredura de massas e de fragmentação para cada analito ou PI estão representados nas Figuras 4 a 7.

Figura 4 – Espectros IES(+) de NAP. (A) Espectro de varredura com íon precursor m/z 231,67. (B) Espectro de fragmentação com o íon produto m/z 185,07.

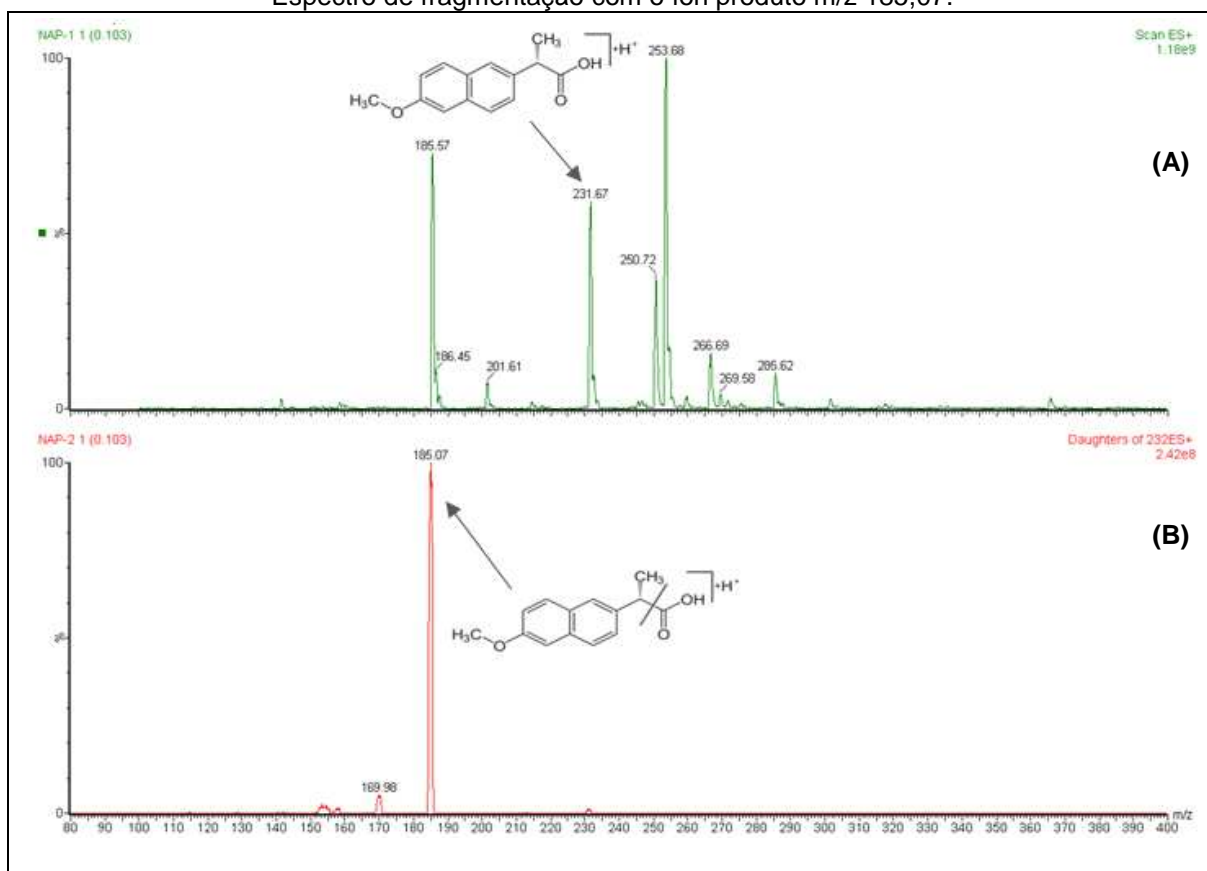


Figura 5 – Espectros IES(+) de SUM. (A) Espectro de varredura com íon precursor m/z 296,70. (B) Espectro de fragmentação com o íon produto m/z 157,30.

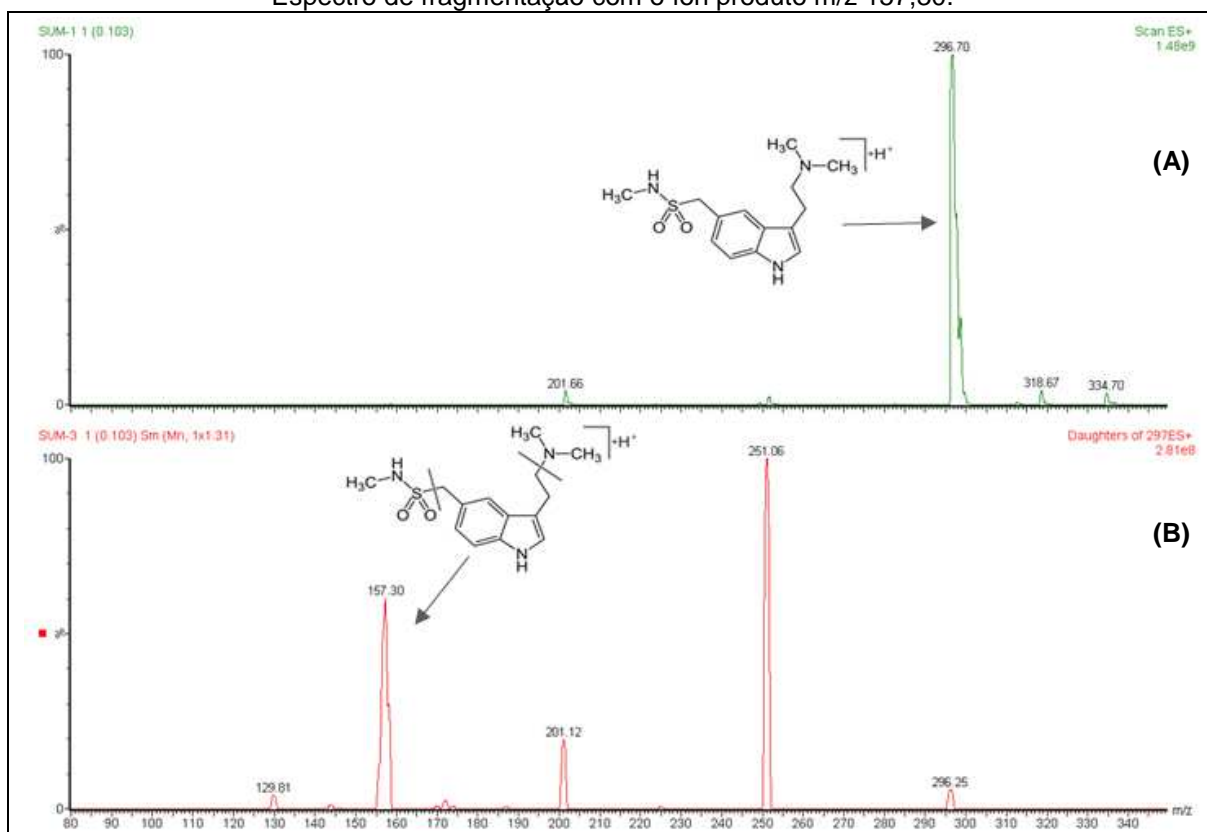


Figura 6 – Espectros IES(+) de ACE. (A) Espectro de varredura com íon precursor m/z 354,80. (B) Espectro de fragmentação com o íon produto m/z 215,00.

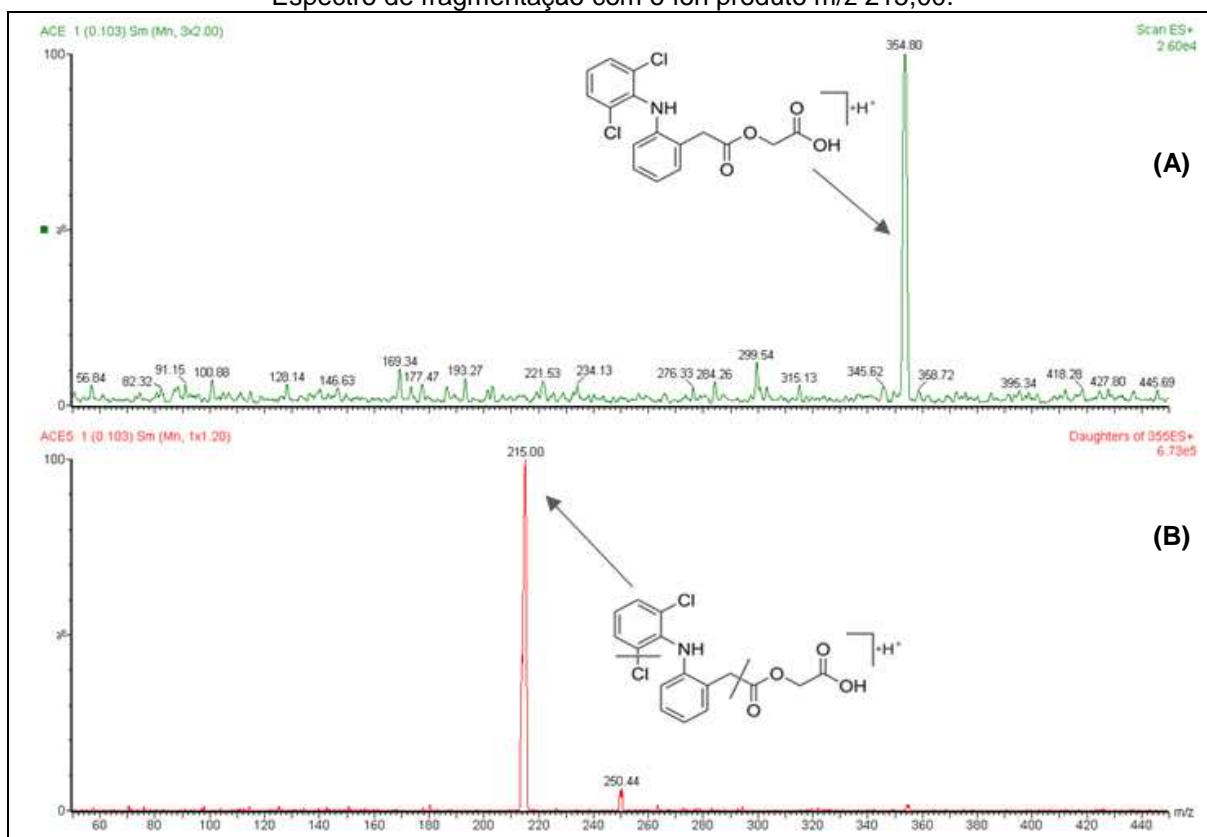
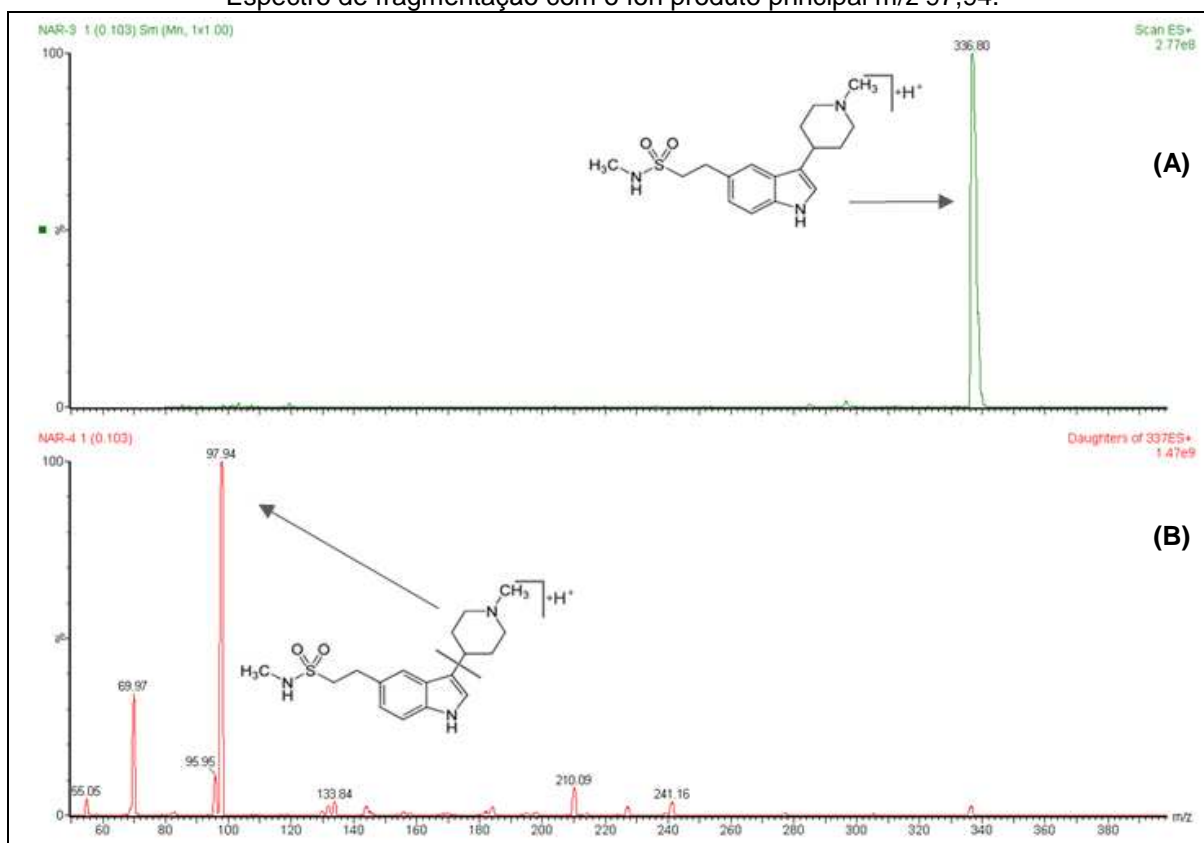


Figura 7 – Espectros IES(+) de NAR. (A) Espectro de varredura com íon precursor m/z 336,80 e (B) Espectro de fragmentação com o íon produto principal m/z 97,94.



5.1.2 Determinação dos parâmetros cromatográficos

Considerando, principalmente, a ampla diferença de pK_a entre os analitos, foram realizados testes para ajuste do tipo e da proporção dos componentes da FM em coluna cromatográfica C_{18} (50 mm \times 4,6 mm, 5 μ m), mantida a 30 $^{\circ}C$, com fluxo de 1 mL/min. Como o fluxo de análise utilizado na CLAE é consideravelmente superior ao fluxo máximo de entrada no espectrômetro de massas, sem que haja prejuízo ao seu funcionamento, foi utilizado um divisor de fluxo (*split*), de forma que 90% do solvente fosse descartado e apenas 10% introduzido no espectrômetro de massas. O amostrador automático foi mantido a 5 ± 3 $^{\circ}C$, e o volume de injeção foi de 20 μ L.

Os principais objetivos da otimização do tipo e da proporção dos componentes da FM em métodos por CLAE-EM/EM são a obtenção de sinais analíticos de alta intensidade pelo detector e de um tempo de corrida curto, além da minimização do efeito matriz. O ajuste da força iônica da FM, com a variação do tipo dos componentes, foi realizado de modo a favorecer a ionização dos analitos e PIs e

consequentemente aumentar a intensidade dos sinais. Já a proporção dos solventes foi ajustada visando, principalmente, adequar os TR dos analitos e PIs e reduzir a ocorrência de efeito matriz, evitando a coeluição de interferentes da matriz com os fármacos. Como na EM cada fármaco é detectado por meio de uma transição distinta, não é necessário obter resolução de linha base entre os picos no cromatograma, o que também favorece a aquisição em tempos reduzidos. Além disso, a ocorrência de TRs iguais ou muito próximos para um analito e seu PI, pode contribuir na redução dos valores de FMN, pois caso haja interferentes causadores de efeito matriz coelindo com o analito e seu PI, provavelmente, ambos sofrerão o efeito com a mesma intensidade (HOFFMANN; STROOBANT, 2007; NIESSEN, 2006).

Para garantir a ionização dos fármacos no modo IES(+), a FM inicialmente testada foi tampão acetato de amônio 2 mM com ácido fórmico a 0,025% (pH 3,50) e metanol. O TR de SUM foi consideravelmente baixo (0,90 min), uma vez que este analito é uma molécula altamente polar ($\log P_{\text{octanol/água}}$ de 0,65) e, por ser uma base nitrogenada, se encontra ionizada na FM ácida empregada. Na tentativa de aumentar o TR de SUM avaliou-se a utilização de FM com água ou tampão acetato de amônio 2 mM. Apesar do aumento no TR de SUM na ausência de ácido, o pico de NAP ficou assimétrico, com cauda ou duplicação, em decorrência do caráter ácido desse fármaco, sendo necessário acidificar a FM para garantir a simetria do pico. Metanol e acetonitrila foram avaliados como solventes orgânicos e a utilização de metanol proporcionou melhor seletividade e maior intensidade dos picos. Considerando que o volume morto da análise para a coluna utilizada é de 0,48 segundos e que a maior parte dos interferentes polares causadores de efeito matriz oriundos do plasma são eluídos no início da corrida cromatográfica, saindo no tempo equivalente ao volume morto, a FM otimizada foi tampão acetato de amônio 2 mM com ácido fórmico 0,025% e metanol (38:62, v/v), pH 4,20 (TAYLOR, 2005; ZHOU *et al.*, 2005).

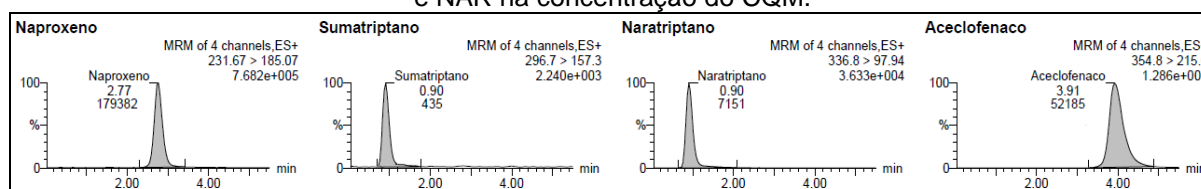
Os candidatos a PI ibuprofeno e ácido mefenâmico apresentaram TRs muito maiores do que os obtidos para os analitos, o que implicaria em um tempo de corrida excessivamente longo. Os TRs e o tempo total de corrida estão descritos na Tabela

6 e os cromatogramas obtidos para NAP, SUM, ACE e NAR na concentração do CQM estão representados na Figura 8.

Tabela 6 – TRs para NAP, SUM, ACE e NAR e tempo total de corrida obtidos por CLAE-EM/EM com ionização por IES(+).

Fármaco	Tempo (min)
NAP	2,77
SUM	0,90
ACE	3,91
NAR	0,90
Duração da corrida	5,50

Figura 8 – Cromatogramas obtidos por CLAE-EM/EM com ionização por IES(+) para NAP, SUM, ACE e NAR na concentração do CQM.



Após definição dos parâmetros cromatográficos, foi avaliada a linearidade, precisão e exatidão das faixas de trabalho propostas para avaliação da farmacocinética de NAP e SUM após administração simultânea de dose oral única de 50 mg de succinato de SUM e 275 mg de NAP sódico em voluntários sadios. Considerando, com base na literatura consultada, $C_{máx}$ entre aproximadamente 60000,00 a 67000,00 ng/mL e 23,00 a 27,00 ng/mL para NAP e SUM, respectivamente, as faixas avaliadas durante o desenvolvimento foram 2500,00 a 130000,00 ng/mL para NAP e 1,00 a 50,00 ng/mL para SUM. As concentrações dos CQs, para essas faixas de trabalho testadas, foram 7500,00 e 3,00 ng/mL para CQB, 35000,00 e 15,00 ng/mL para CQM, 110000,00 e 40,00 ng/mL para CQA e 220000,00 e 80,00 ng/mL para CQD de NAP e SUM, respectivamente.

As faixas de trabalho foram lineares, precisas e exatas nos testes prévios à validação do método. As concentrações em plasma de cada nível da curva de calibração e dos CQ, bem como a proposta de diluição para adição de padrão de NAP e SUM ao plasma branco estão descritas na Tabela 7. As concentrações das soluções dos PIs foram definidas de modo a obtenção de concentrações de ACE e NAR iguais às concentrações de NAP e SUM no CQM. Considerando que foram

utilizados 250 μL de plasma para a extração e adicionados 25 μL de cada solução de PI, as soluções de trabalho de ACE e NAR (SPIs) foram preparadas com concentração dez vezes maior que o CQM. As concentrações das soluções de ACE e NAR, bem como a proposta de diluição estão descritas nas Tabelas 8 e 9. As soluções foram preparadas utilizando metanol como solvente.

Tabela 7 – Proposta de diluição das soluções estoque e em plasma de NAP e SUM utilizada no desenvolvimento, validação e aplicação do método bioanalítico.

Solução Estoque de NAP								
Massa Pesada (mg)	Fator massa ¹		Fator pureza ²		Concentração (ng/mL)	Volume total (mL)		
25,00	0,9128		0,9990		4559343,48	5,00		
Solução Estoque de SUM								
Massa Pesada (mg)	Fator massa ¹		Fator pureza ²		Concentração (ng/mL)	Volume total (mL)		
1,70	0,7146		0,9920		241028,48	5,00		
Soluções de NAP e SUM em plasma								
Nível	NAP			SUM			TOTAL	
	Concentração em plasma (ng/mL)	Volume de solução (mL)	Solução utilizada (ng/mL)	Concentração em plasma (ng/mL)	Volume de solução (mL)	Solução utilizada (ng/mL)	Volume de plasma (mL)	Volume total (mL)
SI-0 ³	-	-	-	25000,00	1,037	241028,48	-	10,000
SI-1 ³	500000,00	1,645	4559343,48	250,00	0,150	25000,00	13,205	15,000
SI-2 ³	50000,00	0,500	500000,00	25,00	0,500	250,00	4,000	5,000
PA01	2500,00	0,500	50000,00	1,00	0,400	25,00	9,100	10,000
PA02	5000,00	1,000	50000,00	2,50	1,000	25,00	8,000	10,000
PA03	10000,00	0,200	500000,00	5,00	0,200	250,00	9,600	10,000
PA04	25000,00	0,500	500000,00	10,00	0,400	250,00	9,100	10,000
PA05	50000,00	1,000	500000,00	20,00	0,800	250,00	8,200	10,000
PA06	90000,00	1,800	500000,00	35,00	1,400	250,00	6,800	10,000
PA07	130000,00	2,600	500000,00	50,00	2,000	250,00	5,400	10,000
CQB	7500,00	1,500	50000,00	3,00	1,200	25,00	7,300	10,000
CQM	35000,00	0,700	500000,00	15,00	0,600	250,00	8,700	10,000
CQA	110000,00	2,200	500000,00	40,00	1,600	250,00	6,200	10,000
CQD	220000,00	4,400	500000,00	80,00	3,200	250,00	2,400	10,000

¹ Fator massa: Razão $MM_{NAP\text{ sódico}}/MM_{NAP}$ OU Razão $MM_{Succinato\ de\ SUM}/MM_{SUM}$

² Fator pureza: Razão $Massa_{NAP\text{ sódico}}/1$ unidade de massa do padrão OU Razão $Massa_{Succinato\ de\ SUM}/1$ unidade de massa do padrão

³ SI: Soluções intermediárias

Tabela 8 – Proposta de diluição das soluções estoque e de trabalho de NAR utilizada no desenvolvimento, validação e aplicação do método bioanalítico.

Solução Estoque de NAR				
Massa Pesada (mg)	Fator massa¹	Fator pureza²	Concentração (ng/mL)	Volume total (mL)
1,70	0,9020	0,9960	152721,69	10,00

Soluções de NAR				
Nível	Concentração em plasma (ng/mL)	Volume de solução (mL)	Solução utilizada (ng/mL)	Volume total (mL)
SI-1³	1500,00	0,098	152721,69	10,000
SPI	150,00	1,000	1500,00	10,000

¹ Fator massa: Razão $MM_{\text{Cloridrato de NAR}}/MM_{\text{NAR}}$.

² Fator pureza: Razão $Massa_{\text{Cloridrato de NAR}}/1$ unidade de massa do padrão.

³ SI: Solução intermediária.

Tabela 9 – Proposta de diluição da solução estoque/trabalho de ACE utilizada no desenvolvimento, validação e aplicação do método bioanalítico.

Solução Estoque/trabalho de ACE			
Massa Pesada (mg)	Fator pureza²	Concentração (ng/mL)	Volume total (mL)
3,55	0,9922	352231,00	10,00

² Fator pureza: Razão $Massa_{\text{Aceclofenaco}}/1$ unidade de massa do padrão.

5.1.3 Determinação dos parâmetros de preparo de amostra

A escolha da técnica de extração não é limitada apenas à avaliação da capacidade de fornecer um extrato limpo, mas deve também considerar o procedimento de separação cromatográfica e de detecção do método, visando a obtenção de seletividade adequada, altas taxas de recuperação e baixos índices de efeito matriz (TAYLOR, 2005).

A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método bioanalítico. Embora a avaliação da recuperação dos analitos e PIs na extração não esteja preconizada na Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012, esse ensaio foi realizado por fornecer um parecer importante sobre a eficácia do procedimento de extração desenvolvido. Esse ensaio faz parte do escopo de validação de métodos bioanalíticos proposto pelo Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos do FDA (*Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation*, 2013). Alguns guias de validação de métodos analíticos, como o Guia de Validação de Métodos de Ensaio Químicos do INMETRO de 2011, utilizam o termo recuperação como sinônimo de

exatidão. Entretanto, para métodos bioanalíticos essa equivalência não é usual, em decorrência da diferença entre o objetivo dos dois ensaios: a recuperação é um parâmetro para avaliação da técnica de extração e a exatidão para avaliação do método bioanalítico.

Por ser mais simples e rápida, a primeira técnica de extração testada foi a EPT, utilizando como solventes precipitantes, metanol, acetonitrila e acetona. A adição de ácido ou base a 0,5 ou 1,0%, ou o uso de ácido tricloroacético a 60% como agente precipitante levou à obtenção de extratos muito turvos e amarelados, inviabilizando a injeção no sistema CLAE-EM/EM. Acetonitrila forneceu resultados um pouco superiores aos observados nos testes com acetona e metanol, sendo a melhor opção para utilização da técnica de EPT na comparação com as outras técnicas. Visando avaliar o volume ideal de solvente precipitante, e assegurar a ausência de saturação da fase líquida, foram testados três procedimentos, com a adição de 250, 500 ou 750 μL de acetonitrila. O procedimento padrão, com volume de solvente equivalente a duas vezes o volume de plasma (250 μL), foi a melhor combinação entre diluição mínima da amostra e maior taxa de extração. Entretanto, ainda na melhor condição obtida na EPT, essa técnica não foi eficaz, fornecendo baixas taxas de recuperação e efeito matriz muito intenso para SUM e NAR (Tabelas 10 e 11). Por possuir TRs baixos, SUM e NAR são mais susceptíveis ao efeito matriz, já que a maior parte dos interferentes polares causadores de efeito matriz oriundos do plasma eluem no início da corrida cromatográfica (TAYLOR, 2005).

Considerando que a ELL é uma técnica capaz de fornecer amostras mais límpidas que a EPT, reduzindo a probabilidade de ocorrência de efeito matriz, foram avaliados alguns procedimentos considerando variações na solução extratora e no aditivo adicionado para variar o pH do meio (hidróxido de amônio, ácido fosfórico e ácido fórmico) ou a solubilidade dos analitos na fase aquosa (sulfato de amônio). O efeito *salting out* é provocado pela adição de sal à matriz, e consiste na redução da solubilidade dos fármacos polares na fase aquosa, favorecendo a transferência para a fase orgânica e aumentando a recuperação da extração (LEVERENCE *et al.*, 2007; SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). As condições de tempo, velocidade e

temperatura envolvidas nas etapas de centrifugação, agitação e evaporação também foram ajustadas para otimização do procedimento.

Adições de bases ou ácidos à solução extratora não foram eficazes para a obtenção de taxas de recuperação razoáveis para NAP e SUM, em decorrência da diferença de pKa dos fármacos, o que leva à necessidade de alcalinizar o meio para extração de SUM, uma base nitrogenada, e acidificar para extração do ácido orgânico NAP (PATEL *et al.*, 2012). Dentre as soluções de solventes orgânicos avaliadas, a que apresentou melhor opção foi a mistura acetato de etila:diclorometano:MTBE (4:3:3). Entretanto, embora a porcentagem de recuperação de SUM tenha sido elevada (75%), NAP praticamente não foi extraído com a utilização dessa solução (5%). Diante da obtenção de baixas taxas de recuperação de NAP, e da impossibilidade de acidificar o meio, testou-se a viabilidade da aplicação do efeito *salting out* com a utilização de 25 µL de solução saturada de sulfato de amônio. Essa condição forneceu melhores taxas de recuperação e de efeito matriz (Tabelas 10 e 11), sendo a melhor opção para extração simultânea de SUM e NAP em plasma humano por ELL.

Almejando alcançar a condição de extração ideal, com taxas de recuperação próximas a 100%, a EFS também foi avaliada. Como esperado, em decorrência do caráter ácido de NAP e ACE, e básico de SUM e NAR, os testes II e III, em que foram utilizadas soluções extratoras ácidas ou básicas, não foram eficazes, resultando em baixas taxas de recuperação. Embora o teste IV tenha fornecido resultados razoáveis, a melhor condição foi obtida com o teste I, em que utilizou-se solução de lavagem neutra e solução extratora levemente ácida. Após definição da melhor condição para EFS, foram testados dois procedimentos, com uma ou duas etapas de extração utilizando 500 µL de solução de metanol:acetonitrila:água:ácido acético (60:30:10:0,1) em cada etapa. O procedimento padrão, com volume de solução extratora equivalente a duas vezes o volume de plasma (250 µL), foi a melhor combinação entre diluição mínima da amostra e maior extração. Mesmo na melhor condição obtida na EFS, as taxas de recuperação para analitos e PIs foram inferiores àsquelas obtidas para a ELL (Tabela 10). Além disso, os valores de efeito

matriz para cada analito e seu PI não foram próximos entre si, reduzindo a eficácia do uso do PI na reprodução de possíveis perdas durante a análise (Tabela 11).

Embora o método tenha sido igualmente seletivo com as melhores condições das três técnicas de extração, as taxas de recuperação e de efeito matriz obtidas para EFS e EPT foram piores que as obtidas para a ELL. Considerando que valores de recuperação próximos a 100% e de efeito matriz próximos de zero são desejáveis, mas não obrigatórios, desde que o método tenha precisão e exatidão adequadas, e que alterações na concentração dos constituintes da FM não reduziram o efeito matriz observado, a ELL foi definida como a técnica de extração do método bioanalítico para quantificação simultânea de NAP e SUM em plasma humano. Além disso, a obtenção de melhores resultados para a ELL frente à EFS é extremamente interessante, já que o custo da ELL é muito inferior. O seguinte procedimento foi preconizado:

- a) adição de 250 μL de plasma a um tubo de 10,0 x 1,0 cm;
- b) adição de 25 μL de solução de ACE;
- c) adição de 25 μL de solução de NAR;
- d) adição de 25 μL de solução saturada de sulfato de amônio;
- e) agitação em agitador tipo vórtex por 15 segundos;
- f) adição de 2 mL de solução de acetato de etila:diclorometano:MTBE (4:3:3);
- g) agitação em agitador tipo vórtex por 60 segundos;
- h) centrifugação a 1986 g por 5 minutos a 5 $^{\circ}\text{C}$;
- i) transferência de 1600 μL da fase orgânica (superior) para tubo de 12,5 x 1,5 cm;
- j) evaporação em banho a 60 $^{\circ}\text{C}$ sob corrente de ar seco;
- k) adição de 200 μL de FM ao resíduo seco;
- l) agitação em agitador tipo vórtex por 30 segundos;
- m) transferência de 200 μL *vial* com *insert*.

Dentre os PI avaliados, diclofenaco apresentou efeito matriz significativo na condição de extração otimizada. As taxas de recuperação e de efeito matriz obtidas nas melhores condições das três técnicas de extração para NAP, SUM, ACE e NAR nas concentrações do CQB e CQA estão descritas nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10 – Taxas de recuperação obtidas nas melhores condições das três técnicas de extração para NAP, SUM, ACE e NAR nas concentrações do CQB e CQA.

Recuperação (%)						
Nível	EPT		EFS		ELL	
	NAP	ACE	NAP	ACE	NAP	ACE
CQB	22,75	27,62	4,13	9,75	15,86	13,77
CQA	30,65	32,42	11,62	14,26	33,30	19,15
Nível	EPT		EFS		ELL	
	SUM	NAR	SUM	NAR	SUM	NAR
CQB	5,13	5,10	35,47	23,30	40,96	64,83
CQA	7,99	6,97	42,84	32,50	58,62	86,48

Tabela 11 – Taxas de efeito matriz obtidas nas melhores condições das três técnicas de extração para NAP, SUM, ACE e NAR nas concentrações do CQB e CQA.

Efeito matriz (%)						
Nível	EPT		EFS		ELL	
	NAP	ACE	NAP	ACE	NAP	ACE
CQB	-8,46	2,82	-10,09	-6,90	-9,29	-7,55
CQA	3,00	-6,99	8,22	-9,51	-0,01	2,91
Nível	EPT		EFS		ELL	
	SUM	NAR	SUM	NAR	SUM	NAR
CQB	-67,72	-68,84	-13,33	-26,76	-20,13	-20,23
CQA	-60,63	-67,86	-4,64	-22,39	-5,85	-14,79

5.2 Avaliação da influência de HEPA, EDTA e CPDA sobre a seletividade do método bioanalítico desenvolvido

Embora cada tubo ou bolsa de coleta contenha um volume de solução de anticoagulante estabelecido para a capacidade do recipiente, o volume de sangue coletado varia entre cada amostra, sendo, às vezes, muito inferior ao volume teórico. Essa variação é normal e, em alguns casos, é agravada por perda do acesso venoso durante a coleta, resultando na obtenção de um baixo volume de sangue e, conseqüentemente, em um plasma com alta concentração do anticoagulante.

A avaliação visual dos cromatogramas obtidos a partir de amostras de HEPA, EDTA e CPDA em FM permite verificar a ausência de zonas de indução ou supressão da linha de base nos TRs dos analitos e PIs. No canal de transição de massas de NAP há uma zona de supressão intensa no início do cromatograma, variando de 0,6 a 1,8

minutos. Entretanto, esse efeito não é impactante no método por não estar próximo do TR de NAP ($2,77 \pm 0,05$ minutos). Como exemplos, os cromatogramas obtidos a partir de amostras de HEPA, EDTA e CPDA em FM na concentração 4CN estão representados na Figura 9. As áreas médias dos vales obtidas no canal de transição de massas de NAP para amostras de HEPA, EDTA e CPDA em FM, nas três concentrações analisadas estão descritas na Tabela 12. Através da comparação das áreas obtidas é possível perceber que a supressão é mais intensa nas amostras de EDTA e CPDA que nas amostras de HEPA. Além disso, o efeito supressor é dependente da concentração do anticoagulante, embora a variação não seja proporcional.

Figura 9 – Cromatogramas obtidos a partir de amostras de HEPA (A), EDTA (B) e CPDA (C) em FM na concentração 4CN.

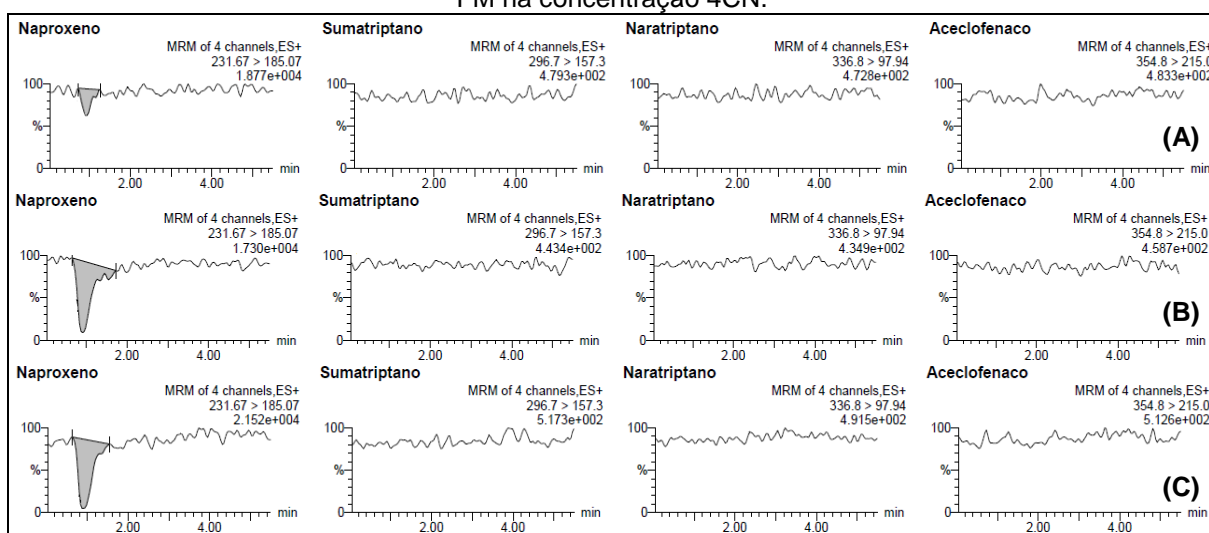


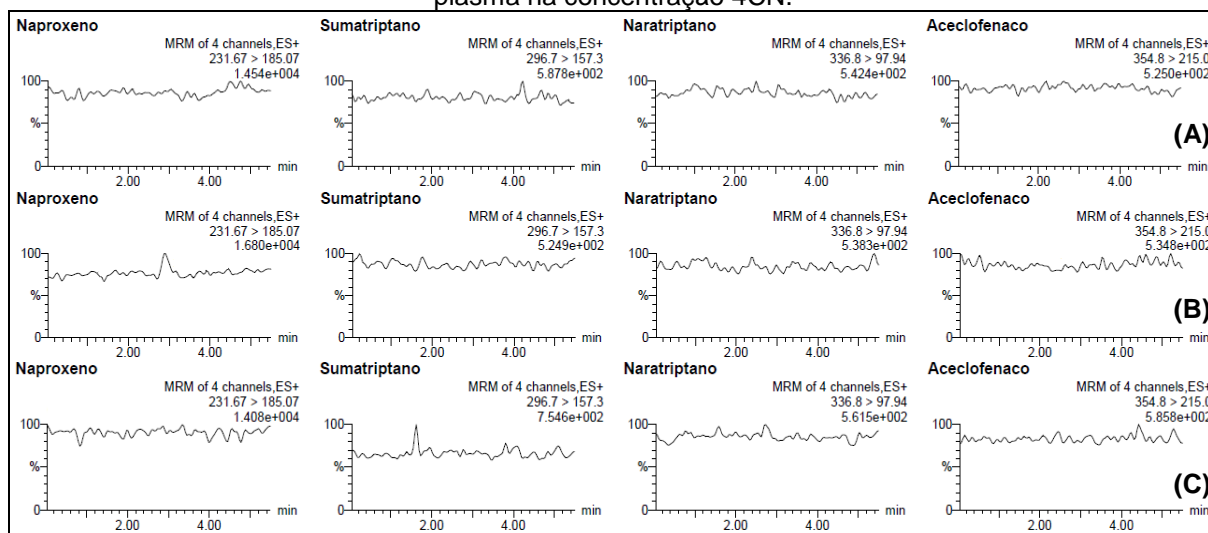
Tabela 12 – Áreas médias dos vales obtidas no canal de transição de massas de NAP para amostras de HEPA, EDTA e CPDA em FM, nas três concentrações analisadas.

Concentração	Áreas médias dos vales (m^2)		
	HEPA	EDTA	CPDA
1CN	-977	-3770	-4047
2CN	-1538	-5356	-4980
4CN	-1691	-5934	-6855

Com a análise visual dos cromatogramas obtidos a partir de amostras de HEPA, EDTA e CPDA em plasma, submetidas ao processo de extração, não há a zona de supressão da linha de base observada no canal de transição de massas de NAP nos cromatogramas obtidos a partir de amostras de HEPA, EDTA e CPDA em FM, indicando que os agentes supressores de sinal não são extraídos com a técnica

desenvolvida. Como exemplos, os cromatogramas obtidos a partir de amostras de HEPA, EDTA e CPDA em plasma na concentração 4CN estão representados na Figura 10.

Figura 10 – Cromatogramas obtidos a partir de amostras de HEPA (A), EDTA (B) e CPDA (C) em plasma na concentração 4CN.



5.3 Validação de método bioanalítico para quantificação simultânea de naproxeno sódico e succinato de sumatriptano em plasma humano com HEPA, EDTA ou CPDA por CLAE-EM/EM

Após o desenvolvimento do método bioanalítico para quantificação simultânea de NAP e SUM em plasma humano por CLAE-EM/EM, foram realizadas três validações completas com o mesmo método bioanalítico, mas alterando o anticoagulante utilizado para a obtenção do plasma, HEPA, EDTA ou CPDA. Os resultados obtidos para as três validações, e apresentados nos itens 5.3.1 a 5.3.7, estão de acordo com o preconizado pela Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 da ANVISA. Embora as validações tenham sido realizadas separadamente, os resultados de cada ensaio estão descritos juntos para facilitar a comparação dos anticoagulantes.

5.3.1 Seletividade

A seletividade consiste na capacidade do método bioanalítico de diferenciar e quantificar analitos e PIs na presença de interferentes, os quais podem ser componentes da matriz biológica, metabólitos, produtos de degradação, impurezas,

dentre outros. A utilização de um método bioanalítico não seletivo pode levar a obtenção de concentrações maiores do que os valores reais, afetando a precisão e exatidão do método, além de comprometer seriamente a veracidade das conclusões obtidas a partir da análise de amostras de voluntários.

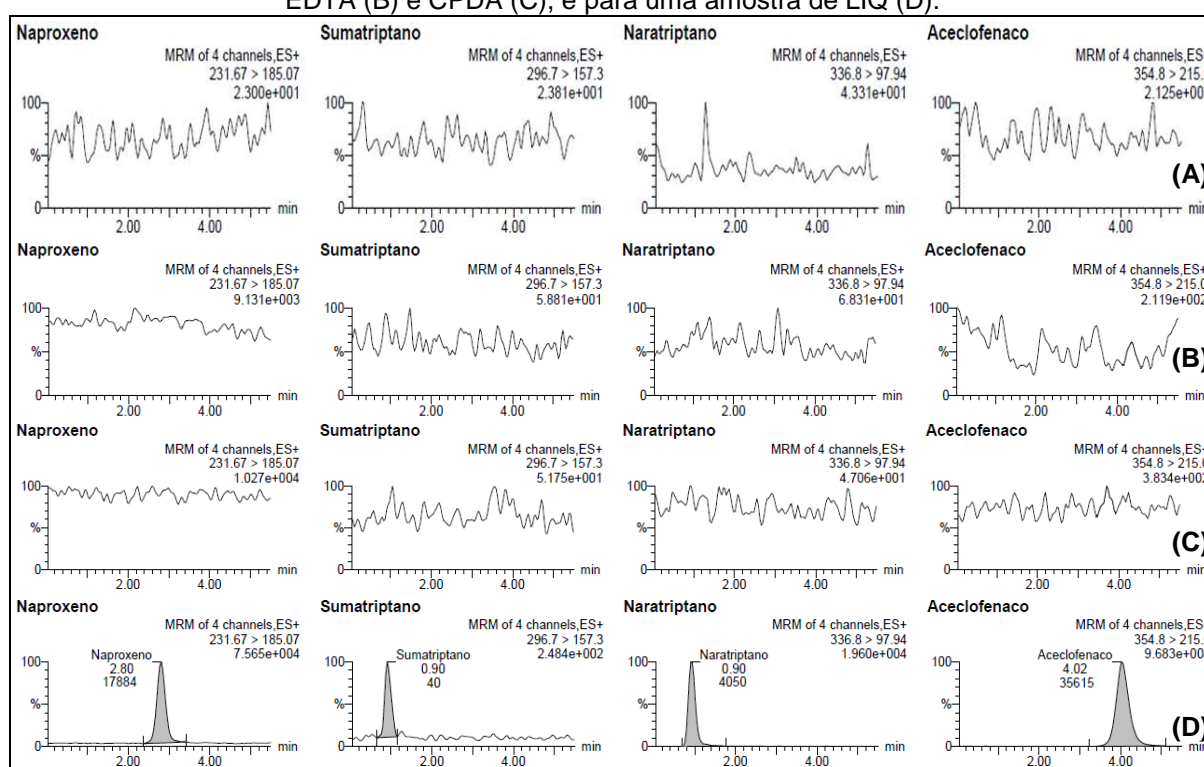
Normalmente o plasma contém uma pequena quantidade de hemoglobina livre, resultante da destruição de hemácias “velhas”. Entretanto alguns fatores durante a coleta e processamento do sangue para obtenção de plasma ou soro, como calibre da agulha para coleta do sangue, tipo e concentração do anticoagulante, temperaturas extremas, agitação do sangue, bem como alguns medicamentos, podem favorecer a ocorrência de hemólise em índices elevados. O aumento da concentração de sais (potássio, magnésio, fosfato, cloro e sódio), proteínas e lipídeos resultantes da hemólise podem prejudicar a seletividade do método e favorecer a ocorrência de efeito matriz e a formação de adutos (SOUZA; ELIAS, 2006; YOUNG; BERMES; HAVERSTICK, 2008).

A seletividade do método foi confirmada, nas três validações, após verificação da ausência de quaisquer picos de interferentes nos TRs dos fármacos com áreas superiores a 20% das áreas de NAP e SUM no LIQ e a 5% das áreas dos PIs, nas amostras analisadas. Não foi identificado qualquer pico nos TRs dos analitos ou PIs em quase todas as amostras. Para aquelas em que houve algum pico, observou-se interferência apenas para NAP e NAR e as porcentagens obtidas foram muito inferiores aos limites, sendo 2,88 e 2,79% os valores máximos para NAP e NAR, respectivamente. Além disso, não foram observadas diferenças entre amostras de plasma normal, lipêmico e hemolisado. O uso de um espectrômetro de massas sequencial favorece a seletividade dos métodos, uma vez que para que haja interferência no TR de um analito é necessário que o interferente chegue ao detector simultaneamente a esse analito e que tenha íon precursor e íon produto com a mesma relação massa/carga dos íons monitorados (KUSHNIR *et al.*, 2005).

Embora o controle sobre as condições de alimentação e a utilização de medicamentos pelos voluntários nos hemocentros seja menor que nos centros de bioequivalência, nenhuma das amostras de plasma contendo CPDA apresentou

interferências significativas ou perfil de cromatograma diferentes dos apresentados pelas amostras de HEPA e EDTA, não havendo diferença expressiva entre a seletividade do método frente aos três tipos de matrizes analisadas. Como exemplos, cromatogramas obtidos para amostras de plasma branco normal contendo HEPA, EDTA e CPDA, e para uma amostra de LIQ estão representados na Figura 11.

Figura 11 – Cromatogramas obtidos para amostras de plasma branco normal contendo HEPA (A), EDTA (B) e CPDA (C), e para uma amostra de LIQ (D).



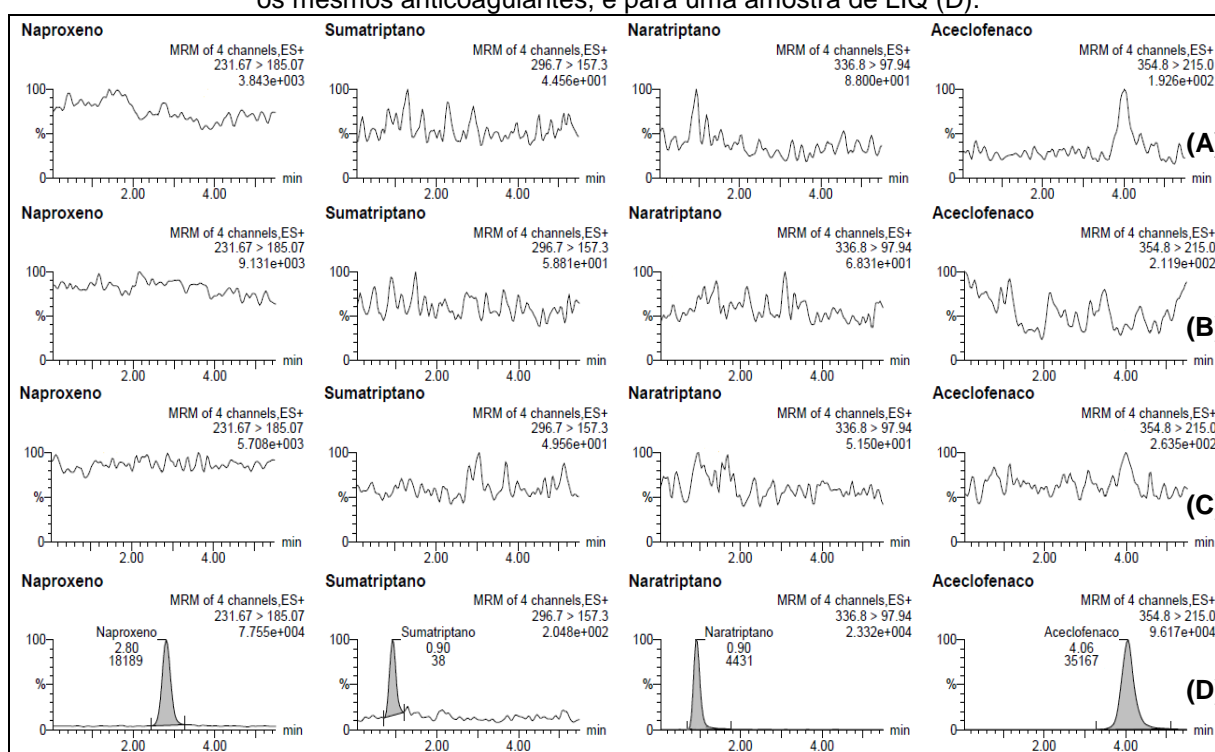
5.3.2 Efeito residual

O efeito residual consiste no aparecimento ou aumento da área sob o pico dos analitos ou PIs causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente. A existência de efeito residual compromete seriamente a precisão e exatidão do método, além da veracidade das conclusões obtidas a partir da análise de amostras de voluntários.

Para evitar a ocorrência de efeito residual, os parâmetros relacionados ao número de lavagens da seringa e do *loop* foram otimizados. Foram definidos 6 ciclos de

lavagem entre cada amostra, sendo 2 ciclos com isopropanol e 4 com solução de Metanol:água (90:10, v/v). A ausência de efeito residual no método foi confirmada, nas três validações, após verificação da inexistência de quaisquer picos de interferentes nos TRs dos analitos ou dos PIs nas injeções de plasma branco antes e após uma amostra de LSQ. Como exemplos, cromatogramas obtidos para as primeiras amostras de plasma branco contendo HEPA, EDTA e CPDA injetadas no sistema CLAE-EM/EM após uma amostra de LSQ, contendo os mesmos anticoagulantes, e para uma amostra de LIQ estão representados na Figura 12.

Figura 12 – Cromatogramas obtidos para as primeiras amostras de plasma branco contendo HEPA (A), EDTA (B) e CPDA (C) injetadas no sistema CLAE-EM/EM após uma amostra de LSQ, contendo os mesmos anticoagulantes, e para uma amostra de LIQ (D).



5.3.3 Efeito matriz

5.3.3.1 Determinação de acordo com a RDC nº 27

O ensaio para avaliação do efeito matriz através do cálculo do FMN, conforme recomendado pela Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012, indicou que o método não possui efeito matriz significativo, nas três matrizes analisadas, HEPA, EDTA e CPDA. De acordo com os dados descritos na Tabela 13, o CV% dos FMNs

obtidos para todas as amostras (CV% geral) foi inferior a 15% nos três tipos de matriz analisados.

Tabela 13 – FMNs_{NAP/ACE} e FMNs_{SUM/NAR} obtidos a partir dos resultados do ensaio de efeito matriz para os três tipos de matriz analisados (HEPA, EDTA e CPDA).

Tipo de plasma	HEPA				EDTA				CPDA			
	FMN _{NAP/ACE}		FMN _{SUM/NAR}		FMN _{NAP/ACE}		FMN _{SUM/NAR}		FMN _{NAP/ACE}		FMN _{SUM/NAR}	
	CQB	CQA	CQB	CQA	CQB	CQA	CQB	CQA	CQB	CQA	CQB	CQA
Normal 01	1,01	0,99	0,89	0,92	1,04	0,97	1,02	0,95	1,11	0,98	0,95	0,98
Normal 02	0,94	0,95	0,87	0,96	0,97	1,04	1,05	0,96	1,01	0,98	1,08	0,89
Normal 03	1,00	0,99	0,98	1,00	1,02	1,01	1,14	1,01	0,99	1,06	0,97	0,98
Normal 04	1,00	1,02	0,94	0,99	1,04	1,04	0,97	0,94	0,99	1,02	1,05	0,97
Lipêmico 01	1,03	1,03	0,84	0,92	1,06	0,96	1,03	0,93	1,09	1,03	0,94	0,98
Lipêmico 02	0,96	1,02	0,96	0,93	0,98	1,03	0,97	0,91	1,00	0,98	1,08	0,96
Hemolisado 01	0,97	1,03	0,81	0,92	1,06	0,92	1,04	0,96	1,08	0,95	0,91	1,11
Hemolisado 02	0,92	0,95	0,98	0,95	1,02	1,08	1,07	0,88	1,24	1,00	1,21	0,91
Média	0,98	1,00	0,91	0,95	1,02	1,00	1,04	0,94	1,06	1,00	1,02	0,97
CV%	3,65	3,49	7,06	3,55	3,27	5,39	5,11	4,05	7,92	3,56	9,69	6,58
Média geral	0,99		0,93		1,01		0,99		1,03		1,00	
CV% geral	3,57		5,75		4,39		6,64		6,82		8,54	

Considerando que, de um modo geral, os FMNs obtidos para as amostras de plasma normal foram semelhantes aos das amostras de plasma lipêmico ou hemolisado, pode-se inferir que a lipemia ou a hemólise não aumentaram a intensidade do efeito matriz do método. Os FMNs e os CV% obtidos para todas as amostras em cada um dos tipos de matriz analisados possuem valores próximos entre si e muito abaixo do limite preconizado, indicando que HEPA, EDTA e CPDA influenciam o efeito matriz do método bioanalítico em questão com intensidades semelhantes.

Extrapolando os critérios de aceitação preconizados pela Resolução seguida, é possível verificar que, de acordo com o ensaio realizado, não houve diferença expressiva entre os FMNs médios e CV% obtidos para amostras de CQB e de CQA, indicando que o efeito matriz presente no método não é perceptivelmente sensível a variações nas concentrações de NAP e SUM. Entretanto, embora o uso do FMN considere a capacidade que o PI tem de corrigir um possível efeito matriz sobre o analito, assegurando a precisão e exatidão do método, há perda de informações sobre o efeito matriz absoluto. Para exemplificar o efeito mascarador do FMN, ao

calcular o efeito matriz absoluto sobre SUM em plasma com HEPA através da equação (1) para amostras de CQB e CQA, obtêm-se os valores - 7,20% e - 9,16%, respectivamente. A diferença entre os valores sugere um leve incremento do efeito matriz de supressão de sinal com o aumento da concentração de SUM. Entretanto, ao comparar os valores dos FMNs obtidos para as mesmas amostras: 0,91 para CQB e 0,95 para CQA, a diferença encontra-se apenas na segunda casa decimal, dificultando a percepção do aumento do efeito matriz.

5.3.3.2 Determinação de acordo com outros guias

Considerando que o efeito matriz é o parâmetro mais afetado pela alteração da composição do plasma e que, como discutido no item 5.3.3.1, o ensaio proposto pela Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 não permite obter conclusões definitivas sobre o efeito matriz rotacional, foi proposto um método alternativo e de fácil inclusão na validação, para obtenção de um parecer mais concreto sobre os impactos de interferentes sensíveis ou não a alterações nas concentrações dos analitos na amostra.

O Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos do FDA (*Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation*, 2013) e o Guia de Validação de Métodos de Ensaio Químicos do INMETRO de 2011, confiam ao laboratório a função de estabelecer qual o método de avaliação do efeito matriz mais adequado à análise a ser realizada. Em estudos em que não há substituição da curva em matriz pela curva em solução, como estudos para quantificação de fármacos em fluidos biológicos, não é necessária a ausência de efeito matriz, mas apenas sua normalização. Desse modo, o ensaio para avaliação do efeito matriz é realizado apenas para monitorar a qualidade do método desenvolvido quanto à eliminação de interferentes, assegurando a precisão e a exatidão dos resultados obtidos, não sendo necessário considerar todos os pontos da curva de calibração. Entretanto, o efeito rotacional deve ser considerado, pois sua avaliação incorreta pode levar a conclusões equivocadas sobre a linearidade, precisão e exatidão do método bioanalítico, em decorrência de efeitos indutores ou supressores de sinal nas concentrações mais altas.

O Guia de Validação de Métodos de Ensaio Químicos do INMETRO de 2007 preconiza a realização do ensaio com todos os pontos da curva em septuplicata, por considerar a utilização de curvas de calibração em solução durante a análise das amostras. Entretanto, a utilização de três níveis de concentração em quadruplicata permite o uso adequado dos modelos estatísticos e proporciona uma avaliação válida do efeito matriz rotacional, sem que haja gasto excessivo de plasma humano, solventes e substâncias químicas de referência, além de reduzir o tempo de análise.

Para verificação do efeito matriz absoluto sobre NAP e SUM, os testes F e t foram aplicados considerando como resposta a área sob o pico de cada analito. Através da comparação dos valores de $F_{\text{crítico}}$ e $F_{\text{calculado}}$, o teste F indicou que a matriz não tem um efeito importante sobre a precisão do método na faixa de concentração em estudo, em todas as matrizes, para NAP e SUM, exceto para SUM em plasma contendo CPDA. Desse modo, para comparação das inclinações e das interseções da curva, o teste t com variâncias combinadas foi aplicado para NAP em todas as matrizes e para SUM em plasma contendo HEPA ou EDTA. Já para SUM em plasma contendo CPDA utilizou-se o teste t com variâncias distintas.

O teste t indicou, através da verificação de valores de t_a e t_b menores que o $t_{\text{crítico}}$, que a matriz não afeta as inclinações e as interseções das curvas de NAP em HEPA, EDTA ou CPDA, comprovando a ausência de efeito matriz rotacional e translacional, ou seja, os interferentes da matriz não tem grande influência sobre a detecção e não reagem com os analitos produzindo novos interferentes, além de não haver saturação da superfície das gotas nas concentrações mais altas. Entretanto, para SUM, o teste t permitiu a comprovação apenas da ausência de efeito matriz translacional em HEPA, EDTA e CPDA, uma vez que os valores de t_b foram maiores que o $t_{\text{crítico}}$ nas três matrizes analisadas, indicando que a matriz afeta as inclinações das curvas de SUM. Os resultados dos testes F e t para NAP e SUM, considerando a área sob os picos estão descritos na Tabela 14.

Embora essa primeira análise estatística permita a identificação da presença de efeito matriz rotacional e translacional sobre os analitos, não é adequada para métodos que utilizam PI, pois não considera o efeito corretor do PI. Visando avaliar a eficácia de ACE e NAR e comparar o ensaio proposto com o preconizado pela

Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012, uma segunda análise estatística foi feita, considerando como resposta as razões entre as áreas sob os picos dos analitos e seus PIs (A_{NAP}/A_{ACE} e A_{SUM}/A_{NAR}).

O teste F indicou que as variâncias são homogêneas, em todas as matrizes para NAP e SUM, exceto para SUM em plasma contendo HEPA. Desse modo, o teste t com variâncias combinadas foi aplicado para NAP em todas as matrizes e para SUM em plasma contendo EDTA ou CPDA. Já para SUM em plasma contendo HEPA utilizou-se o teste t com variâncias distintas. O teste t indicou que a matriz não afeta as inclinações e as interseções das curvas de NAP e de SUM em HEPA, EDTA ou CPDA, comprovando a ausência de efeito matriz rotacional e translacional. Os resultados dos testes F e t para NAP e SUM, nas três matrizes analisadas, considerando as razões A_{NAP}/A_{ACE} e A_{SUM}/A_{NAR} estão descritos na Tabela 15.

Diante dos resultados obtidos a partir da análise estatística, considerando como resposta as razões A_{NAP}/A_{ACE} e A_{SUM}/A_{NAR} , é possível confirmar a eficácia dos PIs utilizados e comprovar a ausência de qualquer efeito matriz impactante sobre a precisão e exatidão do método, assegurando que durante a análise das amostras de voluntários, aquelas coletadas próximas à $C_{máx}$, não terão suas concentrações sub ou superestimadas. Além disso, a diferença observada para SUM entre as duas análises estatísticas justifica a não observação da influência de interferentes da matriz com o aumento da concentração no ensaio preconizado pela Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012, já que o FMN considera o efeito corretor dos PIs.

Tabela 14 – Resultados dos testes F e t para NAP e SUM, nas três matrizes analisadas, considerando a área sob os picos.

Parâmetro	NAP			SUM		
	HEPA	EDTA	CPDA	HEPA	EDTA	CPDA
$F_{\text{crítico}}$	2,98	2,98	2,98	2,98	2,98	2,98
$F_{\text{calculado}}$	1,19	1,71	1,55	1,01	2,72	<u>6,56</u>
$t_{\text{crítico}}$	2,09	2,09	2,09	2,09	2,09	2,18
t_a	0,26	0,51	0,47	0,34	0,35	1,01
t_b	1,53	1,54	0,48	<u>2,69</u>	<u>2,12</u>	<u>2,65</u>

Tabela 15 – Resultados dos testes F e t para NAP e SUM, nas três matrizes analisadas, considerando as razões entre as áreas sob os picos $A_{\text{NAP}}/A_{\text{ACE}}$ e $A_{\text{SUM}}/A_{\text{NAR}}$.

Parâmetro	NAP			SUM		
	HEPA	EDTA	CPDA	HEPA	EDTA	CPDA
$F_{\text{crítico}}$	2,98	2,98	2,98	2,98	2,98	2,98
$F_{\text{calculado}}$	1,25	1,77	2,26	<u>5,50</u>	2,54	1,09
$t_{\text{crítico}}$	2,09	2,09	2,09	2,16	2,09	2,09
t_a	0,01	0,08	0,26	0,45	0,64	0,50
t_b	0,30	0,44	0,34	1,60	1,76	1,66

Além das conclusões obtidas através da comparação dos valores de t_a e t_b com o $t_{\text{crítico}}$, a comparação visual das curvas em solução e em matriz deixa clara a eficácia de ACE e NAR na correção do efeito matriz sofrido por NAP e SUM, respectivamente, mesmo quando não há diferença estatisticamente significativa entre os valores de t , como observado para NAP. Além disso, é possível verificar a semelhança da supressão do sinal analítico causado por interferentes dos plasmas com HEPA, EDTA ou CPDA, através da posição da curva em solução acima da curva em matriz no gráfico, tanto para NAP quanto para SUM. As curvas em solução e em matriz obtidas para NAP e SUM, considerando como resposta a área sob o pico de NAP e SUM ou as razões $A_{\text{NAP}}/A_{\text{ACE}}$ e $A_{\text{SUM}}/A_{\text{NAR}}$, para os três tipos de matriz analisados estão representados nas Figuras 13 e 14.

Figura 13 – Curvas em solução e em matriz obtidas para NAP, considerando como resposta a área sob o pico de NAP ou a razão A_{NAP}/A_{ACE} , para os três tipos de matriz analisados HEPA (A), EDTA (B) e CPDA (C).

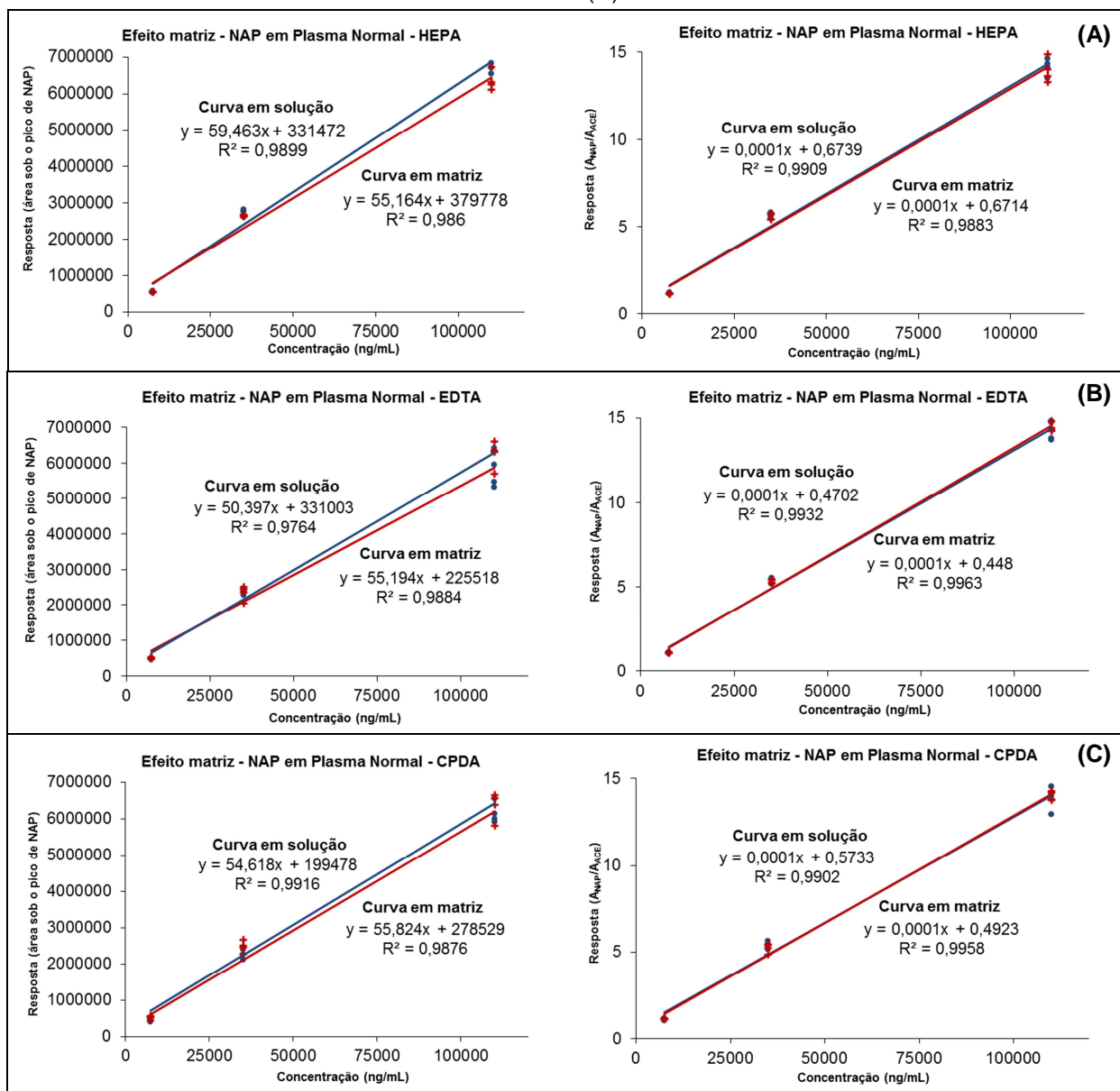
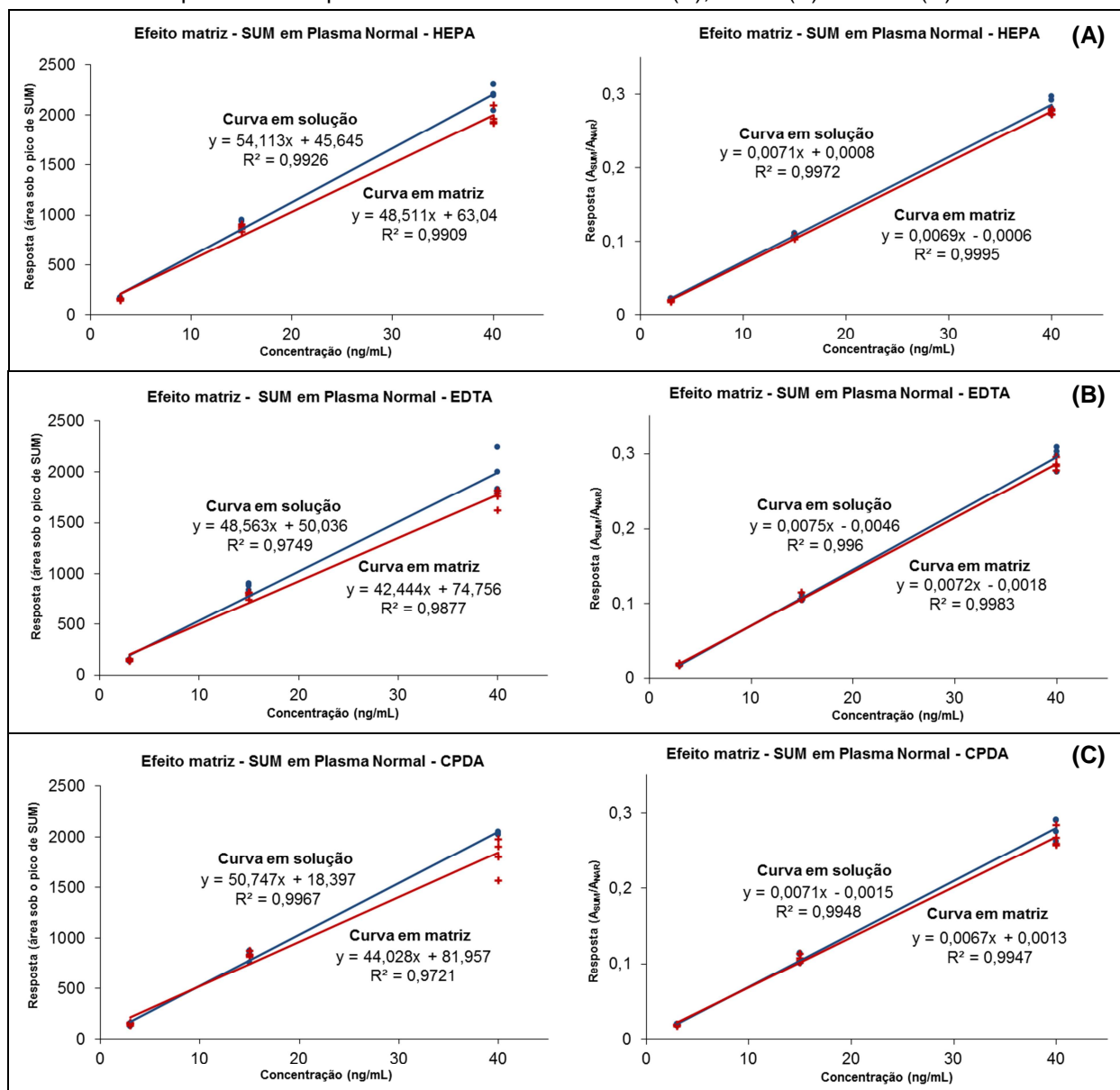


Figura 14 – Curvas de calibração em solução e em matriz obtidas para SUM, considerando como resposta a área sob o pico de SUM ou a razão entre as áreas sob os picos de SUM e NAR (A_{SUM}/A_{NAR}), para os três tipos de matriz analisados HEPA (A), EDTA (B) e CPDA (C).



5.3.4 Linearidade da faixa de trabalho

A frequente utilização de métodos bioanalíticos com amplas faixas de concentração, de duas ou mais ordens de magnitude, muitas vezes resulta em variâncias diferentes para níveis de concentração baixos e altos, afetando a regressão linear. Para definição do modelo de regressão linear mais simples, a equação e os desvios de cada ponto, para as três curvas de calibração extraídas e analisadas pelos mesmos procedimentos, foram calculados considerando diferentes ponderações. Os cálculos foram realizados sem a exclusão de pontos com desvio acima dos critérios

estabelecidos, para evitar a obtenção de conclusões falsas. As avaliações das somas dos erros relativos das concentrações nominais *versus* as concentrações calculadas a partir das equações das retas foram feitas priorizando a utilização de um modelo de regressão linear sem o uso de fator de ponderação. A utilização da regressão linear ponderada foi a alternativa escolhida, caso a variância dos erros não fosse constante em toda a faixa de trabalho. Nesse caso, foram priorizados os fatores de ponderação que forneceram menores valores para as somas dos desvios.

Os modelos de regressão linear mais simples obtidos para NAP e SUM foram, respectivamente, $y = ax + b$ com fator de ponderação $1/x^2$ e $y = ax + b$ com fator de ponderação $1/x$ sendo, y a razão entre as áreas sob os picos dos analitos e dos PIs (NAP/ACE ou SUM/NAR), a o coeficiente angular, x a concentração nominal de NAP ou SUM e b o coeficiente linear. A necessidade do uso de um fator de ponderação mais complexo para NAP pode ser explicada pela amplitude da faixa de trabalho utilizada, a qual inclui três ordens de magnitude, enquanto a faixa de trabalho de SUM abrange apenas duas. Os valores das somas dos erros relativos das concentrações nominais *versus* as concentrações calculadas em três curvas de calibração, com fatores de ponderação $1/x$ e $1/x^2$ para NAP e sem ponderação e com fator $1/x$ para SUM nas três validações estão descritos na Tabela 16.

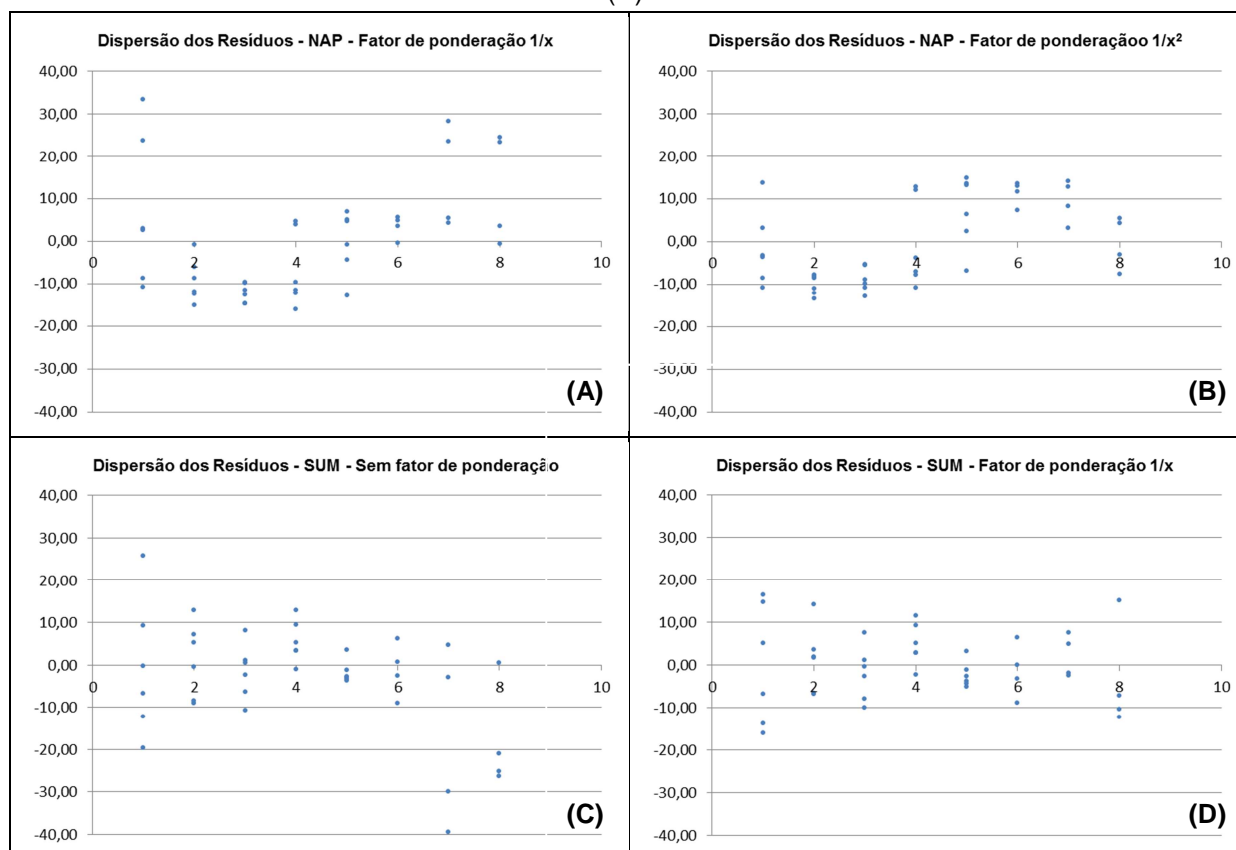
Tabela 16 – Valores das somas dos erros relativos das concentrações nominais *versus* as concentrações calculadas em três curvas de calibração, com fatores de ponderação $1/x$ e $1/x^2$ para NAP e sem ponderação e com fator $1/x$ para SUM nas três validações.

Fator de ponderação	HEPA		EDTA		CPDA	
	NAP	SUM	NAP	SUM	NAP	SUM
Nenhum	-	294,90	-	367,50	-	244,70
$1/x$	354,80	258,20	432,40	271,20	388,30	222,10
$1/x^2$	301,80	-	373,50	-	322,70	-

A inspeção visual do gráfico de dispersão dos resíduos para cada nível de concentração dos analitos, também foi realizada para identificação do perfil de distribuição dos resíduos ao longo do eixo x . A distribuição homogênea indica uniformidade das variâncias (homoscedasticidade), enquanto a distribuição em forma de cone corresponde a heterocedasticidade. Os gráficos obtidos a partir dos resíduos que forneceram menores valores de soma apresentaram maior

homogeneidade e menor amplitude de distribuição. Como exemplos, gráficos de dispersão dos resíduos para cada nível de concentração dos analitos obtidos para NAP e SUM com os modelos de regressão linear analisados estão representados na Figura 15.

Figura 15 – Distribuição dos resíduos obtida para cada nível de concentração de NAP com fatores de ponderação $1/x$ (A) e $1/x^2$ (B) e de SUM sem fator de ponderação (C) e com fator de ponderação $1/x$ (D).



A linearidade das faixas de trabalho de 2500,00 a 130000,00 ng/mL para NAP e 1,00 a 50,00 ng/mL para SUM foi confirmada, nas três validações, após a verificação de, no mínimo, 75% dos pontos (10 pontos) com desvios inferiores a 20% para o LIQ e a 15% para os demais níveis de concentração. Essas condições foram confirmadas em três curvas de calibração extraídas e analisadas em, pelo menos dois dias diferentes e por dois analistas. Não foram verificados quaisquer picos de interferentes nos TRs dos fármacos com áreas superiores a 20% das áreas dos analitos no LIQ e a 5% das áreas dos PIs, nas amostras Branco. As áreas dos PIs nas amostras Zero foram semelhantes àquelas obtidas para as demais amostras das curvas de calibração. Os desvios obtidos para os pontos da curva de calibração

em cada um dos tipos de matriz analisados possuem valores próximos entre si e abaixo do limite preconizado, indicando que o tipo de anticoagulante utilizado na coleta de sangue, HEPA, EDTA ou CPDA, não influencia na linearidade do método bioanalítico em questão.

As equações das retas e os respectivos coeficientes de determinação (r^2) obtidos para as três validações estão descritos na Tabela 17. É importante citar que embora os valores de r ou r^2 sejam muitas vezes utilizados na avaliação da qualidade da curva ou do ajuste dos pontos à reta, esses parâmetros são apenas informativos. A avaliação da linearidade da faixa de trabalho deve ser feita, principalmente através da análise dos desvios individuais de cada ponto e da soma desses desvios. Como exemplo, curvas de calibração obtidas para NAP e SUM estão representadas na Figura 16 e os dados obtidos para construção das primeiras curvas de calibração de NAP e SUM nas três validações estão descritos na Tabela 18.

Tabela 17 – Equações das retas e respectivos coeficientes de determinação obtidos para as três validações.

HEPA				
Curva de calibração	NAP		SUM	
	Equação da reta	r^2	Equação da reta	r^2
1	$y = 1,16 \times 10^{-4}x + 9,21 \times 10^{-3}$	0,99493	$y = 3,36 \times 10^{-3}x + 7,58 \times 10^{-4}$	0,99832
2	$y = 9,66 \times 10^{-5}x - 2,59 \times 10^{-2}$	0,99355	$y = 4,04 \times 10^{-3}x + 9,59 \times 10^{-5}$	0,99708
3	$y = 2,55 \times 10^{-4}x - 1,57 \times 10^{-1}$	0,99021	$y = 4,10 \times 10^{-3}x + 5,57 \times 10^{-3}$	0,99834
EDTA				
Curva de calibração	NAP		SUM	
	Equação da reta	r^2	Equação da reta	r^2
1	$y = 2,25 \times 10^{-4}x - 1,73 \times 10^{-1}$	0,98309	$y = 4,26 \times 10^{-3}x - 2,00 \times 10^{-4}$	0,99640
2	$y = 2,98 \times 10^{-4}x - 1,76 \times 10^{-1}$	0,98588	$y = 3,93 \times 10^{-3}x + 5,01 \times 10^{-3}$	0,99724
3	$y = 3,15 \times 10^{-4}x - 2,53 \times 10^{-1}$	0,98455	$y = 4,03 \times 10^{-3}x + 5,44 \times 10^{-3}$	0,99314
CPDA				
Curva de calibração	NAP		SUM	
	Equação da reta	r^2	Equação da reta	r^2
1	$y = 2,30 \times 10^{-4}x - 1,53 \times 10^{-1}$	0,98888	$y = 3,44 \times 10^{-3}x + 4,30 \times 10^{-3}$	0,99567
2	$y = 2,15 \times 10^{-4}x - 1,43 \times 10^{-1}$	0,99041	$y = 3,65 \times 10^{-3}x + 6,75 \times 10^{-5}$	0,99879
3	$y = 2,06 \times 10^{-4}x - 9,17 \times 10^{-2}$	0,98715	$y = 3,33 \times 10^{-3}x + 3,84 \times 10^{-4}$	0,99616

Figura 16 – Curvas de calibração obtidas para NAP (A) e SUM (B).

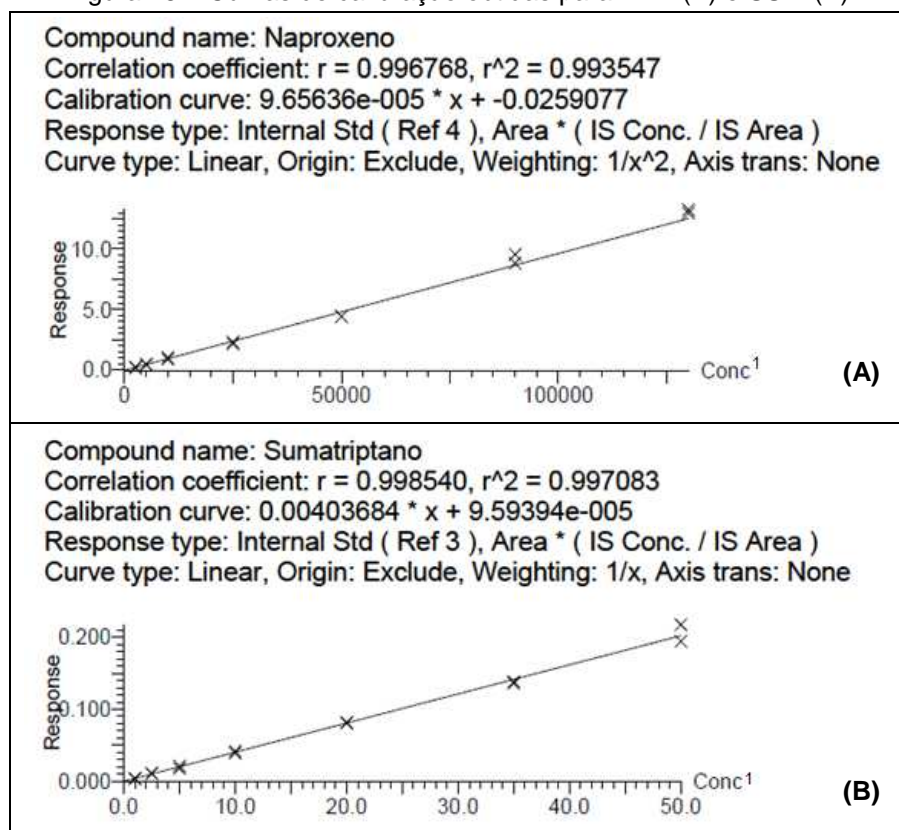
¹ ng/mL.

Tabela 18 – Dados obtidos para construção das primeiras curvas de calibração de NAP e SUM nas três validações.

NAP						
Concentração nominal (ng/mL)	HEPA		EDTA		CPDA	
	Concentração calculada (ng/mL)	Desvio (%)	Concentração calculada (ng/mL)	Desvio (%)	Concentração calculada (ng/mL)	Desvio (%)
2500,00	2401,47	-3,90	2708,40	8,30	2412,43	-3,50
2500,00	2574,65	3,00	2581,05	3,20	2803,52	12,10
5000,00	5246,89	4,90	4844,21	-3,10	5052,60	1,10
5000,00	4869,85	-2,60	4621,20	-7,60	4652,91	-6,90
10000,00	9505,33	-4,90	8926,72	-10,70	9194,04	-8,10
10000,00	10987,79	9,90	9142,58	-8,60	8933,86	-10,70
25000,00	22754,40	-9,00	22285,35	-10,90	21993,23	-12,00
25000,00	24322,78	-2,70	22978,06	-8,10	23285,87	-6,90
50000,00	46069,72	-7,90	45525,85	-8,90	53063,15	6,10
50000,00	46111,68	-7,80	47276,20	-5,40	47660,77	-4,70
90000,00	91571,77	1,70	100836,22	12,00	96486,48	7,20
90000,00	99141,55	10,20	101643,03	12,90	100429,06	11,60
130000,00	137300,82	5,60	147714,85	13,60	139594,24	7,40
130000,00	134547,40	3,50	147106,98	13,20	139403,42	7,20
SUM						
Concentração nominal (ng/mL)	HEPA		EDTA		CPDA	
	Concentração calculada (ng/mL)	Desvio (%)	Concentração calculada (ng/mL)	Desvio (%)	Concentração calculada (ng/mL)	Desvio (%)
1,00	0,99	-1,10	0,98	-1,80	1,01	1,30
1,00	0,95	-5,30	1,08	7,50	0,98	-2,30
2,50	2,59	3,60	2,19	-12,30	2,56	2,30
2,50	2,75	10,00	2,32	-7,10	2,23	-10,60
5,00	4,42	-11,50	4,32	-13,70	5,23	4,60
5,00	5,25	4,90	5,73	14,70	4,70	-6,10
10,00	9,67	-3,30	11,42	14,20	11,28	12,80
10,00	10,36	3,60	9,35	-6,50	9,89	-1,10
20,00	20,23	1,10	21,53	7,60	22,23	11,10
20,00	20,04	0,20	19,48	-2,60	18,84	-5,80
35,00	34,23	-2,20	39,03	11,50	32,75	-6,40
35,00	33,68	-3,80	34,25	-2,20	34,68	-0,90
50,00	53,78	7,60	47,48	-5,00	48,42	-3,20
50,00	48,06	-3,90	47,86	-4,30	52,23	4,50

5.3.5 Precisão e exatidão

A precisão do método bioanalítico avalia a proximidade dos resultados obtidos por repetidas aferições de múltiplas alíquotas de uma única fonte homogênea de matriz biológica, e a exatidão do método avalia a concordância entre o resultado de um ensaio e um valor de referência.

O método bioanalítico foi considerado preciso e exato para quantificação simultânea de NAP e SUM em plasma humano contendo HEPA, EDTA ou CPDA, uma vez que todos os valores de CV% são inferiores a 20% para o LIQ e a 15% para os demais CQs, e que os valores de EPR% estão dentro da faixa de $\pm 20\%$ do valor nominal para o LIQ e de $\pm 15\%$ do valor nominal para os demais CQs. Além disso, os desvios obtidos para os CQs em cada um dos tipos de matriz analisados possuem valores próximos entre si e abaixo do limite preconizado, indicando que o tipo de anticoagulante utilizado na coleta de sangue, HEPA, EDTA ou CPDA, não influencia na precisão e exatidão do método bioanalítico em questão. Essas condições foram obtidas através da análise de amostras de CQ extraídas e analisadas em sextuplicata em cinco concentrações: LIQ; CQB; CQM; CQA e CQD, simultaneamente a três curvas de calibração em, pelo menos dois dias diferentes e por dois analistas. Considerando as faixas de trabalho validadas, as concentrações dos CQs foram definidas como 7500,00 e 3,00 ng/mL para CQB, 35000,00 e 15,00 ng/mL para CQM, 110000,00 e 40,00 ng/mL para CQA e 220000,00 e 80,00 ng/mL para CQD de NAP e SUM, respectivamente. Os valores de CV% intracorrída e intercorrídas obtidos para as três validações estão descritos na Tabela 19 e os de EPR% na Tabela 20.

Tabela 19 – Valores de CV% intracorrída e intercorrídas obtidos para as três validações.

HEPA										
Corrida	CV% intracorrída - NAP					CV% intracorrída - SUM				
	LIQ	CQB	CQM	CQA	CQD	LIQ	CQB	CQM	CQA	CQD
1	4,65	6,09	3,49	4,06	3,74	9,98	6,19	5,43	6,54	6,37
2	9,45	8,10	8,00	7,18	2,39	10,28	6,63	3,97	4,76	5,17
3	2,34	1,99	11,04	1,66	3,32	10,74	10,66	11,52	3,52	7,85
CV% intercorrída	8,50	5,78	8,41	8,75	6,73	10,23	7,74	7,47	5,24	6,26

EDTA										
Corrida	CV% intracorrída - NAP					CV% intracorrída - SUM				
	LIQ	CQB	CQM	CQA	CQD	LIQ	CQB	CQM	CQA	CQD
1	3,42	4,15	2,23	1,23	1,96	9,90	10,87	4,69	4,37	4,50
2	4,40	2,52	4,67	0,68	1,40	13,73	8,70	4,41	3,44	5,78
3	2,77	2,24	4,54	3,27	3,00	3,07	5,29	3,22	2,01	5,41
CV% intercorrída	4,07	3,32	4,11	2,83	2,14	11,59	8,46	4,36	4,82	5,17

CPDA										
Corrida	CV% intracorrída - NAP					CV% intracorrída - SUM				
	LIQ	CQB	CQM	CQA	CQD	LIQ	CQB	CQM	CQA	CQD
1	4,25	3,21	4,69	4,57	2,65	6,70	7,74	5,43	4,95	2,51
2	5,09	5,71	2,42	1,72	1,90	9,48	7,80	5,48	4,98	5,76
3	3,57	4,27	5,69	3,68	2,86	13,87	10,41	5,49	4,84	6,70
CV% intercorrída	5,68	4,42	4,72	3,73	2,59	10,54	8,62	5,54	5,48	5,55

Tabela 20 – Valores de EPR% intracorrída e intercorrídas obtidos para as três validações.

HEPA										
Corrida	EPR% intracorrída - NAP					EPR% intracorrída - SUM				
	LIQ	CQB	CQM	CQA	CQD	LIQ	CQB	CQM	CQA	CQD
1	-3,21	-7,14	-2,51	7,61	1,94	1,35	0,08	0,20	0,34	4,31
2	1,08	-8,84	-10,26	-5,49	-5,12	-0,68	2,96	-4,12	4,50	2,59
3	11,79	-10,34	-3,56	12,78	9,46	-6,07	0,06	-2,65	-0,28	1,53
EPR% intercorrída	3,22	-8,67	-5,16	4,51	2,09	-1,86	0,92	-2,19	1,52	2,81
EDTA										
Corrida	EPR% intracorrída - NAP					EPR% intracorrída - SUM				
	LIQ	CQB	CQM	CQA	CQD	LIQ	CQB	CQM	CQA	CQD
1	10,87	-8,77	-5,77	13,17	12,73	6,90	-2,34	-4,96	-4,25	-2,63
2	6,13	-11,79	-4,95	14,09	12,87	-2,23	1,14	-0,89	4,00	-0,49
3	11,73	-11,49	-8,62	8,84	12,10	-8,87	-4,36	-1,11	-2,01	0,88
EPR% intercorrída	9,58	-10,68	-6,45	12,03	12,55	-1,89	-1,85	-2,32	-0,75	-0,75
CPDA										
Corrida	EPR% intracorrída - NAP					EPR% intracorrída - SUM				
	LIQ	CQB	CQM	CQA	CQD	LIQ	CQB	CQM	CQA	CQD
1	8,01	-9,59	-5,87	6,35	8,32	2,88	4,34	0,59	-1,00	1,52
2	7,62	-7,04	-2,85	10,30	11,17	7,98	-1,93	-2,62	-3,82	-4,15
3	-0,62	-8,12	-7,81	10,43	9,47	-2,32	1,51	2,24	3,09	0,18
EPR% intercorrída	5,00	-8,25	-5,51	8,94	9,65	2,85	1,31	0,07	-0,57	-0,81

5.3.6 Estabilidade dos analitos em matriz biológica

A estabilidade de fármacos em fuidos biológicos depende de suas propriedades químicas, da matriz biológica e de agentes externos à matriz, como material de acondicionamento, anticoagulantes e fatores ambientais. A avaliação da estabilidade dos analitos na matriz biológica visa determinar se a concentração dos fármacos inalterados se mantém dentro de limites estabelecidos, por um determinado período de tempo, sob as condições de armazenamento, preparo e análise, definidas a partir das condições a que as amostras da validação e de voluntários serão submetidas. Os ensaios de estabilidade são de fundamental importância para assegurar a confiabilidade nos resultados das análises, evitando a obtenção de valores subestimados em decorrência da degradação dos analitos. A constatação de que as amostras analisadas são pouco estáveis em determinada condição não invalida o método, desde que todas as amostras da validação e da aplicação do método

bioanalítico sejam analisadas dentro do tempo no qual se verificou a estabilidade das mesmas (BRASIL, 2012).

Todas as amostras empregadas nos estudos de ECC, ECD, ELD e EPP, nas três validações, forneceram valores de EPR% dentro da faixa de $\pm 15\%$ do valor nominal na análise imediatamente após sua preparação. Essas condições foram obtidas através da análise de amostras de CQ extraídas e analisadas em quadruplicata nas concentrações de CQB e CQA, simultaneamente a uma curva de calibração. Embora não preconizado pela Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 da ANVISA, a precisão de todos os ensaios de estabilidade foi avaliada através dos valores de CV%. Os dados obtidos para NAP e SUM na avaliação das amostras recém-preparadas para as três validações estão descritos na Tabela 21.

Tabela 21 – Dados obtidos para NAP e SUM na avaliação das amostras recém-preparadas para as três validações.

NAP						
Parâmetro	HEPA		EDTA		CPDA	
	CQB	CQA	CQB	CQA	CQB	CQA
Conc. média (ng/mL)	7247,78	115266,51	6736,07	119782,65	6971,98	121990,15
CV%	6,53	1,91	1,51	3,29	5,91	2,57
EPR%	-3,36	4,79	-10,19	8,89	-7,04	10,90
SUM						
Parâmetro	HEPA		EDTA		CPDA	
	CQB	CQA	CQB	CQA	CQB	CQA
Conc. média (ng/mL)	3,25	38,32	3,15	41,21	3,38	39,51
CV%	5,55	4,22	9,22	7,10	2,85	4,07
EPR%	8,40	-4,20	5,05	3,02	12,58	-1,22

Foram utilizados dois critérios principais para a determinação dos períodos de avaliação da estabilidade dos analitos em cada uma das condições testadas (ECC, ECD, ELD e EPP) nas três matrizes (plasma humano contendo HEPA, EDTA ou CPDA): estimativa do tempo em que as amostras dos voluntários poderiam vir a ficar submetidas às diferentes condições de temperatura durante o preparo e análise; e logística do laboratório para realização dos ensaios. Esses dois critérios, principalmente o segundo, justificam os períodos de estabilidade diferentes obtidos em cada uma das três matrizes avaliadas, considerando que cada uma das três

validações foi realizada isoladamente e em dias distintos. Desse modo, a diferença observada entre os períodos não é devido a uma menor estabilidade dos analitos em uma determinada matriz, mas sim às condições de tempo reais avaliadas durante os ensaios de acordo com a logística do laboratório.

5.3.6.1 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

A estabilidade de NAP e SUM em amostras de plasma humano contendo HEPA, EDTA ou CPDA após três ciclos de congelamento a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e descongelamento a $22 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi confirmada com a verificação de valores de EP R% dentro da faixa de $\pm 15\%$ do valor nominal em relação à média das concentrações obtidas e de CV% inferiores a 15% para todas as amostras de CQB e CQA analisadas. Todas as concentrações obtidas foram incluídas no cálculo da média. Os desvios das médias das concentrações calculadas em cada um dos tipos de matriz analisados possuem valores próximos entre si e abaixo do limite preconizado, indicando que o tipo de anticoagulante utilizado na coleta de sangue (HEPA, EDTA ou CPDA), não influencia na ECC de NAP e SUM em plasma humano. Os dados obtidos na avaliação da ECC para NAP e SUM nas três validações estão descritos na Tabela 22.

Tabela 22 – Dados obtidos na avaliação da ECC para NAP e SUM nas três validações.

NAP						
Parâmetro	HEPA		EDTA		CPDA	
	CQB	CQA	CQB	CQA	CQB	CQA
Conc. média (ng/mL)	7493,94	124376,87	6745,33	122967,96	7041,58	118036,31
CV%	10,13	12,03	3,19	2,38	9,63	3,64
EPR%	-0,08	13,07	-10,06	11,79	-6,11	7,31
SUM						
Parâmetro	HEPA		EDTA		CPDA	
	CQB	CQA	CQB	CQA	CQB	CQA
Conc. média (ng/mL)	3,01	40,63	2,96	38,11	2,68	39,38
CV%	6,98	8,49	6,43	3,45	12,32	6,11
EPR%	0,19	1,58	-1,26	-4,72	-10,75	-1,56

Durante a validação e a aplicação do método nenhuma amostra de plasma contendo os analitos foi submetida a mais de três ciclos de congelamento e descongelamento: condição de estabilidade validada.

5.3.6.2 Estabilidade de curta duração

A ECD foi avaliada por um período de 7, 6 ou 5 horas para amostras de plasma humano contendo HEPA, EDTA ou CPDA, respectivamente. NAP e SUM são estáveis quando mantidos a temperatura ambiente de 22 ± 2 °C durante o período avaliado. A conclusão sobre a ECD foi obtida após extração e análise das amostras em estudo e verificação de valores de EPR% dentro da faixa de $\pm 15\%$ do valor nominal em relação à média das concentrações obtidas e de CV% inferiores a 15% para todas as amostras de CQB e CQA analisadas. Todas as concentrações obtidas foram incluídas no cálculo da média. Os desvios das médias das concentrações calculadas em cada um dos tipos de matriz analisados possuem valores próximos entre si e abaixo do limite preconizado, indicando que o tipo de anticoagulante utilizado na coleta de sangue, HEPA, EDTA ou CPDA, não influencia na ECD de NAP e SUM em plasma humano. Os dados obtidos na avaliação da ECD para NAP e SUM nas três validações estão descritos na Tabela 23.

Tabela 23 – Dados obtidos na avaliação da ECD para NAP e SUM nas três validações.

NAP						
Parâmetro	HEPA		EDTA		CPDA	
	CQB	CQA	CQB	CQA	CQB	CQA
Conc. média (ng/mL)	7481,95	112190,22	6905,13	124194,33	6937,84	122534,83
CV%	10,07	8,73	1,64	0,28	3,67	1,80
EPR%	-0,24	1,99	-7,93	12,90	-7,50	11,40
SUM						
Parâmetro	HEPA		EDTA		CPDA	
	CQB	CQA	CQB	CQA	CQB	CQA
Conc. média (ng/mL)	3,19	39,78	2,73	36,42	2,81	42,82
CV%	8,86	5,27	4,36	1,94	6,59	5,73
EPR%	6,48	-0,55	-9,01	-8,94	-6,30	7,05

Durante a validação e a aplicação do método nenhuma amostra de plasma contendo os analitos foi mantida à temperatura ambiente de 22 ± 2 °C, antes do início do

procedimento de extração por um período superior a 7, 6 ou 5 horas, para plasma contendo HEPA, EDTA ou CPDA, respectivamente: condições de estabilidade validadas em cada uma das três validações.

5.3.6.3 Estabilidade de longa duração

A ELD foi avaliada por um período de 92, 58 ou 53 dias para amostras de plasma humano contendo HEPA, EDTA ou CPDA, respectivamente. NAP e SUM são estáveis quando mantidos a temperatura de -70 °C durante o período avaliado. A conclusão sobre a ELD foi obtida após descongelamento, extração e análise das amostras em estudo e verificação de valores de EPR% dentro da faixa de $\pm 15\%$ do valor nominal em relação à média das concentrações obtidas e de CV% inferiores a 15% para todas as amostras de CQB e CQA analisadas. Todas as concentrações obtidas foram incluídas no cálculo da média. Os desvios das médias das concentrações calculadas em cada um dos tipos de matriz analisados possuem valores próximos entre si e abaixo do limite preconizado, indicando que o tipo de anticoagulante utilizado na coleta de sangue, HEPA, EDTA ou CPDA, não influencia na ELD de NAP e SUM em plasma humano. Os dados obtidos na avaliação da ELD para NAP e SUM nas três validações estão descritos na Tabela 24.

Tabela 24 – Dados obtidos na avaliação da ELD para NAP e SUM nas três validações.

NAP						
Parâmetro	HEPA		EDTA		CPDA	
	CQB	CQA	CQB	CQA	CQB	CQA
Conc. média (ng/mL)	7543,91	122610,03	6892,40	120974,98	6703,38	122458,31
CV%	6,74	2,48	3,05	2,23	2,85	1,29
EPR%	0,59	11,46	-8,10	9,98	-10,62	11,33
SUM						
Parâmetro	HEPA		EDTA		CPDA	
	CQB	CQA	CQB	CQA	CQB	CQA
Conc. média (ng/mL)	2,84	37,59	2,73	37,60	2,93	40,51
CV%	4,88	3,58	6,95	2,42	11,51	5,13
EPR%	-5,27	-6,04	-9,17	-6,00	-2,50	1,28

Durante a validação e a aplicação do método nenhuma amostra de plasma contendo os analitos foi mantida congelada a -70 °C, desde a adição de padrão ou coleta até o

início da análise por um período superior a 92, 58 ou 53 dias, para plasma contendo HEPA, EDTA ou CPDA, respectivamente: condições de estabilidade validadas em cada uma das três validações.

5.3.6.4 Estabilidade pós-processamento

A EPP foi avaliada por um período de 55, 77 ou 80 horas para a solução final da extração de amostras de plasma humano contendo HEPA, EDTA ou CPDA, respectivamente. NAP e SUM são estáveis quando mantidos no amostrador automático a temperatura de 5 ± 3 °C durante o período avaliado. A conclusão sobre a EPP foi obtida após análise das amostras extraídas e armazenadas em estudo e verificação de valores de EPR% dentro da faixa de $\pm 15\%$ do valor nominal em relação à média das concentrações obtidas e de CV% inferiores a 15% para todas as amostras de CQB e CQA analisadas. Todas as concentrações obtidas foram incluídas no cálculo da média. Os desvios das médias das concentrações calculadas em cada um dos tipos de matriz analisados possuem valores próximos entre si e abaixo do limite preconizado, indicando que o tipo de anticoagulante utilizado na coleta de sangue, HEPA, EDTA ou CPDA, não influencia na EPP de NAP e SUM em plasma humano. Os dados obtidos na avaliação da EPP para NAP e SUM nas três validações estão descritos na Tabela 25.

Tabela 25 – Dados obtidos na avaliação da EPP para NAP e SUM nas três validações.

NAP						
Parâmetro	HEPA		EDTA		CPDA	
	CQB	CQA	CQB	CQA	CQB	CQA
Conc. média (ng/mL)	7369,23	125666,03	6615,19	123118,14	7451,39	119856,23
CV%	3,57	10,21	2,82	3,10	9,03	3,24
EPR%	-1,74	14,24	-11,80	11,93	-0,65	8,96
SUM						
Parâmetro	HEPA		EDTA		CPDA	
	CQB	CQA	CQB	CQA	CQB	CQA
Conc. média (ng/mL)	2,86	39,75	2,73	37,13	2,89	42,01
CV%	7,17	2,54	5,06	3,44	6,31	3,72
EPR%	-4,63	-0,62	-9,02	-7,18	-3,60	5,02

Durante a validação e a aplicação do método nenhuma amostra de plasma contendo os analitos foi mantida no amostrador automático a 5 ± 3 °C, desde o término da extração até a análise da última amostra da corrida analítica, por um período superior a 55, 77 ou 80 horas, para plasma contendo HEPA, EDTA ou CPDA, respectivamente: condições de estabilidade validadas em cada uma das três validações.

5.3.7 Estabilidade dos analitos e PIs em solução

5.3.7.1 Estabilidade à temperatura de trabalho

NAP e SUM são estáveis em solução por no mínimo 7 horas e ACE e NAR por no mínimo 8 horas, quando as soluções são mantidas a 22 ± 2 °C. A conclusão sobre a ESS à temperatura de trabalho foi obtida após verificação de variações inferiores a 10%, além de CV% inferiores a 15% para todas as amostras analisadas. Os dados obtidos na avaliação da ESS a temperatura de trabalho para NAP, ACE, SUM e NAR estão descritos na Tabela 26.

Tabela 26 – Dados obtidos na avaliação da ESS à temperatura de trabalho de 22 ± 2 °C para NAP, ACE, SUM e NAR.

Parâmetro	NAP				ACE	
	LIQ recente	LIQ teste	LSQ recente	LSQ teste	PI recente	PI teste
Área média	153104	146298	6411529	6583903	344119	364746
CV%	3,56	5,83	0,67	3,21	2,74	2,89
Variação%	-4,45		2,69		5,99	
Parâmetro	SUM				NAR	
	LIQ recente	LIQ teste	LSQ recente	LSQ teste	PI recente	PI teste
Área média	40	39	2251	2209	6716	6723
CV%	11,37	12,01	4,40	0,86	1,40	3,45
Variação (%)	-0,84		-1,85		0,11	

As soluções utilizadas no preparo e na análise de todas as amostras da validação e da aplicação do estudo foram mantidas a 22 ± 2 °C, por um período inferior ao determinado pela ESS à temperatura de trabalho.

5.3.7.2 Estabilidade a temperatura de armazenamento

As soluções de NAP, SUM, ACE e NAR são estáveis por no mínimo 18 dias, quando mantidas a 5 ± 3 °C. A conclusão sobre a ESS à temperatura de armazenamento foi obtida após verificação de variações inferiores a 10%, além de CV% inferiores a 15% para todas as amostras analisadas. Os dados obtidos na avaliação da ESS a temperatura de armazenamento para NAP, ACE, SUM e NAR estão descritos na Tabela 27.

Tabela 27 – Dados obtidos na avaliação da ESS à temperatura de armazenamento de 5 ± 3 °C para NAP, ACE, SUM e NAR.

Parâmetro	NAP				ACE	
	LIQ recente	LIQ teste	LSQ recente	LSQ teste	PI recente	PI teste
Área média	122297	112371	7482100	7282548	401773	423321
CV%	6,09	3,28	5,39	5,01	7,89	8,89
Variação%	-8,12		-2,67		5,36	
Parâmetro	SUM				NAR	
	LIQ recente	LIQ teste	LSQ recente	LSQ teste	PI recente	PI teste
Área média	35	38	1422	1472	6095	6390
CV%	3,33	5,53	2,07	6,17	5,85	2,02
Variação (%)	8,65		3,54		4,83	

As soluções utilizadas no preparo e na análise de todas as amostras da validação e da aplicação do estudo foram mantidas a 5 ± 3 °C, por um período inferior ao determinado pela ESS a temperatura de armazenamento.

5.4 Estudo de avaliação farmacocinética simultânea de naproxeno sódico 275 mg e de succinato de sumatriptano 50 mg sob a forma de comprimidos revestidos.

5.4.1 Etapa clínica

Todos os quatro voluntários recrutados e selecionados para o estudo compareceram a Unidade Clínica do ICF na data e horário programados, cumprindo com todos os critérios de inclusão e não apresentando qualquer um dos critérios de exclusão, conforme verificado durante a avaliação clínica e através dos exames laboratoriais e

eletrocardiograma. Dessa forma, todos os indivíduos inclusos no estudo foram considerados saudáveis, por apresentarem os parâmetros clínico-laboratoriais dentro dos limites aceitáveis. Os dados antropométricos individuais da população de voluntários sadios que participaram do estudo e os dados antropométricos populacionais estão descritos na Tabela 28.

Tabela 28 – Dados antropométricos individuais da população de voluntários sadios que participaram do estudo e os dados antropométricos populacionais.

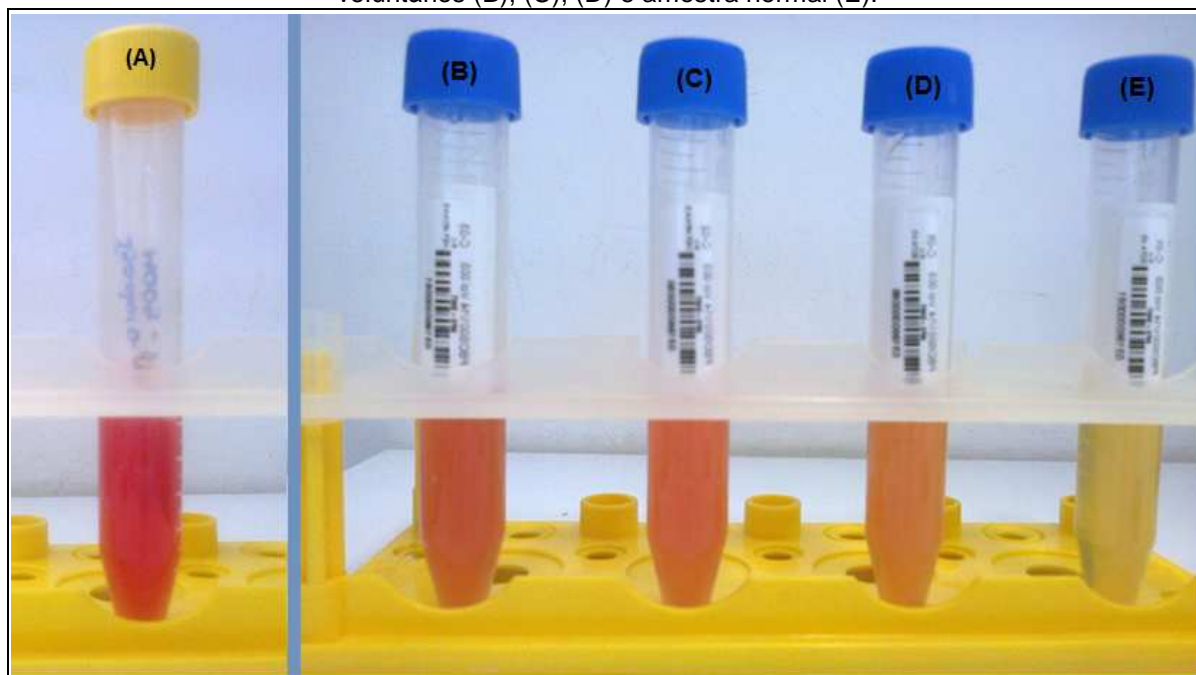
Voluntário	Sexo	Idade	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m²)
1	Masculino	31	79,00	1,70	27,34
2	Masculino	24	62,25	1,66	22,59
3	Feminino	35	69,00	1,63	25,97
4	Feminino	24	55,70	1,62	21,22
Média	-	28	66,49	1,65	24,28
Mínimo	-	24	55,70	1,62	21,22
Máximo	-	35	79,00	1,70	27,34

Não foi observada nenhuma intercorrência durante a execução da etapa clínica do estudo, como eventos adversos, atrasos significativos na administração dos medicamentos ou nas coletas.

5.4.2 Etapa analítica

Antes do início da análise foi verificada a existência de amostras de voluntários com hemólise ou lipemia. Não foram verificadas amostras turvas, indicando grau elevado de lipemia e, embora algumas amostras estivessem hemolisadas, o nível de hemólise foi inferior ao validado através do ensaio de seletividade, permitindo a análise dessas amostras sem que houvesse prejuízo à qualidade e confiabilidade dos resultados. A intensidade da hemólise nas amostras dos voluntários e no plasma utilizado na validação pode ser verificada na Figura 17.

Figura 17 – Intensidade da hemólise no plasma utilizado na validação (A) e nas amostras dos voluntários (B), (C), (D) e amostra normal (E).



As amostras dos voluntários foram processadas e analisadas seguindo rigorosamente os procedimentos de preparo de amostra, separação e detecção validadas, não sendo submetidas a condições fora dos limites aprovados nos ensaios da validação, incluindo os ensaios de estabilidade dos analitos em plasma e em solução. A corrida analítica foi aprovada de acordo com os critérios estabelecidos pela Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012. Os desvios de todos os CQ foram inferiores a 15%. Como exemplo, cromatogramas obtidos para amostras de plasma com HEPA ou EDTA do voluntário 2 no tempo de 2:30 horas após administração dos medicamentos estão representados na Figura 18. As equações das retas e os respectivos coeficientes de determinação (r^2) obtidos para as três curvas de calibração estão descritos na Tabela 29. Os dados obtidos para construção curvas de calibração de NAP e SUM nas três matrizes estão descritos na Tabela 30.

Figura 18 – Cromatogramas obtidos para as amostras de plasma com HEPA (A) ou EDTA (B) do voluntário 2 no tempo de 2:30 horas após administração dos medicamentos.

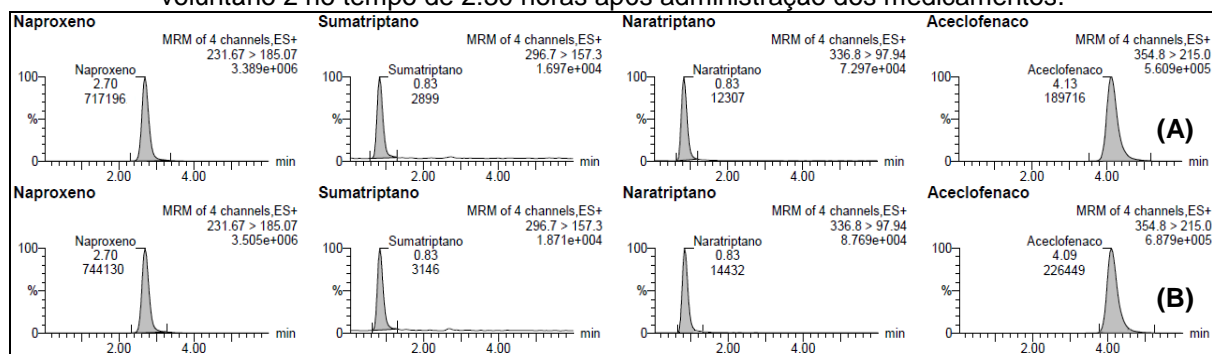


Tabela 29 – Equações das retas e respectivos coeficientes de determinação obtidos para as três curvas de calibração.

HEPA			
NAP		SUM	
Equação da reta	r^2	Equação da reta	r^2
$y = 1,62 \times 10^{-4}x - 8,31 \times 10^{-2}$	0,98825	$y = 4,53 \times 10^{-3}x + 8,94 \times 10^{-4}$	0,99764
EDTA			
NAP		SUM	
Equação da reta	r^2	Equação da reta	r^2
$y = 1,65 \times 10^{-4}x - 9,89 \times 10^{-2}$	0,98732	$y = 4,68 \times 10^{-3}x + 5,18 \times 10^{-4}$	0,99837
CPDA			
NAP		SUM	
Equação da reta	r^2	Equação da reta	r^2
$y = 1,80 \times 10^{-4}x - 1,07 \times 10^{-1}$	0,99231	$y = 4,04 \times 10^{-3}x + 2,66 \times 10^{-3}$	0,99741

Tabela 30 – Dados obtidos para construção das primeiras curvas de calibração de NAP e SUM nas três validações.

NAP						
Concentração nominal (ng/mL)	HEPA		EDTA		CPDA	
	Concentração calculada (ng/mL)	Desvio (%)	Concentração calculada (ng/mL)	Desvio (%)	Concentração calculada (ng/mL)	Desvio (%)
2500,00	2572,63	2,91	2578,09	3,12	2631,58	5,26
2500,00	2563,65	2,55	2661,84	6,47	2631,47	5,26
5000,00	5283,24	5,66	4794,56	-4,11	4708,44	-5,83
5000,00	4923,27	-1,53	4691,04	-6,18	4658,86	-6,82
10000,00	8667,91	-13,32	8837,13	-11,63	8682,39	-13,18
10000,00	8804,22	-11,96	10043,85	0,44	9733,45	-2,67
25000,00	23068,36	-7,73	22497,97	-10,01	25200,38	0,80
25000,00	22036,52	-11,85	22103,53	-11,59	23172,41	-7,31
50000,00	52039,15	4,08	48867,41	-2,27	48843,79	-2,31
50000,00	48074,62	-3,85	45871,91	-8,26	48046,27	-3,91
90000,00	93718,37	4,13	103082,56	14,54	95398,48	6,00
90000,00	94275,32	4,75	96262,55	6,96	99020,40	10,02
130000,00	148233,15	14,03	145644,55	12,03	141829,78	9,10
130000,00	145785,60	12,14	143607,71	10,47	137255,95	5,58
SUM						
Concentração nominal (ng/mL)	HEPA		EDTA		CPDA	
	Concentração calculada (ng/mL)	Desvio (%)	Concentração calculada (ng/mL)	Desvio (%)	Concentração calculada (ng/mL)	Desvio (%)
1,00	1,50	50,40 ¹	0,98	-1,68	1,02	1,54
1,00	1,00	0,06	1,14	14,18	0,96	-3,64
2,50	2,69	7,44	2,43	-2,93	2,42	-3,34
2,50	2,48	-0,90	2,51	0,44	2,41	-3,71
5,00	5,16	3,24	4,55	-8,90	4,77	-4,60
5,00	5,42	8,46	4,80	-3,93	5,37	7,49
10,00	9,27	-7,28	10,13	1,30	10,13	1,31
10,00	8,89	-11,07	9,93	-0,68	10,23	2,29
20,00	20,81	4,04	19,48	-2,58	19,95	-0,27
20,00	18,53	-7,35	21,17	5,85	19,99	-0,07
35,00	35,42	1,21	35,89	2,55	37,02	5,77
35,00	34,43	-1,64	33,17	-5,22	37,03	5,80
50,00	51,32	2,65	51,34	2,69	48,69	-2,61
50,00	50,58	1,15	49,45	-1,09	47,01	-5,97

¹ Valor excluído do cálculo por apresentar desvio superior a 20% em relação ao valor nominal.

5.4.3 Etapa estatística

A escolha do tamanho amostral (N) foi feita considerando que o principal objetivo do estudo foi a determinação dos impactos da utilização de anticoagulantes diferentes nas amostras dos voluntários e nas amostras da curva de calibração sobre as concentrações calculadas a partir da equação da reta. O N de 4 voluntários sadios foi considerado estatisticamente adequado, já que o delineamento do estudo foi do tipo monocêntrico, aberto, prospectivo, com um tratamento e em um período, de modo que as comparações dos diferentes anticoagulantes foram, principalmente intraindividuais, pois as concentrações de NAP e SUM nas amostras de um mesmo voluntário processadas em uma única sequência analítica foram calculadas a partir de três curvas de calibração preparadas com plasma contendo heparina, EDTA ou CPDA. Além disso, as amostras de plasma contendo HEPA ou EDTA foram coletadas quase simultaneamente em cada tempo de coleta, sendo sempre mantida a mesma ordem de coleta. Desse modo, embora o N tenha sido de apenas 4 voluntários sadios, deve ser levado em consideração o número total de amostras obtido (96 amostras), o que justifica a significância estatística do estudo.

O cronograma de coleta também foi elaborado considerando o objetivo principal do estudo, não sendo a determinação de todos os parâmetros farmacocinéticos o foco do estudo, mas sim a obtenção de concentrações plasmáticas próximas a $C_{m\acute{a}x}$ para os dois fármacos, de modo a permitir que os impactos da utilização de anticoagulantes diferentes nas amostras dos voluntários e nas amostras da curva de calibração sejam verificados em toda a possível faixa de concentração de NAP e SUM nas amostras de voluntários em um estudo de biodisponibilidade/bioequivalência. Como a $T_{1/2}$ de NAP é muito superior a de SUM, a coleta por até 6 horas após a administração dos medicamentos permitiu o cálculo das K_{El} , $ASC_{0-\infty}$ e $T_{1/2}$ apenas para SUM.

Nas Tabelas 31, 32, 33 e 34 estão descritas as concentrações plasmáticas individuais de NAP e SUM calculadas a partir de cada uma das três curvas de calibração (HEPA, EDTA, CPDA) em cada tempo de coleta para as amostras coletadas em HEPA ou EDTA.

Tabela 31 – Concentrações plasmáticas individuais de NAP calculadas a partir de cada uma das três curvas de calibração (HEPA, EDTA, CPDA) em cada tempo de coleta para as amostras coletadas em HEPA.

Tempo de Coleta (h)	Curva em plasma com HEPA				Curva em plasma com EDTA				Curva em plasma com CPDA			
	Concentração calculada (ng/mL)				Concentração calculada (ng/mL)				Concentração calculada (ng/mL)			
	Vol 1	Vol 2	Vol 3	Vol 4	Vol 1	Vol 2	Vol 3	Vol 4	Vol 1	Vol 2	Vol 3	Vol 4
0,00	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ
0,25	5200,06	17654,84	3271,10	37099,09	5197,49	17415,97	3305,13	36491,31	4816,53	16036,16	3078,86	33552,10
0,50	8275,33	24840,98	8739,69	61515,79	8214,41	24465,77	8669,96	60444,76	7586,82	22509,63	8005,13	55547,36
1,00	14064,62	30315,18	16413,81	48876,62	13893,86	29836,11	16198,49	48045,39	12801,97	27440,95	14918,20	44161,63
1,50	14668,93	23151,75	23234,07	41566,76	14486,71	22808,59	22889,35	40874,22	13346,36	20987,93	21062,09	37576,70
2,00	15250,66	22773,85	27746,60	39734,93	15057,41	22437,86	27316,27	39077,14	13870,40	20647,50	25127,10	35926,53
2,50	21385,71	23840,80	28901,49	35512,00	21076,05	23484,56	28449,24	34934,33	19397,02	21608,64	26167,46	32122,40
3,00	23037,84	22364,16	33286,16	36257,88	22696,84	22035,94	32750,72	35666,06	20885,31	20278,45	30117,29	32794,30
3,50	21796,87	28317,17	31842,41	32189,53	21479,42	27876,00	31334,37	31674,89	19767,41	25641,08	28816,73	29129,42
4,00	20563,37	30398,55	37583,26	33081,72	20269,32	29917,90	36966,30	32550,16	18656,24	27516,05	33988,25	29933,13
5,00	30544,80	35187,78	33697,88	32046,98	30061,37	34616,26	33154,63	31535,05	27647,80	31830,33	30488,18	29001,01
6,00	23104,67	26734,45	28121,55	24434,75	22762,40	26323,32	27684,10	24067,24	20945,52	24215,33	25464,86	22143,69

Tabela 32 – Concentrações plasmáticas individuais de NAP calculadas a partir de cada uma das três curvas de calibração (HEPA, EDTA, CPDA) em cada tempo de coleta para as amostras coletadas em EDTA.

Tempo de Coleta (h)	Curva em plasma com HEPA				Curva em plasma com EDTA				Curva em plasma com CPDA			
	Concentração calculada (ng/mL)				Concentração calculada (ng/mL)				Concentração calculada (ng/mL)			
	Vol 1	Vol 2	Vol 3	Vol 4	Vol 1	Vol 2	Vol 3	Vol 4	Vol 1	Vol 2	Vol 3	Vol 4
0,00	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ
0,25	4200,62	14947,12	3157,31	31973,55	4217,01	14759,62	3193,50	31463,01	3916,20	13596,96	2976,36	28934,85
0,50	7719,51	22988,78	10340,54	62024,95	7669,14	22648,71	10240,44	60944,26	7086,12	20841,12	9447,22	56006,03
1,00	11554,54	26743,09	15256,34	48968,87	11431,41	26331,79	15062,97	48135,89	10540,83	24223,11	13875,51	44244,74
1,50	13074,06	25047,39	23414,82	42426,30	12922,10	24668,27	23066,67	41717,45	11909,66	22695,58	21224,91	38351,00
2,00	13715,65	20786,20	28257,99	37493,17	13551,52	20487,92	27817,95	36877,91	12487,62	18856,97	25587,77	33907,09
2,50	21332,82	20790,58	29375,41	36248,25	21024,17	20492,22	28914,17	35656,61	19349,38	18860,92	26594,38	32785,63
3,00	19600,77	22395,51	32927,44	32594,71	19324,98	22066,70	32398,81	32072,39	17789,11	20306,69	29794,15	29494,42
3,50	18518,09	26555,81	33450,73	30678,89	18262,84	26148,06	32912,17	30192,92	16813,79	24054,40	30265,55	27768,59
4,00	17999,24	27775,67	36617,08	30640,51	17753,84	27344,78	36018,45	30155,27	16346,40	25153,29	33117,89	27734,02
5,00	25017,09	31519,12	30644,83	26796,41	24638,54	31017,21	30159,50	26384,10	22668,28	28525,50	27737,91	24271,14
6,00	21143,13	25871,89	25996,97	24143,73	20838,08	25477,12	25599,83	23781,74	19178,50	23438,30	23550,98	21881,53

Tabela 33 – Concentrações plasmáticas individuais de SUM calculadas a partir de cada uma das três curvas de calibração (HEPA, EDTA, CPDA) em cada tempo de coleta para as amostras coletadas em HEPA.

Tempo de Coleta (h)	Curva em plasma com HEPA				Curva em plasma com EDTA				Curva em plasma com CPDA			
	Concentração calculada (ng/mL)				Concentração calculada (ng/mL)				Concentração calculada (ng/mL)			
	Vol 1	Vol 2	Vol 3	Vol 4	Vol 1	Vol 2	Vol 3	Vol 4	Vol 1	Vol 2	Vol 3	Vol 4
0,00	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ
0,25	5,65	20,77	2,41	2,86	5,55	20,19	2,42	2,85	5,89	22,83	2,27	2,77
0,50	16,70	63,68	16,65	41,03	16,25	61,74	16,21	39,81	18,27	70,90	18,22	45,53
1,00	32,49	45,27	38,50	50,01	31,54	43,91	37,36	48,51	35,96	50,28	42,69	55,59
1,50	20,77	30,31	24,29	36,19	20,20	29,43	23,60	35,13	22,84	33,52	26,78	40,11
2,00	14,78	34,71	37,81	35,40	14,39	33,69	36,69	34,36	16,12	38,45	41,92	39,23
2,50	21,55	51,80	55,98	36,10	20,95	50,24	54,29	35,03	23,71	57,59	62,28	40,00
3,00	24,12	46,87	52,66	22,97	23,44	45,46	51,07	22,32	26,59	52,07	58,56	25,30
3,50	29,39	41,04	46,16	23,13	28,54	39,82	44,78	22,48	32,49	45,54	51,27	25,48
4,00	28,45	40,59	30,88	17,32	27,63	39,39	29,99	16,85	31,44	45,04	34,16	18,97
5,00	13,10	24,73	14,28	7,09	12,76	24,03	13,91	6,95	14,23	27,27	15,56	7,51
6,00	9,95	15,72	10,91	5,31	9,72	15,30	10,64	5,22	10,71	17,17	11,78	5,51

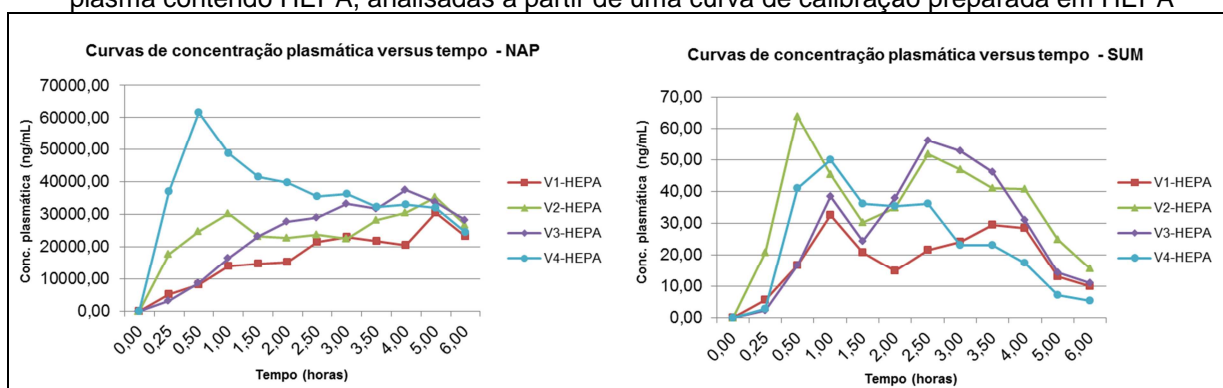
Tabela 34 – Concentrações plasmáticas individuais de SUM calculadas a partir de cada uma das três curvas de calibração (HEPA, EDTA, CPDA) em cada tempo de coleta para as amostras coletadas em EDTA.

Tempo de Coleta (h)	Curva em plasma com HEPA				Curva em plasma com EDTA				Curva em plasma com CPDA			
	Concentração calculada (ng/mL)				Concentração calculada (ng/mL)				Concentração calculada (ng/mL)			
	Vol 1	Vol 2	Vol 3	Vol 4	Vol 1	Vol 2	Vol 3	Vol 4	Vol 1	Vol 2	Vol 3	Vol 4
0,00	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ
0,25	3,65	15,51	2,28	2,59	3,61	15,10	2,29	2,58	3,65	16,94	2,12	2,46
0,50	21,11	63,51	18,72	38,08	20,52	61,58	18,21	36,96	23,21	70,71	20,54	42,23
1,00	33,00	47,88	38,24	59,57	32,04	46,45	37,11	57,76	36,53	53,21	42,41	66,30
1,50	22,89	34,25	26,43	37,23	22,24	33,25	25,67	36,13	25,20	37,94	29,17	41,27
2,00	15,93	39,87	40,16	38,41	15,51	38,68	38,97	37,27	17,41	44,23	44,56	42,59
2,50	25,35	47,92	54,01	38,06	24,63	46,48	52,38	36,94	27,96	53,25	60,07	42,20
3,00	27,83	52,81	51,92	23,10	27,03	51,22	50,36	22,45	30,74	58,73	57,73	25,44
3,50	31,22	52,03	48,22	21,70	30,31	50,47	46,77	21,09	34,53	57,86	53,58	23,87
4,00	28,88	48,11	32,50	17,82	28,05	46,67	31,55	17,33	31,92	53,46	35,97	19,53
5,00	16,38	29,82	16,88	7,25	15,94	28,95	16,43	7,10	17,91	32,97	18,47	7,69
6,00	8,44	15,22	11,02	4,72	8,25	14,82	10,75	4,65	9,01	16,61	11,91	4,85

Através da análise dos dados apresentados nas Tabelas 31, 32, 33 e 34 é possível verificar que em todas as amostras pré-dose (tempo 0,00 horas) foram obtidas concentrações inferiores ao LIQ, indicando que NAP e SUM não foram consumidos pelos voluntários por um período no mínimo igual ao período de *washout* (período para eliminação completa do fármaco da circulação sanguínea) e que outros possíveis interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos não estavam presentes.

O voluntário 4 apresentou comportamento farmacocinético discrepante, principalmente para NAP, nas três curvas analisadas, tanto para as amostras coletadas em HEPA quanto para as coletadas em EDTA. Entretanto, optou-se por não excluir esse voluntário dos cálculos dos parâmetros farmacocinéticos devido a: ausência de evidências clínicas e analíticas que justifiquem a exclusão do voluntário ou mesmo a reanálise das amostras correspondentes; ampla variação nos $T_{\text{máx}}$ descritos na literatura; e baixo N do estudo, de tal modo que a exclusão de um voluntário teria um grande impacto nos cálculos estatísticos. Como exemplo, as curvas de concentração plasmática *versus* tempo para NAP e SUM em amostras de plasma contendo HEPA, analisadas a partir de uma curva de calibração preparada em HEPA estão representadas na Figura 19.

Figura 19 – Curvas de concentração plasmática *versus* tempo para NAP e SUM em amostras de plasma contendo HEPA, analisadas a partir de uma curva de calibração preparada em HEPA



Também pôde ser observado nas Tabelas 33 e 34 que, em algumas amostras, a concentração plasmática obtida para SUM está acima do LSQ validado (50,00 ng/mL). O número de amostras com concentrações acima do LSQ, calculadas a partir das curvas de calibração em plasma com HEPA, EDTA ou CPDA, corresponde

a 11,5%, 10,41% e 18,71% do total de amostras do estudo, respectivamente. De acordo com a Resolução RE nº 1170 de 19 de abril de 2006, no máximo 20% do total de amostras em estudo podem ser reanalisadas. Desse modo, embora essas concentrações fora da faixa de trabalho tenham sido inclusas nos cálculos dos dados estatísticos apresentados nesse trabalho, a reanálise das amostras com essas concentrações, utilizando o procedimento de diluição validado, já está programada para confirmação de que esses desvios não tem impacto sobre as conclusões estatísticas e farmacocinéticas obtidas. Além da reanálise, será feita uma validação parcial, incluindo linearidade, precisão e exatidão de uma faixa de trabalho mais ampla (1,00 a 100 ng/mL) para SUM e efeito residual para o novo LSQ.

Para realização da comparação entre as concentrações plasmáticas de NAP e SUM nas amostras de plasma de voluntários com HEPA ou EDTA calculadas a partir das três curvas de calibração avaliadas, foram determinadas as concentrações plasmáticas médias e os respectivos valores de CV% (Tabelas 35 e 36). As curvas de concentração plasmática média *versus* tempo obtidas a partir dessa análise estão representadas na Figura 20.

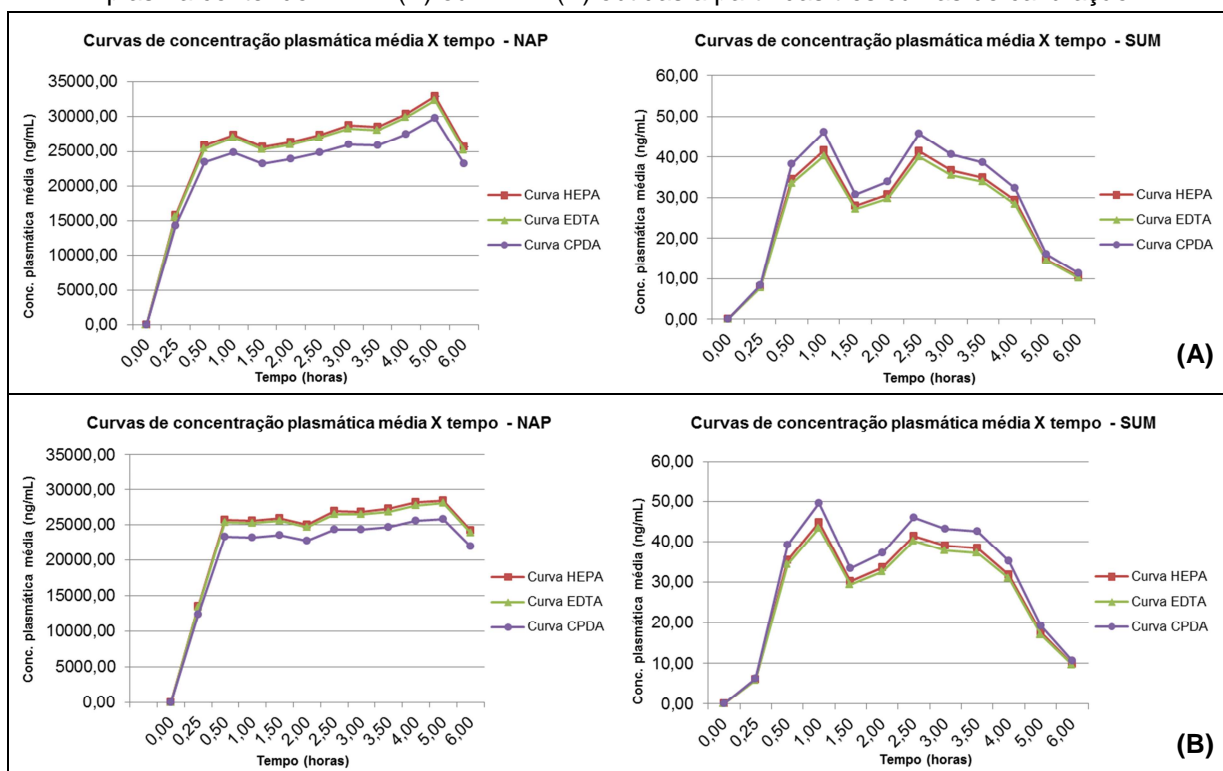
Tabela 35 – Concentrações plasmáticas médias de NAP nas amostras de plasma de voluntários com HEPA ou EDTA calculadas a partir das três curvas de calibração.

Tempo de Coleta (h)	Concentrações médias das amostras de plasma com HEPA (ng/mL)				Concentrações médias das amostras de plasma com EDTA (ng/mL)			
	Curva em HEPA	Curva em EDTA	Curva em CPDA	CV%	Curva em HEPA	Curva em EDTA	Curva em CPDA	CV%
0h	<LIQ	<LIQ	<LIQ	-	<LIQ	<LIQ	<LIQ	-
0h15	15806,27	15602,48	14370,91	5,09	13569,65	13408,28	12356,09	5,03
0h30	25842,94	25448,72	23412,23	5,24	25768,45	25375,64	23345,12	5,24
1h	27417,56	26993,46	24830,69	5,25	25630,71	25240,52	23221,05	5,24
1h30	25655,38	25264,72	23243,27	5,24	25990,64	25593,62	23545,29	5,24
2h	26376,51	25972,17	23892,89	5,24	25063,25	24683,82	22709,86	5,23
2h30	27410,00	26986,05	24823,88	5,25	26936,77	26521,79	24397,58	5,25
3h	28736,51	28287,39	26018,84	5,26	26879,61	26465,72	24346,09	5,25
3h30	28536,49	28091,17	25838,66	5,26	27300,88	26879,00	24725,58	5,25
4h	30406,72	29925,92	27523,42	5,27	28258,13	27818,08	25587,90	5,26
5h	32869,36	32341,83	29741,83	5,29	28494,36	28049,84	25800,71	5,26
6h	25598,85	25209,27	23192,35	5,24	24288,93	23924,19	22012,33	5,22

Tabela 36 – Concentrações plasmáticas médias de SUM nas amostras de plasma de voluntários com HEPA ou EDTA calculadas a partir das três curvas de calibração.

Tempo de Coleta (h)	Concentrações médias das amostras de plasma com HEPA (ng/mL)				Concentrações médias das amostras de plasma com EDTA (ng/mL)			
	Curva em HEPA	Curva em EDTA	Curva em CPDA	CV%	Curva em HEPA	Curva em EDTA	Curva em CPDA	CV%
0h	<LIQ	<LIQ	<LIQ	-	<LIQ	<LIQ	<LIQ	-
0h15	7,92	7,75	8,44	4,45	6,01	5,90	6,29	3,37
0h30	34,52	33,50	38,23	7,03	35,36	34,32	39,17	7,05
1h	41,57	40,33	46,13	7,16	44,67	43,34	49,61	7,20
1h30	27,89	27,09	30,81	6,85	30,20	29,33	33,40	6,92
2h	30,68	29,78	33,93	6,93	33,59	32,61	37,20	7,01
2h30	41,36	40,13	45,89	7,16	41,34	40,11	45,87	7,15
3h	36,65	35,57	40,63	7,07	38,91	37,76	43,16	7,12
3h30	34,93	33,90	38,70	7,04	38,29	37,16	42,46	7,10
4h	29,31	28,46	32,40	6,89	31,83	30,90	35,22	6,97
5h	14,80	14,41	16,14	6,01	17,58	17,11	19,26	6,29
6h	10,47	10,22	11,29	5,27	9,85	9,62	10,59	5,11

Figura 20 – Curvas de concentração plasmática média *versus* tempo para NAP e SUM em amostras de plasma contendo HEPA (A) ou EDTA (B) obtidas a partir das três curvas de calibração.



Como pode ser observado nos dados apresentados nas Tabelas 35 e 36, as concentrações plasmáticas médias calculadas a partir das três curvas de calibração

possuem valores muito próximos entre si, resultando em um CV% relativamente baixo. Os perfis farmacocinéticos de NAP e SUM obtidos a partir das curvas de calibração em plasma com HEPA ou EDTA são extremamente semelhantes, praticamente sobrepondo-se. A diferença um pouco maior observada entre HEPA/EDTA e CPDA pode ser devido ao pH ligeiramente inferior (aproximadamente 7 para CPDA e 8 para HEPA e EDTA) do plasma contendo a solução de CPDA. Essa hipótese também justifica o posicionamento inferior às curvas de concentração plasmática *versus* tempo obtidas a partir das curvas de calibração em plasma com HEPA ou EDTA para NAP e superior para SUM, uma vez que esses fármacos possuem caracteres iônicos opostos.

Através da análise dos dados apresentados na Figura 20 é possível verificar que SUM apresenta dois máximos de concentração em torno de 1,00 e 2,50 horas, respectivamente. Não foram encontrados dados na literatura que comprovem a causa desse comportamento, mas algumas hipóteses que podem justificar o perfil farmacocinético apresentado são ocorrência de circulação enterohepática ou absorção em dois momentos distintos no trato gastrointestinal.

Todos os parâmetros farmacocinéticos de NAP e SUM ($C_{m\acute{a}x}$, $T_{m\acute{a}x}$, ASC_{0-t} , K_{EI} , $ASC_{0-\infty}$ e $T_{1/2}$) foram determinados para cada indivíduo, a partir das três curvas de calibração avaliadas, sendo posteriormente calculadas as médias, mínimos, máximos e realizada a ANOVA com um α de 0,05. Os valores de $C_{m\acute{a}x}$ e de $T_{m\acute{a}x}$ consistem na média aritmética dos valores máximos obtidos para cada voluntário. A ASC_{0-t} foi calculada através do método dos trapézóides e a K_{EI} foi obtida pela aplicação do modelo de regressão linear às concentrações plasmáticas correspondentes à fase de eliminação de SUM (últimos 4 tempos de coleta), sendo a inclinação obtida correspondente ao valor da K_{EI} . A $T_{1/2}$ foi obtida através da equação: $T_{1/2} = 0,693 / K_{EI}$ e, para o cálculo da $ASC_{0-\infty}$, foram utilizados os valores da K_{EI} e da ASC_{0-t} , empregando-se a equação: $ASC_{0-\infty} = ASC_{0-t} + C_t / K_{EI}$, onde C_t é a última concentração do fármaco determinada acima do LIQ. Os parâmetros farmacocinéticos calculados a partir das três curvas de calibração para NAP e SUM em plasma com HEPA ou EDTA estão descritos nas Tabelas 37, 38 e 39.

Tabela 37 – Parâmetros farmacocinéticos calculados a partir das três curvas de calibração para NAP em plasma com HEPA ou EDTA.

Dados para NAP em amostras de plasma de voluntários com HEPA									
Voluntário	C_{máx} HEPA (ng/mL)	C_{máx} EDTA (ng/mL)	C_{máx} CPDA (ng/mL)	T_{máx} HEPA (h)	T_{máx} EDTA (h)	T_{máx} CPDA (h)	ASC_{0-t} HEPA (ng.h/mL)	ASC_{0-t} EDTA (ng.h/mL)	ASC_{0-t} CPDA (ng.h/mL)
1	30544,80	30061,37	27647,80	5,00	5,00	5,00	117025	115369	106196
2	35187,78	34616,26	31830,33	5,00	5,00	5,00	160464	157985	145327
3	37583,26	36966,30	33988,25	4,00	4,00	4,00	160754	158268	145588
4	61515,79	60444,76	55547,36	0,50	0,50	0,50	218488	214907	197596
Média	41207,91	40522,17	37253,43	3,63	3,63	3,63	164183	161632	148677
Mínimo	30544,80	30061,37	27647,80	0,50	0,50	0,50	117025	115369	106196
Máximo	61515,79	60444,76	55547,36	5,00	5,00	5,00	218488	214907	197596
F_{calculado}	0,10070			0,00000			0,17258		
F_{crítico}	4,25649			4,25649			4,25649		
Dados para NAP em amostras de plasma de voluntários com EDTA									
Voluntário	C_{máx} HEPA (ng/mL)	C_{máx} EDTA (ng/mL)	C_{máx} CPDA (ng/mL)	T_{máx} HEPA (h)	T_{máx} EDTA (h)	T_{máx} CPDA (h)	ASC_{0-t} HEPA (ng.h/mL)	ASC_{0-t} EDTA (ng.h/mL)	ASC_{0-t} CPDA (ng.h/mL)
1	25017,09	24638,54	22668,28	5,00	5,00	5,00	101931	100562	92599
2	31519,12	31017,21	28525,50	5,00	5,00	5,00	148804	146545	134823
3	36617,08	36018,45	33117,89	4,00	4,00	4,00	157115	154698	142310
4	62024,95	60944,26	56006,03	0,50	0,50	0,50	207306	203938	187524
Média	38794,56	38154,61	35079,42	3,63	3,63	3,63	153789	151436	139314
Mínimo	25017,09	24638,54	22668,28	0,50	0,50	0,50	101931	100562	92599
Máximo	62024,95	60944,26	56006,03	5,00	5,00	5,00	207306	203938	187524
F_{calculado}	0,06504			0,00000			0,14009		
F_{crítico}	4,25649			4,25649			4,25649		

Tabela 38 – Parâmetros farmacocinéticos calculados a partir das três curvas de calibração para SUM em plasma com HEPA.

Voluntário	$C_{\text{máx}}$ HEPA (ng/mL)	$C_{\text{máx}}$ EDTA (ng/mL)	$C_{\text{máx}}$ CPDA (ng/mL)	$T_{\text{máx}}$ HEPA (h)	$T_{\text{máx}}$ EDTA (h)	$T_{\text{máx}}$ CPDA (h)	ASC_{0-t} HEPA (ng.h/mL)	ASC_{0-t} EDTA (ng.h/mL)	ASC_{0-t} CPDA (ng.h/mL)
1	32,49	31,54	35,96	1,00	1,00	1,00	119	115	130
2	63,68	61,74	70,90	0,50	0,50	0,50	217	211	241
3	55,98	54,29	62,28	1,00	1,00	1,00	177	172	196
4	50,01	48,51	55,59	2,50	2,50	2,50	141	137	155
Média	50,54	49,02	56,18	1,25	1,25	1,25	163	159	181
Mínimo	32,49	31,54	35,96	0,50	0,50	0,50	119	115	130
Máximo	63,68	61,74	70,90	2,50	2,50	2,50	217	211	241
$F_{\text{calculado}}$	0,30399			0,00000			0,26525		
$F_{\text{crítico}}$	4,25649			4,25649			4,25649		
Voluntário	K_{El} HEPA (h ⁻¹)	K_{El} EDTA (h ⁻¹)	K_{El} CPDA (h ⁻¹)	$T_{1/2}$ HEPA (h)	$T_{1/2}$ EDTA (h)	$T_{1/2}$ CPDA (h)	$ASC_{0-\infty}$ HEPA (ng.h/mL)	$ASC_{0-\infty}$ EDTA (ng.h/mL)	$ASC_{0-\infty}$ CPDA (ng.h/mL)
1	-0,48	-0,48	-0,49	1,44	1,45	1,41	139	136	152
2	-0,41	-0,41	-0,41	1,70	1,71	1,67	256	248	282
3	-0,59	-0,59	-0,60	1,18	1,18	1,15	196	190	216
4	-0,62	-0,62	-0,65	1,12	1,13	1,07	149	145	164
Média	-0,52	-0,52	-0,54	1,36	1,37	1,33	185	180	203
Mínimo	-0,62	-0,62	-0,65	1,12	1,13	1,07	139	136	152
Máximo	-0,41	-0,41	-0,41	1,70	1,71	1,67	256	248	282
$F_{\text{calculado}}$	0,03121			0,02330			0,20361		
$F_{\text{crítico}}$	4,25649			4,25649			4,25649		

Tabela 39 – Parâmetros farmacocinéticos calculados a partir das três curvas de calibração para SUM em plasma com EDTA.

Voluntário	$C_{m\acute{a}x}$ HEPA (ng/mL)	$C_{m\acute{a}x}$ EDTA (ng/mL)	$C_{m\acute{a}x}$ CPDA (ng/mL)	$T_{m\acute{a}x}$ HEPA (h)	$T_{m\acute{a}x}$ EDTA (h)	$T_{m\acute{a}x}$ CPDA (h)	ASC_{0-t} HEPA (ng.h/mL)	ASC_{0-t} EDTA (ng.h/mL)	ASC_{0-t} CPDA (ng.h/mL)
1	33,00	32,04	36,53	1,00	1,00	1,00	129	126	142
2	63,51	61,58	70,71	0,50	0,50	0,50	239	232	265
3	54,01	52,38	60,07	1,00	1,00	1,00	184	179	203
4	59,57	57,76	66,30	2,50	2,50	2,50	147	143	162
Média	52,52	50,94	58,40	1,25	1,25	1,25	175	170	193
Mínimo	33,00	32,04	36,53	0,50	0,50	0,50	129	126	142
Máximo	63,51	61,58	70,71	2,50	2,50	2,50	239	232	265
$F_{calculado}$	0,31511			0,00000			0,24622		
$F_{crítico}$	4,25649			4,25649			4,25649		
Voluntário	K_{El} HEPA (h ⁻¹)	K_{El} EDTA (h ⁻¹)	K_{El} CPDA (h ⁻¹)	$T_{1/2}$ HEPA (h)	$T_{1/2}$ EDTA (h)	$T_{1/2}$ CPDA (h)	$ASC_{0-\infty}$ HEPA (ng.h/mL)	$ASC_{0-\infty}$ EDTA (ng.h/mL)	$ASC_{0-\infty}$ CPDA (ng.h/mL)
1	-0,54	-0,54	-0,55	1,28	1,29	1,25	145	141	158
2	-0,50	-0,50	-0,51	1,38	1,39	1,36	269	261	297
3	-0,59	-0,59	-0,60	1,17	1,18	1,15	203	197	223
4	-0,65	-0,64	-0,68	1,07	1,08	1,03	154	150	169
Média	-0,57	-0,57	-0,59	1,23	1,23	1,20	193	187	212
Mínimo	-0,65	-0,64	-0,68	1,07	1,08	1,03	145	141	158
Máximo	-0,50	-0,50	-0,51	1,38	1,39	1,36	269	261	297
$F_{calculado}$	0,09094			0,08023			0,19903		
$F_{crítico}$	4,25649			4,25649			4,25649		

A constatação visual de que os valores dos parâmetros farmacocinéticos obtidos para NAP e SUM nas amostras de plasma com HEPA ou CPDA a partir das curvas de calibração em plasma com HEPA, EDTA ou CPDA são muito semelhantes entre si, foi confirmada através dos resultados obtidos com a ANOVA. A obtenção de todos os valores de $F_{\text{calculado}}$ muito inferiores aos valores de $F_{\text{crítico}}$ indica que não há diferenças estatisticamente significativas entre os parâmetros farmacocinéticos de NAP e SUM nas amostras de plasma com HEPA ou EDTA quando calculados a partir das concentrações plasmáticas obtidas por todas as curvas de calibração avaliadas. Desse modo, é possível afirmar que a quantificação simultânea de NAP e SUM em plasma humano coletado com um anticoagulante diferente daquele utilizado na validação do método bioanalítico e, conseqüentemente, na curva de calibração da corrida analítica da análise das amostras dos voluntários, não impacta sobre os parâmetros farmacocinéticos dos fármacos aqui estudados.

Foram encontrados na literatura estudos de avaliação farmacocinética simultânea de NAP e SUM apenas para a associação em dose-fixa combinada Treximet[®], em que as concentrações de NAP e SUM são, respectivamente, 85 e 500 mg/comprimido. No Brasil, ainda não é comercializada a associação em dose-fixa combinada e as concentrações de NAP e SUM nos medicamentos referência são diferentes: 275 e 550 mg/comprimido para NAP e 50 e 100 mg/comprimido para SUM. Considerando esses fatos e ainda que a associação de NAP e SUM, mesmo em comprimidos distintos é amplamente utilizada no Brasil para tratamento de crises de enxaqueca, a realização desse estudo farmacocinético para quantificação simultânea de NAP e SUM em plasma humano nas concentrações utilizadas na terapêutica é de suma importância, fornecendo um panorama sobre a farmacocinética e biodisponibilidade desses fármacos nessas condições.

5.5 Considerações finais

A obtenção de resultados dentro das especificações estabelecidas como críticas em todos os parâmetros da validação do método nas três validações permite inferir que o tipo de anticoagulante e o tipo de íon associado nas concentrações testadas não afetam a quantificação simultânea de NAP sódico e succinato de SUM em plasma

humano por CLAE-EM/EM com ionização por IES(+) nas condições de ensaio avaliadas. Essa evidência pôde ser confirmada no estudo de avaliação farmacocinética simultânea de NAP sódico 275 mg e de succinato de SUM 50 mg sob a forma de comprimidos revestidos, uma vez que o cálculo das concentrações das amostras dos voluntários a partir de uma curva de calibração com um anticoagulante diferente daquele contido nas amostras, não impactou nos dos valores de $C_{máx}$, $T_{máx}$, ASC_{0-t} , K_{El} , $T_{1/2}$ e $ASC_{0-\infty}$, quando comparados àqueles obtidos a partir de amostras analisadas com uma curva de calibração contendo o mesmo anticoagulante.

A possibilidade de utilização de anticoagulantes diferentes na validação e na aplicação de métodos bioanalíticos, incluindo o uso de plasma obtido a partir de sangue coletado em bolsas, facilita a obtenção de plasma branco e evita a coleta de sangue de voluntários exclusivamente para a validação de métodos, poupando os voluntários e reduzindo gastos dos centros bioanalíticos em despesas com os voluntários e funcionários. Evitar uma revalidação completa no caso de troca do anticoagulante utilizado na coleta leva a uma redução geral no custo do estudo devido à economia de solventes e reagentes, SQRs, materiais consumíveis, equipamento e pessoal. Além disso, considerando que a validade do plasma para uso em humanos é relativamente baixa e que o uso de bolsas vencidas, em geral, não altera drasticamente a composição do plasma, a utilização de plasma de bolsas minimiza o descarte de bolsas de plasma sem uso terapêutico.

Entretanto, em cada método devem ser realizados testes durante o desenvolvimento e/ou validação do método visando assegurar que, para os fármacos em estudo e nas condições analíticas estabelecidas, o uso de anticoagulantes diferentes não impacta na precisão, exatidão, sensibilidade ou seletividade do método, nem na estabilidade dos analitos em plasma. Isso porque, a ocorrência de interferências em um método bioanalítico não depende apenas do tipo de anticoagulante usado ou da condição do plasma (hemólise ou lipemia), mas está intrinsecamente relacionada ao fármaco analisado e às suas características, tais como caráter iônico, coeficiente de partição e taxa de ligação às proteínas plasmáticas.

6 CONCLUSÕES

Um método bioanalítico rápido, simples e eficaz para quantificação simultânea de NAP sódico e succinato de SUM em plasma humano por CLAE-EM/EM com ionização por IES(+) foi desenvolvido. Para otimização dos parâmetros de preparo de amostras foram avaliadas três diferentes técnicas de extração: ELL; EPT e EFS, sendo obtidos melhores resultados com a ELL.

O método desenvolvido foi validado de acordo com a Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 da ANVISA. Foi elaborado um procedimento específico para avaliação do efeito matriz rotacional e translacional, já que esse parâmetro é crucial na avaliação da influência de anticoagulantes em um método bioanalítico e que o procedimento proposto na Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 da ANVISA não abrange todos os aspectos do efeito matriz. Foram realizadas três validações completas, sendo uma para cada matriz avaliada: plasma coletado com heparina sódica, EDTA K₃ ou CPDA. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os plasmas contendo cada um dos anticoagulantes analisados em nenhum dos parâmetros da validação do método. Portanto, utilizando o método bioanalítico desenvolvido, o tipo de anticoagulante (HEPA, EDTA ou CPDA), o tipo de íon associado (sódio ou potássio) e a concentração do íon na solução de anticoagulante não impactam na quantificação simultânea de NAP sódico e succinato de SUM em plasma humano por CLAE-EM/EM com ionização por IES(+).

O método bioanalítico desenvolvido e validado foi aplicado em um estudo de avaliação farmacocinética simultânea de NAP sódico 275 mg e de succinato de SUM 50 mg sob a forma de comprimidos revestidos, para determinação dos impactos da utilização de anticoagulantes diferentes nas amostras dos voluntários e nas amostras da curva de calibração sobre a exatidão das concentrações calculadas a partir da equação da reta. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os valores de $C_{máx}$, $T_{máx}$, ASC_{0-t} , K_{El} , $T_{1/2}$ e $ASC_{0-\infty}$ obtidos na análise de amostras dos voluntários coletadas com um determinado anticoagulante utilizando uma curva de calibração preparada com plasma contendo outro anticoagulante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMINOFF, M.J.; SIMON, R.P.; GREENBERG, D.A. **Clinical neurology**. 7. ed. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2009. p. 85-88.

ANDRIOLO, A.; MARTINS, A.R.; BALLARATI, C.A.F.; BARBOSA, I.V.; MENDES, M.E.; MELO, M.R.; SUMITA, N.M; ROMANO, P.; TRINDADE, P.A. **Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial para Coleta de Sangue Venoso**. 2. ed. Barueri:Editora Manole, 2010. 130 p.

ARDREY, R.E. **Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction**. 1. ed., Chichester: John Wiley & Sons, 2003. 289 p.

BAIN, B.J. Blood sampling and blood film preparation and examination. In: _____. **Blood Cells. A Practical Guide**. 4. ed. Malden: Blackwell Publishing, 2006. p. 1-19.

BANERJEE, S.; MAZUMDAR, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. **International Journal of Analytical Chemistry**, Cairo, v. 2012, p. 1-41, 2012.

BARBANTI, P.; LE PERA, D.; CRUCCU, G. Sumatriptan fast-disintegrating/rapid-release tablets in the acute treatment of migraine. **Expert Review of Neurotherapeutics**, London, v. 7, n. 8, p. 927-934, 2007.

BARTLESON, J.D.; CUTRER, F.M. Migraine update. Diagnosis and treatment. **Minnesota Medicine**, Saint Paul, v. 93, n. 5, p. 36-41, 2010.

BECKER, W.J. The premonitory phase of migraine and migraine management. **Cephalgia: A International Journal of Headache**, New York, v. 33, n. 13, p. 1117-1121, 2012.

BERGES, A.; WALLS, C.; LENER, S.E.; MCDONALD, S.A. Pharmacokinetics and tolerability of sumatriptan after single-dose administration of a fixed-dose combination tablet of sumatriptan/naproxen sodium 85/500 mg followed two hours later by subcutaneous sumatriptan 4- or 6-mg injection: a randomized, open-label, three-period crossover study in healthy volunteers. **Clinical Therapeutics**, Princeton, v. 32, n. 6, p. 1165-1177, 2010.

BHASKAR, V.V.; MIDDHA, A.; TIWARI, S.; SHIVAKUMAR, S. identification and reduction of matrix effects caused by cremophor el in bioanalysis using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques**, Sunnyvale, v. 4, n. 3, p. 1-7, 2013.

BOULTON, D.W.; DUNCAN, G.F.; VACHHARAJANI, N.N. Validation and application of a high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay, for sumatriptan in human plasma. **Biomedical Chromatography**, London, v. 17, n. 1, p. 48-52, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 898, de 29 de maio de 2003. "Guia para planejamento e realização da etapa estatística de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência". **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, jun. 2003b. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT_VERSION&id=3690>. Acesso em: 15 jan. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de Boas Práticas em Biodisponibilidade e Bioequivalência**. 1 ed. v.1. 146 p., Brasília, 2002. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/bioequivalencia/publicacoes/index.asp>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência nacional de vigilância sanitária. **Lista A de medicamentos de referência**. Brasília, 2013a. 24 p. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/referencia/index.htm>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência nacional de vigilância sanitária. **Lista B de medicamentos de referência**. Brasília, 2013b. 10 p. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/referencia/index.htm>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Política Vigente para a Regulamentação de Medicamentos no Brasil**. Brasília, DF, set. 2004. 12 p. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/politica.htm>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 16, de 2 de março de 2007. Aprova o Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, mar. 2007a. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/>>

Inicio/Laboratorios/Assuntos+de+Interesse/Legislacao/Resolucao+da+Diretoria+Colegiada+-+RDC>. Acesso em: 15 jan. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 17, de 2 de março de 2007. Dispõe sobre o registro de Medicamento Similar e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, mar. 2007b. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Laboratorios/Assuntos+de+Interesse/Legislacao/Resolucao+da+Diretoria+Colegiada+-+RDC>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

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, DF, mai. 2003a. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 15 jan. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, mai. 2012. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/564310004b60537e891f9baf8fded4db/RDC+27+12+-+Valida%C3%A7%C3%A3o+de+M%C3%A9todos+Bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

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. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, abr. 2006. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT_VERSION&id=3690>. Acesso em: 15 jan. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 251, de 07 de agosto de 1997. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, set. 1997. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT_VERSION&id=3690>. Acesso em: 15 jan. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, jun. 2013c. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm./2012/res466_12_12_2012.html>. Acesso em: 15 jan. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Lei n. 10.205 de 21 de março de 2001. Regulamenta o § 4º do art. 199 da Constituição Federal, relativo à coleta, processamento, estocagem, distribuição e aplicação do sangue, seus componentes e derivados, estabelece o ordenamento institucional indispensável à execução adequada dessas atividades, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 22 mar. 2001. Seção 1. p. 1. Disponível em: <<http://www2.camara.gov.br/legin/fed/lei/2001/lei-10205-21-marco-2001-364841-publicacaooriginal-1-pl.html>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 1.353 de 13 de junho de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos Hemoterápicos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 jun. 2011. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm./2011/prt1353_13_06_2011.html>. Acesso em: 15 jan. 2014.

BRESSOLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 686, n. 1, p. 3-10, 1996.

BUZZI, M.G.; COLOGNO, D.; FORMISANO, R.; ROSSI, P. Prodromes and the early phase of the migraine attack: therapeutic relevance. **Functional Neurology**, Roma, v. 20, n. 4, p. 179-183, 2005.

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**, Heidelberg, v. 384, n. 7-8, p. 1462-1469, 2006.

CHAMBERS, E.; WAGROWSKI-DIEHL, D.M.; LU, Z.; MAZZEO, J.R. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 852, n. 1-2, p. 22-34, 2007.

CHANG, M.S.; JI, Q.; ZHANG, J.; EL-SHOUBAGY, T.A. Historical Review of Sample Preparation for Chromatographic Bioanalysis: Pros and Cons. **Drug Development Research**, Chicago, v. 68, n. 3, p. 107-133, 2007.

CHEN, J.; JIANG, W.; CAI, J.; TAO, W.; GAO, X.; JIANG, X. Quantification of lipoic acid in plasma by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 824, n. 1-2, p. 249-257, 2005.

CHEN, X.; LIU, D.; LUAN, Y.; JIN, F.; ZHONG, D. Determination of zolmitriptan in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry method: Application to a pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 832, n. 1, p. 30-35, 2006.

CHENG, K.N.; REDRUP, M.J.; BARROW, A.; WILLIAMS, P.N. Validation of a liquid chromatographic tandem mass spectrometric method for the determination of sumatriptan in human biological fluids. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, New York, v. 17, n. 3, p. 399-408, 1998.

CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CHIN, C.; ZHANG, Z.P.; KARNES, H.T. A study of matrix effects on an LC/MS/MS assay for olanzapine and desmethyl olanzapine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, New York, v. 35, n. 5, p. 1149-1167, 2004.

CHMIELEWSKA, A.; KONIECZNA, L.; PLENIS, A.; BIENIECKI, M.; LAMPARCZYK, H. Determination of diclofenac in plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Biomedical Chromatography**, London, v. 20, n. 1, p. 119-124, 2006.

CHUANG, C.K.; LIN, S.P.; LIN, Y.T.; HUANG, F.Y. Effects of anticoagulants in amino acid analysis: comparisons of heparin, edta, and sodium citrate in vacutainer tubes for plasma preparation. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 44, n. 5, p. 1052-1056, 1998.

COLMAN, I.; FRIEDMAN, B.W.; BROWN, M.D. Parenteral dexamethasone for acute severe migraine headache: meta-analysis of randomised controlled trials for preventing recurrence. **British Medical Journal**, London, v. 336, n. 7657, p. 1359-1361, 2008.

CROTTI, A.E.M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N.P. Espectrometria de massas com ionização "electrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 287-292, 2006.

DEVANSHU, S.; RAHUL, M.; ANNU, G.; KISHAN, S.; ANROOP, N. Quantitative Bioanalysis by LC-MS/MS: A Review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, Delhi, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2010.

DUBREIL-CHÉNEAU, E.; PIROTAIS, Y.; BESSIRAL, M.; ROUDAUT, B.; VERDON, E. Development and validation of a confirmatory method for the determination of 12 non-steroidal anti-inflammatory drugs in milk using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1218, n. 37, p. 6292-6301, 2011.

DULÉRY, B.D.; PETTY, M.A.; SCHOUN, J.; DAVID, M.; HUEBERT, N.D. A method using a liquid chromatographic-electrospray-mass spectrometric assay for the determination of antimigraine compounds: preliminary pharmacokinetics of MDL 74,721, sumatriptan and naratriptan, in rabbit. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, New York, v. 15, n. 7, p. 1009-1020, 1997.

DUNNE, M.; ANDREW, P. Fully automated assay for the determination of sumatriptan in human serum using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, New York, v. 14, n. 6, p. 721-726, 1996.

DUQUESNOY, C.; MAMET, J.P.; SUMNER, D.; FUSEAU, E. Comparative clinical pharmacokinetics of single doses of sumatriptan following subcutaneous, oral, rectal and intranasal administration. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 99-104, 1998.

EDWARDS, K.R.; ROSENTHAL, B.L.; FARMER, K.U.; CADY, R.K.; BROWNING, R. evaluation of sumatriptan-naproxen in the treatment of acute migraine: a placebo-controlled, double-blind, cross-over study assessing cognitive function. **Headache**, Hoboken, v. 53, n. 4, p. 656-664, 2013.

ELSINGHORST, P.W.; KINZIG, M.; RODAMER, M.; HOLZGRABE, U.; SÖRGEL, F. An LC-MS/MS procedure for the quantification of naproxen in human plasma: Development, validation, comparison with other methods, and application to a pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies**

in the **Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 879, n. 19, p. 1686-1696, 2011.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). **Guideline on Bioanalytical Method Validation**. London, jul. 2011. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/Document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2014.

FARRAR, F.; LETZIGA, L.; GILLBET, M. Validation of a liquid chromatographic method for the determination of ibuprofen in human plasma. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 780, n. 2, p. 341-348, 2002.

FERRARI, A.; PINETTI, D.; BERTOLINI, A.; COCCIA, C.; STERNIERI, E. Interindividual variability of oral sumatriptan pharmacokinetics and of clinical response in migraine patients. **European Journal of Clinical Pharmacology**, Berlin, v. 64, n. 5, p. 489-495, 2008.

FLANAX[®]: comprimidos revestidos. Responsável técnico: Dra. Dirce Eiko Mimura. São Paulo: Bayer S.A., [20--?]. Bula de remédio.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation**. Rockville, sep. 2013. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM368107.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guidance for Industry. Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products — General Considerations**. Rockville, mar. 2003. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070124.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Paragraph IV - Patent Certifications**. Rockville, 6 janeiro de 2014. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/drugs/developmentapprovalprocess/howdrugsaredevelopedandapproved/approvalapplications/abbreviatednewdrugapplicationandgenerics/ucm293268.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

FREITAS, M.; PORTO, G.; LIMA, J.L.F.C.; FERNANDES, E. Isolation and activation of human neutrophils in vitro. The importance of the anticoagulant used during blood collection. **Clinical Biochemistry**, Toronto, v. 41, n. 7-8, p. 570-575, 2008.

FRIEDMAN, D.I.; DE VER DYE, T. Migraine and the environment. **Headache**, Hoboken, v. 49, n. 6, p. 941-952, 2009.

GE, Z.; TESSIER, E.; NEIRINCK, L.; ZHU, Z. High performance liquid chromatographic method for the determination of sumatriptan with fluorescence detection in human plasma. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 806, n. 2, p. 299-303, 2004.

GILART, N.; MARCÉ, R.M.; BORRULL, F.; FONTANALS, N. Determination of pharmaceuticals in wastewaters using solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 35, n. 7, 875-882, 2012.

GONZALEZ-COVARRUBIAS, V.; DANE, A.; HANKEMEIER, T.; VREEKEN, R.J. The influence of citrate, EDTA, and heparin anticoagulants to human plasma LC-MS lipidomic profiling. **Metabolomics**, New York, v. 9, n. 2, p. 337-348, 2013.

GRACIA-LOR, E.; SANCHO, J.V.; HERNÁNDEZ, F. Simultaneous determination of acidic, neutral and basic pharmaceuticals in urban wastewater by ultra high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, n. 5, p. 622-632, 2010.

GROSSER, T.; SMYTH, E.; FITZGERALD, A.G. Agentes anti-inflamatórios, antipiréticos e analgésicos; farmacoterapia da gota. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. (Org.). **Goodman & Gilman As bases farmacológicas da terapêutica**. 12. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012. p. 960-1003.

HABERER, L.J.; WALLS, C.M.; LENER, S.E.; TAYLOR, D.R.; MCDONALD, S.A. distinct pharmacokinetic profile and safety of a fixed-dose tablet of sumatriptan and naproxen sodium for the acute treatment of migraine. **Headache**, Hoboken, v. 50, n. 3, p. 357-373, 2010.

HANDIN, R.I.; LUX, S.E.; STOSSEL, T.P. **Blood: Principles and Practice of Hematology**. 2. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003. 2304 p.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. 3 ed., Chichester: John Wiley & Sons, 2007. 493 p.

HOPFGARTNER, G.; BOURGOGNE, E. Quantitative high-throughput analysis of drugs in biological matrices by mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, New York, v. 22, n. 3, 195-214, 2003.

Imigran[®]: comprimidos revestidos. Farmacêutico responsável: Milton de Oliveira. Rio de Janeiro: GlaxoSmithKline Brasil Ltda., 2007. Bula de remédio.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (INMETRO). **Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**. DOQ-CGCRE-008. Rio de Janeiro, 2007. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf> Acesso em: 15 jan. 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (INMETRO). **Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**. DOQ-CGCRE-008. Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf> Acesso em: 15 jan. 2014.

INTERNATIONAL HEADACHE SOCIETY. Headache Classification Subcommittee. The International Classification of Headache Disorders. **Cephalgia: A International Journal of Headache**, New York, v. 24, n. 1, p. 9-160, 2004.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION – ISO. ISO 6710.2 **Single-use containers for human venous blood specimen collection**. Geneva, 2002. 12 p.

JHEE, S.S.; SHIOVITZ, T.; CRAWFORD, A.W.; CUTLER, N.R. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the triptan antimigraine agents: a comparative review. **Clinical Pharmacokinetics**, New York, v. 40, n. 3, p. 189-205, 2001.

KANGA, W.; KIMB, E. Simultaneous determination of aceclofenac and its three metabolites in plasma using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, New York, v. 46, n. 3, p. 587-591, 2008.

KELLER, B.O.; SUI, J.; YOUNG, A.B.; WHITTAL, R.M. Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 627, n. 1, p. 71-81, 2008.

KELMAN, L. The postdrome of the acute migraine attack. **Cephalalgia: A International Journal of Headache**, New York, v. 26, n. 2, p. 214-220, 2006.

KERBALE, P.; VERKERK, U.H. Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. **Mass Spectrometry Reviews**, New York, v. 28, n. 6, p. 898-917, 2009.

KHAN, A.; IQBAL, Z.; WATSON, D.G.; KHAN, A.; KHAN, I.; MUHAMMAD, N.; MUHAMMAD, S.; NASIB, H.A.; IQBAL, N.; FAIZ-UR-REHMAN; KASHIF, M. Simultaneous determination of lipoic acid (LA) and dihydrolipoic acid (DHLA) in human plasma using high-performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 879, n. 20, p. 1725-1731, 2011.

KHAN, A.; KHAN, M.I.; IQBAL, Z.; AHMAD, L.; SHAH, Y.; WATSON, D.G. Determination of lipoic acid in human plasma by HPLC-ECD using liquid-liquid and solid-phase extraction: method development, validation and optimization of experimental parameters. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 878, n. 28, p. 2782-2788, 2010.

KING, R.; BONFIGLIO, R.; FERNANDEZ-METZLER, C.; MILLER-STEIN, C.; OLAH, T. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, New York, v. 11, n. 11, p. 942-950, 2000.

KRUBE, A.; AULING, R.; HERODES, K.; LEITO, I. Study of liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry matrix effect on the example of glyphosate analysis from cereals. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, London, v. 25, n. 21, p. 3252-3258, 2011.

KUSHNIR, M.M.; ROCKWOOD, A.L.; NELSON, G.J.; YUE, B.; URRY, F.M. Assessing analytical specificity in quantitative analysis using tandem mass spectrometry. **Clinical Biochemistry**, Toronto, v. 38, n. 4, p. 319-327, 2005.

LEVERENCE, R.; AVERY, M.J.; KAVETSKAIA, O.; BI, H.; HOP, C.E.; GUSEV, A.I. Signal suppression/enhancement in HPLC-ESI-MS/MS from concomitant medications. **Biomedical chromatography**, London, v. 21, n. 11, p. 1143-1150, 2007.

LEWIS, S.M.; TATSUMI, N. Collection and handling of blood. In: LEWIS, S.M.; BAIN, B.J.; BATES, I. **Dacie and Lewis. Practical Haematology**. 10. ed. Philadelphia: Elsevier, 2006. p. 1-10.

LI, W.; ZHANG, J.; TSE, F.L.S. Strategies in quantitative LC-MS/MS analysis of unstable small molecules in biological matrices. **Biomedical Chromatography**, London, v. 25, n. 1-2, p. 258-277, 2011.

LÖFFLER, D.; TERNES, T.A. Determination of acidic pharmaceuticals, antibiotics and ivermectin in river sediment using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1021, n. 1-2, p. 133-144, 2003.

LYNN, D.J.; NEWTON, H.B.; RAE-GRANT, A.D. **The 5-minute neurology consult**. 1. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. 476 p.

MARZO, A.; MONTI, N.; RIPAMONTI, M.; MARZO, P.; WOOL, C.; CERUTTI, R.; MAGGI, G.C. Comparative bioavailability study on naproxen betainate sodium salt monohydrate and naproxen sodium salt in healthy volunteers. **Arzneimittelforschung/drug research**, Aulendorf, v. 47, n. 4, p. 385-389, 1997.

MATUSZEWSKI, B.K.; CONSTANZER, M.L.; CHAVEZ-ENG, C.M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 75, n. 13, p. 3019-3030, 2003.

MCLOUGHLIN, D.A.; OLAH, T.V.; ELLIS, J.D.; GILBERT, J.D.; HALPIN, R.A. Quantitation of the 5HT_{1D} agonists MK-462 and sumatriptan in plasma by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 726, n. 1-2, p. 115-24, 1996.

MEI, H.; HSIEH, Y.; NARDO, C.; XU, X.; WANG, S.; NG, K.; KORFMACHER, W.A. Investigation of matrix effects in bioanalytical high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assays: application to drug discovery. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, London, v. 17, n. 1, p. 97-103, 2003.

MICHAEL, A.M.; LOTFY, H.M.; REDA, M.R.; MICHAIL, K.; SOMAYAJI, V.; SIRAKI, A.G.; EL-KADI, A.O.S.; SHEHATA, M. A. simultaneous determination of sumatriptan and naproxen in dosage forms and human plasma using LC/MS. **Current Analytical Chemistry**, Cambridge, v. 8, n. 4, p. 512-519, 2012.

MITRA, S. (Ed.). **Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry**. 1. ed., v. 162, New Jersey: John Wiley & Sons, 2003. 473 p.

MOFFAT, A.C.; OSSELTON, M.D; WIDDOP, B. (Ed.). **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material**. 3. ed., v. 2, London: Pharmaceutical Press, 1935 p., 2004.

MORAES, M.C.B.; LAGO, C.L. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray" aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 556-563, 2003.

MURGU, M. **Introdução à Espectrometria de Massas**. Brasil: Waters Technologies do Brasil, 2009. 211 p.

NASIR, F.; IQBAL, Z.; KHAN, A.; AHMAD, L.; SHAH, Y.; KHAN, A.Z.; KHAN, J.A.; KHAN, S. Simultaneous determination of timolol maleate, rosuvastatin calcium and diclofenac sodium in pharmaceuticals and physiological fluids using HPLC-UV. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 879, n. 30, p. 3434-3443, 2011.

NIESSEN, W.M.A. **Liquid Chromatography – Mass Spectrometry**. 3 ed. New York: Taylor and Francis Group, LLC, 2006. 602 p.

NOBILIS, M.; KOPECKÝ, J.; KVETINA, J.; SVOBODA, Z.; POUR, M.; KUNES, J.; HOLCAPEK, M.; KOLÁROVÁ, L. Comparative biotransformation and disposition studies of nabumetone in humans and minipigs using high-performance liquid chromatography with ultraviolet, fluorescence and mass spectrometric detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, New York, v. 32, n. 4-5, p. 641-656, 2003.

NOCHE, G.G.; LAESPADA, M.E.; PAVÓN, J.L.; CORDERO, B.M.; LORENZO, S.M. In situ aqueous derivatization and determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs by salting-out-assisted liquid-liquid extraction and gas chromatography-mass

spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1218, n. 37, p. 6240-6247, 2011.

OJHA, A.; RATHOD, R.; PADH, H. Simultaneous HPLC-UV determination of rhein and aceclofenac in human plasma. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 877, n. 11-12, p. 1145-1148, 2009.

OLESEN, J.; BURSTEIN, R.; ASHINA, M.; TFELT-HANSEN, P. Origin of pain in migraine: evidence for peripheral sensitization. **Lancet Neurology**, London, v. 8, n. 7, p. 679-690, 2009.

OLESEN, J.; WELCH, K.M.A.; TFELT-HANSEN, P. (Ed.). **The Headaches**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. 1169 p.

PALMA-AGUIRRE, J.A.; VILLALPANDO-HERNÁNDEZ, J.; NOVOA-HECKEL, G.; OLIVA, I.; CARIÑO, L.; LÓPEZ-BOJÓRQUEZ, E.; BURKE-FRAGA, V.; NAMUR, S.; GONZÁLEZ-DE LA PARRA, M. bioavailability of two oral-tablet and two oral-suspension formulations of naproxen sodium/paracetamol (acetaminophen): single-dose, randomized, open-label, two-period crossover comparisons in healthy mexican adult subjects. **Clinical Therapeutics**, Princeton, v. 31, n. 2, p. 399-410, 2009

PATEL, D.P.; SHARMA, P.; SANYAL, M.; SINGHAL, P.; SHRIVASTAV, P.S. Challenges in the simultaneous quantitation of sumatriptan and naproxen in human plasma: Application to a bioequivalence study. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 902, n. 1, p. 122-131, 2012.

POLSON, C.; SARKAR, P.; INCLEDON, B.; RAGUVARAN, V.; GRANT, R. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 785, n. 2, p. 263-275, 2006.

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**, Campinas, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

RAO, R.N.; GURUPRASAD, K.; GANGU NAIDU, Ch.; RAJU, B.; SRINIVAS, R. LC-ESI-MS/MS determination of in vivo metabolites of almotriptan in rat plasma, urine and feces: application to pharmacokinetics. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 891-892, p. 44-51, 2012.

RHIM, S.Y.; PARK, J.H.; PARK, Y.S.; LEE, M.H.; SHAW, L.M.; KANG, J.S. Bioequivalence and pharmacokinetic evaluation of two branded formulations of aceclofenac 100 mg: a single-dose, randomized, open-label, two-period crossover comparison in healthy korean adult volunteers. **Clinical Therapeutics**, Princeton, v. 30, n. 4, p. 633-640, 2008.

ROSSI, P.; AMBROSINI, A.; BUZZI, M.G. Prodromes and predictors of migraine attack. **Functional Neurology**, Roma, v. 20, n. 4, p. 185-191, 2005.

SADAGOPAN, N.P.; LI, W.; COOK, J.A.; GALVAN, B.; WELLER, D.L.; FOUNTAIN, S.T.; COHEN, L.H. Investigation of EDTA anticoagulant in plasma to improve the throughput of liquid chromatography/tandem mass spectrometric assays. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, London, v. 17, n. 10, p. 1065-1070, 2003.

SAMUELS, M.A.; ALLAN, H.R. **Adams and Victor's principles of neurology**. 9. ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2009. 1572 p.

SANDERS-BUSH, E.; HAZELWOOD, L. 5-Hidrixitriptamina (serotonina) e dopamine. In: BRUNTON, L. L; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. (Org.). **Goodman & Gilman As bases farmacológicas da terapêutica**. 12. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012. p. 335-361.

SARFARAZ, K.N.; VIEIRA, N.R; CAMPOS, D.R. **Handbook of Bioequivalence Testing**. 1. ed. New York: Informa Healthcare USA, 2007. 550 p.

SAVOIE, N.; BOOTH, B.P.; BRADLEY, T.; GAROFOLO, F.; HUGHES, N.C.; HUSSAIN, S.; KING, S.P.; LINDSAY, M.; LOWES, S.; ORMSBY, E.; PHULL, R.; ROCCI ML, J.R.; VALLANO, P.T.; VIAU, A.; ZHU, Z. The 2nd Calibration and Validation Group workshop on recent issues in good laboratory practice bioanalysis. **Bioanalysis**, London, v. 1, n. 1, p. 19-30, 2009.

SENNBRO, C.J.; KNUTSSON, M.; AMSTERDAM, P.V.; TIMMERMAN, P. Anticoagulant counter ion impact on bioanalytical LC-MS/MS assays: results from

discussions and experiments within the European Bioanalysis Forum. **Bioanalysis**, London, v. 3, n. 21, p. 2393-2399, 2011.

SENNBRO, C.J.; KNUTSSON, M.; TIMMERMAN, P.; AMSTERDAM, P.V. Anticoagulant counter ion impact on bioanalytical LC-MS/MS assay performance: additional validation required? **Bioanalysis**, London, v. 3, n. 21, p. 2389-2391, 2011.

SHAH, Y.; IQBAL, Z.; AHMAD, L.; KHAN, A.; KHAN, M.I.; NAZIR, S.; NASIR, F. Simultaneous determination of rosuvastatin and atorvastatin in human serum using RP-HPLC/UV detection: Method development, validation and optimization of various experimental parameters. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 879, n. 9-10, p. 557-563, 2011.

SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A.B.C. **Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics**. 5 ed. New York: McGraw Hill, 2005. 892 p.

SHESHALA, R.; KHAN, N.; DARWIS, Y. Validated high performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of sumatriptan in rabbit plasma: application to pharmacokinetic study. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Nigeria, v. 6, n. 2, p. 98-107, 2012.

SIGMA-ALDRICH. Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos. Versão 5.1. São Paulo, 2012.

SLATTERY, J.T.; LEVY, G. Determination of Naproxen and its Desmethyl Metabolite in Human Plasma or Serum by High Performance Liquid Chromatography. **Clinical Biochemistry**, Toronto, v. 12, n. 3, p. 100-103, 1979.

SMERAGLIA, J.; BALDREY, S.F.; WATSON, D. Matrix effects and selectivity issues in LC-MS/MS. **Chromatographia**, New York, v. 55, n. 1, p. S-95-S-99, 2002.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC Method Development**. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 1997, 765 p.

SØRENSEN, L.K. Determination of acidic and neutral therapeutic drugs in human blood by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Forensic Science International**, Lausanne, v. 206, n. 1-3, 119-126, 2011.

SOUZA, M.H.L.; ELIAS, D.O. Fisiologia do Sangue. In: _____. **Fundamentos da Circulação Extracorpórea**. 2. ed. Rio de Janeiro: Centro Editorial Alfa Rio, 2006. p. 103-138.

SRINIVASU, P.; RAMBHAU, D.; RAO, B.R.; RAO, Y.M. Lack of pharmacokinetic interaction between sumatriptan and naproxen. **Journal of Clinical Pharmacology**, Stamford, v. 40, n. 1, p. 99-104, 2000.

TAN, A.; HANG, P.; COUTURE, J.; HUSSAIN, S.; VALLÉE, F. An evaporation-free solid-phase extraction method for rapid and accurate analysis of sumatriptan in human plasma by LC–MS/MS. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 856, n. 1-2, p. 9-14, 2007.

TAYLOR, P.J. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. **Clinical Biochemistry**, Toronto, v. 38, n. 4, p. 328-334, 2005.

TFELT-HANSEN, P. Parenteral vs. oral sumatriptan and naratriptan: plasma levels and efficacy in migraine. A comment. **The Journal of Headache and Pain**, Milano, v. 8, n. 5, p. 273-276, 2007.

TROY, D.B. (Ed.). **Remington: The Science and Practice of Pharmacy**. 21. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. 2393 p.

TRUFELLI, H.; PALMA, P.; FAMIGLINI, G.; CAPPIELLO, A. An overview of matrix effects in liquid Chromatography–mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, New York, v. 30, n. 3, p. 491-509, 2011.

UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). Material Safety Data Sheet. Rockville, 2009.

VÄLITALO, P.; KUMPULAINEN, E.; MANNER, M.; KOKKI, M.; LEHTONEN, M.; HOOKER, A.C.; RANTA, V.P.; KOKKI, H. Plasma and cerebrospinal fluid

pharmacokinetics of naproxen in children. **Journal of Clinical Pharmacology**, Stamford, v. 52, n. 10, p. 1516-1526, 2012.

VAN ECKHAUT, A.; LANCKMANS, K.; SARRE, S.; SMOLDERS, I.; MICHOTTE, Y. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 877, n. 23, p. 2198-2207, 2009

VIEIRA, N.R; CAMPOS, D.R. **Manual de Bioequivalência. Série Pesquisa Clínica**. 1. ed. São Paulo: Dendrix, 2011. 208 p.

VISWANATHAN, C.T.; BANSAL, S.; BOOTH, B.; DESTEFANO, A.J.; ROSE, M.J.; SAILSTAD, J.; SHAH, V.P.; SKELLY, J.P.; SWANN, P.G.; WEINER, R. Workshop/Conference Report – Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. **Pharmaceutical research**, New York, v. 24, n. 10, p. 1962-1973, 2007.

WAINER, I. W.; LOUGH, W. J. **High Performance Liquid Chromatography fundamental principles and practice**. 1 ed. London: Chapman & Hall, 1996, 276 p.

WALLS, C.; LEWIS, A.; BULLMAN, J.; BOSWELL, D.; SUMMERS, S.J.; DOW, A.; SIDHU, J. Pharmacokinetic profile of a new form of sumatriptan tablets in healthy volunteers. **Current Medical Research and Opinion**, London, v. 20, n. 6, p. 803-809, 2004.

WATERS. **LC/MS Technical Introduction**. França. [s.n.], 2002. 50 p.

XU, R.N.; FAN, L.; RIESER, M.J.; EL-SHOUBAGY, T.A. Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC-MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, New York, v. 44, n. 2, p. 342- 355, 2007.

XU, X.; BARTLETT, M.G.; STEWART, J.T. Determination of degradation products of sumatriptan succinate using LC-MS and LC-MS-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, New York, v. 26, n. 3, p. 367-377, 2001.

YADAV, M.; PATEL, C.; PATEL, M.; MISHRA, T.; BAXI, G.A.; SINGHAL, P.; SHRIVASTAV, P.S. Development and validation of a sensitive and rapid method to

determine naratriptan in human plasma by LC-ESI-MS-MS: application to a bioequivalence study. **Journal of Chromatographic Science**, Oxford, v. 49, n. 2, p. 101-107, 2011.

YOON, Y.; RYU, J.; OH, J.; CHOI, B.G.; SNYDER, S.A. Occurrence of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals, and personal care products in the Han River (Seoul, South Korea). **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 408, n. 3, p. 636-643, 2010.

YOUNG, D.S.; BERMES, E.W.Jr.; HAVERSTICK, D.M. Coleta de Amostras e Outras Variáveis Pré-analíticas. In: BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R.; BRUNS, D.E. (Ed.). **TIEZ Fundamentos de Química Clínica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 43-63.

ZAGHLOUL, A.A.; HUSSAIN, A.; KHAN, M.A.; AHSAN, F. Development of a HPLC method for the determination of cyclosporin-A in rat blood and plasma using naproxen as an internal standard. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, New York, v. 31, n. 6, p. 1101-1107, 2003.

ZHANG, H.; JIANG, Y.; WEN, J.; ZHOU, T.; FAN, G.; WU, Y. Rapid determination of telmisartan in human plasma by HPLC using a monolithic column with fluorescence detection and its application to a bioequivalence study. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 877, n. 29, p. 3729-3733, 2009.

ZHOU, S.; SONG, Q.; TANG, Y.; NAIDONG, W. Critical review of development, validation, and transfer for high throughput bioanalytical LC-MS/MS methods. **Current Pharmaceutical Analysis**, Oak Park, v.1, n. 1, p. 3-14, 2005.

APÊNDICE A – Resumo enviado ao 24th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis – PBA 2013.

PBA-RDPA 2013 Bologna, 30 June – 3 July 2013
P1.18

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A HPLC-ESI-MS/MS BIOANALYTICAL METHOD FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF NAPROXEN AND SUMATRIPTAN IN HUMAN PLASMA

J.M. Brêtas, I.C. César, R.M.D. Byrro, G.A. Pianetti

Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Introduction: Naproxen (NAP) is a nonsteroidal anti-inflammatory drug and Sumatriptan (SUM) is a selective 5-hydroxytryptamine₁ (5-HT₁) receptor subtype agonist drug. The association of these drugs is used for the acute treatment of migraine attacks with or without aura, in adults, through different pharmacological mechanisms of action.[1,2] Since NAP is an acid compound (pKa 4.8) [3] and SUM is a basic compound (pKa 9.63) [4] it is difficult to establish a simple liquid-liquid extraction procedure capable to provide high recovery rates for both analytes[5]. Methods for simultaneous determination of these drugs in human plasma are required for application in pharmacokinetic and bioequivalence studies. A method employing high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS) was developed for the simultaneous determination of NAP and SUM in human plasma.

Materials and Methods: The analytes were extracted from plasma samples by a liquid-liquid extraction procedure, with a mixture of ethyl acetate, methyl tert-butyl ether and dichloromethane (4:3:3, v/v). Naratriptan (NAR) and Aceclofenac (ACE) were employed as internal standards. The HPLC-ESI-MS/MS analyses were carried out on a Waters system (Milford, MA, U.S.A.), composed of a 1525 μ binary pump, a 2777 sample manager, a TCM/CHM column oven and a Quattro LC triple quadrupole mass spectrometer, equipped with an electrospray ion source. The monitored transitions were m/z 231.1 > m/z 185.2, m/z 296.1 > m/z 156.3, m/z 336.3 > m/z 97.8 and m/z 354.1 > m/z 214.4 for NAP, SUM, NAR and ACE, respectively. LC separation was performed on a C18 column (50 x 4.6 mm i.d.; 5 μ m particle size) from ACE[®], maintained at 30°C. The mobile phase consisted of 2mM aqueous ammonium acetate with 0.025% formic acid and methanol (38:62, v/v), at a flow rate of 1 mL/min and splitting (9:1). The injection volume was 20 μ L. The method was verified for selectivity, linearity, precision, accuracy, matrix effect, recovery and post-preparative stability. Calibration curves with six points were constructed in consecutive days. The linear range was 100.0 - 100,000.0 ng/mL for NAP and 0.1 – 150.0 ng/mL for SUM.

Results and Discussion: The retention times were 2.70, 0.83, 0.83 and 3.99 for NAP, SUM, NAR and ACE, respectively. The lower limits of quantitation were 100.0 and 0.1 ng/mL for NAP and SUM, respectively. All calibration curves presented a r^2 higher than 0.99 for both analytes in the proposed range. The mean R.S.D. values in the intra-run precision were 3.85% and 4.08% and in the inter-run precision were 4.24% and 4.88% for NAP and SUM, respectively. The mean accuracy values were within the range of 85% to 115% for both analytes. The recovery rates were 23.77% for NAP and 39.13% for SUM. No matrix effects were detected, assuring the absence of potential ion suppression or enhancement due to the co-elution matrix components in the analysis. No significant interference was detected at the retention times of the analytes. NAP and SUM showed stable in post-preparative samples for 8 hours in the autosampler at 8°C.

Conclusions: The developed method provides high-throughput analyses, simple and rapid sample processing technique, high sensitivity and selectivity. The method was validated for selectivity, linearity, precision, accuracy, matrix effect, recovery and post-preparative stability. The results showed that the method may be successfully applied for studies involving determination of NAP and SUM in human plasma, such as pharmacokinetics and bioequivalence studies.

References

- [1] TREXIMET[®]: sumatriptano e naproxeno sódico, *GlaxoSmithKline*, 2012. Bula de medicamento.
- [2] L. L. Brunton, J. S. Lazo, K. L. Parker, (ED), *Goodman & Gilman As bases farmacológicas da terapêutica*, 11 ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2006, 1821p.
- [3] R. Sheshala, N. Khan, Y. Darwis, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2012, 6(2), 98 –107.
- [4] N. Gilart, R. M. Marcé, F. Borrull, N. Fontanals, *Journal of Separation Science*, 2012, 35, 875 – 882.
- [5] S. C. N. Queiroz, C. H. Collins, I. C. S. F. Jardim, *Química Nova*, 2001, 24(1), 68 – 76.

APÊNDICE B – Resumos enviados ao XIV Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas – COLACRO 2012.

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE PSEUDOEFEDRINA E DESLORATADINA EM PLASMA HUMANO POR CLAE-ESI-MS/MS

Juliana Machado Brêtas
Isabela da Costa César
Ricardo Martins Duarte Byrro
Gérson Antônio Pianetti

A pseudoefedrina (PSF) é um agonista adrenérgico e a desloratadina (DLT) é um anti-histamínico de segunda geração. Em dose fixa combinada são indicadas para o alívio dos sintomas associados à rinite alérgica. Desenvolver e validar um método bioanalítico sensível e seletivo para quantificação simultânea de PSF e DLT em plasma humano é essencial para a aplicação em estudos de biodisponibilidade/bioequivalência. A determinação foi feita por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e a detecção por Espectrometria de Massas (MS/MS) com Ionização por Electrospray operado no modo positivo (ESI+). Metoclopramida (MTC) foi utilizada como padrão interno. Os analitos foram extraídos do plasma humano utilizando-se acetato de etila, MTBE e diclorometano (70:15:15 v/v). Em um sistema cromatográfico modular Waters com amostrador automático mantido a 8°C foram injetados 50 µL das amostras. A separação foi realizada utilizando coluna ACE (100 mm × 4,6 mm, 5 µm) a 30°C e fase móvel constituída de ácido fórmico 0,3% e acetonitrila (79:21 v/v) com fluxo de 1 mL/min e splitting (9:1). O tempo de corrida foi de 6,5 minutos. Os íons foram monitorados em modo Monitoramento Múltiplo de Reações (MRM) usando as transições m/z 165,60 → 147,97 para PSF, m/z 311,06 → 259,33 para DLT e m/z 300,13 → 227,09 para MTC. A validação do método consistiu em limites inferiores de quantificação (LIQ), linearidade, precisão, exatidão, recuperação, efeito matriz e estabilidade pós-processamento. A faixa de linearidade obtida foi de 1,0 a 500,0 ng/mL para PSF e 0,1 a 50,0 ng/mL para DLT. Os LIQ foram 1,0 ng/mL para PSF e 0,1 ng/mL para DLT. Os valores de DPR médios foram 2,4% e 4,3% para a precisão intra-corrída e 5,6% e 7,0% para a precisão inter-corrída, para PSF e DLT, respectivamente. A exatidão média foi de 102,4% para PSF e 105,14% para DLT. A taxa de recuperação alcançada foi de 78,45% para PSF e 68,59% para DLT. Não foi detectado efeito matriz significativo. O método desenvolvido e validado apresentou parâmetros satisfatórios para a aplicação em estudos de biodisponibilidade/bioequivalência entre formulações contendo PSF e DLT associadas.

Agradecimentos:

Agradecemos ao apoio financeiro da FAPEMIG.

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE METRONIDAZOL EM MEIO DE CULTURA POR CLAE-UV

Camila Machado Brêtas
Juliana Machado Brêtas
Sérgia Maria Starling Magalhães
Gérson Antônio Pianetti

O metronidazol, um 5-nitro-imidazol, é um antimicrobiano de amplo uso terapêutico humano e veterinário, além de ser acrescentado como aditivo em rações para aumentar a produtividade das criações de animais. A vasta utilização desse medicamento gera resíduos que atingem o meio aquático, podendo exercer efeitos sobre organismos não alvo, o que constitui uma preocupação ambiental. As cianobactérias são, em potencial, um dos grupos mais susceptíveis a ação antimicrobiana, pela similaridade com as bactérias, particularmente as Gram negativas. Objetivou-se desenvolver e validar um método analítico para quantificação de metronidazol e identificação de possíveis produtos de degradação em meio de cultura WC contendo cianobactérias *Microcystis protoctysis*. A determinação foi feita por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e a detecção por Espectrofotometria na Região do Ultravioleta (UV). Os analitos foram extraídos do meio de cultura utilizando-se acetato de etila. Em um sistema cromatográfico modular Thermo Scientific com detector PDA Plus e amostrador automático mantido a 5°C foram injetados 20 µL das amostras. A separação foi realizada utilizando coluna Shimadzu (150 mm × 4,6 mm, 5 µm) a 30°C e fase móvel constituída de fosfato de sódio monobásico 10 mM pH 3,0 e acetonitrila (80:20 v/v) com fluxo de 1 mL/min. O tempo de corrida foi de 3,5 minutos e os cromatogramas foram obtidos com detecção em 317 nm. O tempo de retenção para metronidazol foi de 2,7 minutos. A validação do método consistiu na determinação do limite inferior de quantificação (100,00 ng/mL), linearidade (100,00 a 1600,00 ng/mL), seletividade, precisão (0,16%), exatidão (97,79%), e recuperação (96,55%). Não foram detectados possíveis produtos de degradação ou de metabolização no comprimento de onda utilizado. O método desenvolvido e validado apresentou parâmetros satisfatórios, sendo eficaz para determinação e quantificação de metronidazol em estudos de toxicidade em cianobactérias *Microcystis protoctysis*.

Agradecimentos:

Agradecemos ao apoio financeiro da FAPEMIG.

APÊNDICE C – Resumo enviado a XXII Semana de Iniciação Científica da UFMG – SIC 2013.

EVENTO: XXII SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA				
TRABALHO: 29966 - Comparação entre diferentes técnicas de extração aplicadas no desenvolvimento de método bioanalítico para quantificação simultânea de naproxeno e sumatriptano em plasma humano por CLAE-ESI-MS/MS				
Situação: APROVADO				
Autor				
Tipo:	Nome:			Curso/Unidade:
Aluno	CAMILA MACHADO BRETAS			FARMACIA
Inscrição UFMG:	Bolsa:	e-mail:	Telefone:	
2009024014	OUTROS	camilambretas@gmail.com	(31)84128084	
Coordenador/Orientador				
Nome:		Unidade/Departamento:		
GERSON ANTONIO PLANETTI		Faculdade de Farmácia/Depto. Produtos Farmacêuticos		
e-mail:		Telefone:	Inscrição:	
planeti@farmacia.ufmg.br		(31)34096982	017426	
Co-autores				
Nome	Curso	Tipo	Bolsa	
JULIANA MACHADO BRETAS	CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS/M	Aluno	OUTROS	
Dados do Trabalho				
Título:			Código:	
Comparação entre diferentes técnicas de extração aplicadas no desenvolvimento de método bioanalítico para quantificação simultânea de naproxeno e sumatriptano em plasma humano por CLAE-ESI-MS/MS			29966	
Área:				
Ciências da Saúde				
Resumo:				
<p>Naproxeno (NAP) é um anti-inflamatório não esteroide e sumatriptano (SUM) é um agonista seletivo do receptor 5-hidroxitriptamina-1. A associação desses fármacos é usada para o tratamento de crises de enxaqueca. NAP é uma substância ácida (pKa 4,8) e SUM é básica (pKa 9,63), sendo difícil estabelecer um procedimento de extração simples e com altas taxas de recuperação para ambos os analitos. Desenvolver e validar método bioanalítico para quantificação simultânea de NAP e SUM em plasma humano é essencial para aplicação em estudos de farmacodinâmica e bioequivalência. Três técnicas de extração foram avaliadas quanto à seletividade, recuperação e efeito matriz: líquido-líquido (ELL), precipitação de proteínas (PPT) e em fase sólida (EPS). A quantificação foi feita por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE-MS/MS) em modo de Ionização Eletrospray Positivo (ESI+). Acetofenaco (ACE) foi utilizado como padrão interno para NAP e naratriptano (NAR) para SUM. Em um sistema CLAE com amostrador a 8°C foram injetados 20 µL das amostras. A separação foi realizada em coluna C18 (50 mm x 4,6 mm, 5µm) a 30°C e fase móvel constituída de tampão acetato de amônio a 2 mM com 0,025% de ácido fórmico e metanol (38:62 v/v) com fluxo de 1 mL/min e splitting (9:1). Os ions foram monitorados em modo Monitoramento Múltiplo de Reações (MRM) usando as transições m/z 231,7 → 185,1 para NAP, m/z 296,7 → 157,3 para SUM, m/z 354,8 → 215,0 para ACE e m/z 336,8 → 97,94 para NAR. Tanto a ELL quanto a EPS apresentaram resultados satisfatórios, porém escolheu-se ELL por sua praticidade e menor custo. A validação do método consistiu na avaliação de seletividade, efeito residual, efeito matriz, linearidade, precisão, exatidão e estabilidade (curta duração, pós-processamento, ciclos de congelamento e descongelamento e em solução). O método desenvolvido e validado apresentou parâmetros satisfatórios para aplicação em estudos de farmacodinâmica e bioequivalência.</p>				
Palavras-chave:				
técnicas de extração, bioequivalência, CLAE-ESI-MS/MS.				
Instituições financiadoras/parceiras:				
ANVISA – Projeto Farmacopela Brasileira				

**ANEXO A – Certificado de participação no 24th International Symposium on
Pharmaceutical and Biomedical Analysis – PBA 2013.**



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
DEPARTMENT OF PHARMACY AND BIOTECHNOLOGY

Certificate of Attendance

**24th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON
PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS**
PBA 2013
**RECENT DEVELOPMENTS IN PHARMACEUTICAL
ANALYSIS (RDPA 2013)**
30 JUNE - 3 JULY, 2013
Palazzo Gnudi Scagliarini - BOLOGNA, Italy

This is to certify that

JULIANA M. BRÊTAS

AS POSTER PRESENTER

has attended the

**24th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON
PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS**
PBA 2013
**RECENT DEVELOPMENTS IN PHARMACEUTICAL
ANALYSIS (RDPA 2013)**
 Bologna, 30 June - 3 July, 2013

SYMPOSIUM CHAIR
 Carlo Bertucci



UNDER THE AUSPICES OF



EFMC
European Federation
for Medicinal Chemistry



Italian Chemical Society
Division of Medicinal Chemistry



ANEXO B – Certificados de participação no XIV Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas – COLACRO 2012.





ANEXO C – Certificado de apresentação de trabalho na XXII Semana de Iniciação Científica da UFMG – SIC 2013.

UFMG
Conhecimento e Cultura
2013

Certificado





Certificamos que o trabalho intitulado "COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO APLICADAS NO DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE NAPROXENO E SUMATRIPTANO EM PLASMA HUMANO POR CLAE-ESI-MS/MS", foi apresentado na XXII SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA da UFMG, promovida pela Pró-Reitoria de Pesquisa, no período de 21/10/2013 a 25/10/2013.
AUTOR: CAMILA MACHADO BRETAS
CO-AUTORES: JULIANA MACHADO BRETAS
ORIENTADOR: GERSON ANTONIO PIANETTI, do(a) FACULDADE DE FARMÁCIA.

Belo Horizonte, 23 de março de 2014.


Prof. Renato de Lima Santos
Pró-Reitor de Pesquisa

ANEXO D – Parecer Consubstanciado do CEP para estudo de avaliação farmacocinética simultânea de naproxeno sódico 275 mg e succinato de sumatriptano 50 mg sob a forma de comprimidos revestidos.

<p>INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ESTUDOS E PESQUISAS S/S</p> 	<p>INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ESTUDOS E PESQUISAS S/S</p> 
<p>PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP</p>	<p>Continuação do Parecer: 508.026</p>
<p>DADOS DO PROJETO DE PESQUISA</p> <p>Título da Pesquisa: Estudo de avaliação farmacocinética simultânea de naproxeno sódico 275mg e succinato de sumatriptano 50mg sob a forma de comprimidos revestidos.</p> <p>Pesquisador: Karini Bruno Bellorio</p> <p>Área Temática:</p> <p>Versão: 2</p> <p>CAAE: 25617013.0.0000.5572</p> <p>Instituição Proponente: ICF - Instituto de Ciências Farmaceuticas de Estudos e Pesquisas LTDA</p> <p>Patrocinador Principal: Universidade Federal de Minas Gerais</p> <p>DADOS DO PARECER</p> <p>Número do Parecer: 508.026</p> <p>Data da Relatoria: 09/01/2014</p> <p>Apresentação do Projeto:</p> <p>O projeto faz referência à avaliação farmacocinética simultânea de naproxeno sódico 275mg (antiinflamatório não esteroide com propriedades analgésicas e antipiréticas) e succinato de sumatriptano 50mg (agonista seletivo vascular do receptor 5-hidroxitriptamina-1 (5-HT1 D)) sob a forma de comprimidos revestidos. Os participantes de pesquisa serão recrutados entre aqueles que se apresentarem na Unidade Clínica do Centro; antes de serem submetidos a qualquer avaliação, os mesmos terão todas as dúvidas esclarecidas, e caso concordem, assinarão o termo de recrutamento e seleção de voluntários. De acordo com o protocolo clínico, eles passarão por consultas médicas e exames clínicos/laboratoriais e só serão incluídos no estudo se forem considerados saudáveis nesta avaliação clínica (consultas + exames laboratoriais). Após comprovação do estado de higiene, serão submetidos a uma entrevista com o médico para análise da saúde mental, bem como condições emocionais para participar do estudo. É de responsabilidade do Investigador clínico (médico responsável pela pesquisa) a obtenção da assinatura do Termo de Consentimento.</p> <p>Crítérios de inclusão:</p> <p>1. Ter idade entre 18 e 50 anos;</p>	<p>2. O IMC estar compreendido na faixa de 18,50 a 24,90 podendo variar até 15% quanto ao limite superior(18,50 a 28,63);</p> <p>3. Ter sido submetido a uma avaliação clínica e considerado saudável;</p> <p>4. Ter concordado livremente e assinado o termo de consentimento, após todos os elementos essenciais do protocolo terem sido esclarecidos, antes de qualquer procedimento.</p> <p>Crítérios e exclusão:</p> <p>1. Os resultados dos exames complementares estarem fora dos valores considerados normais, a menos que sejam considerados, pelo médico, clinicamente irrelevantes;</p> <p>2. Os voluntários que foram submetidos à cirurgia ou que foram internados por qualquer motivo antes do início do estudo serão avaliados criteriosamente pelo médico quanto à admissão no estudo observando um período de exclusão podendo variar de 04 a 08 semanas;</p> <p>3. Teste positivo para hepatite B, hepatite C ou HIV nos exames pré-estudo;</p> <p>4. O voluntário ter sabidamente uma hipersensibilidade à droga em estudo ou a compostos quimicamente relacionados;</p> <p>5. O voluntário ter participado de qualquer estudo experimental ou ter ingerido qualquer droga experimental dentro dos seis meses que antecedem o início deste estudo (Resolução RDC nº34, de 3 de junho de 2008);</p> <p>6. Ter feito uso de medicação regular dentro das 2 semanas ou 5 meias-vidas (o que tiver maior duração) da primeira dose do medicamento em estudo. Será permitido apenas o uso de anticoncepcional para mulheres. O uso eventual de medicação, que a juízo do Investigador ou médico responsável não interfira na farmacocinética do medicamento em estudo não será considerado como critério de exclusão;</p> <p>7. O voluntário ter história de abuso de álcool ou ter ingerido bebidas alcoólicas nas 24 horas que antecederam o período de internação;</p> <p>8. O voluntário ter história de abuso de drogas (serão excluídos os voluntários que apresentarem o uso de maconha e haxixe em menos de três meses antes da consulta. Para drogas como a cocaína, feniclidina (PCP), crack, heroína serão excluídos os voluntários que apresentaram o uso em menos de 1 ano antes da consulta);</p> <p>9. Consumo de drogas indutoras e/ou inibidoras do metabolismo hepático (exemplo de drogas indutoras: barbitúricos, carbamazepina, fenitoína, glicocorticoide, omeprazol; exemplo de drogas inibidoras: antidepressivos (ISRS), cimetidina, diltiazem, macrolídeos, imidazólicos, neurolépticos, verapamil, fluorquinolonas, antihistamínicos), organotóxicas ou que apresentem tempo de meia-vida longo (meia-vida >50horas) dentro de 30 dias antes da administração do medicamento em</p>
<p>Endereço: Av. Rio Verde, Qd - 06 - Lt - 1 a 7</p> <p>Bairro: CIDADE VERA CRUZ CEP: 74.935-530</p> <p>UF: GO Município: APARECIDA DE GOIANIA</p> <p>Telefone: (62)3240-1906 E-mail: cep@icf.com.br</p>	<p>Endereço: Av. Rio Verde, Qd - 06 - Lt - 1 a 7</p> <p>Bairro: CIDADE VERA CRUZ CEP: 74.935-530</p> <p>UF: GO Município: APARECIDA DE GOIANIA</p> <p>Telefone: (62)3240-1906 E-mail: cep@icf.com.br</p>
<p>Página 01 de 05</p>	<p>Página 02 de 05</p>

INSTITUTO DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DE
ESTUDOS E PESQUISAS S/S



Continuação do Parecer: 508.026

estudo;

10. Uso de inibidores da monoaminoxidase (MAO) (moclobemida, iproniazida, nialamida, fenezina, tranilcipromina) duas semanas antes do início do tratamento;
11. Uso de inibidores de recaptção de serotonina (duloxetine, milnaciprano, nefazodona, venlafaxina, citalopram, escitalopram, fluoxetine, paroxetina, sertralina, fluvoxamina);
12. Voluntários com qualquer doença psiquiátrica e/ou psicológica (inclusive depressão), a menos que julgado clinicamente não significativo pelo investigador clínico;
13. O voluntário ter história clinicamente significativa e/ou presença de patologia gastrointestinal (exemplo: diarreia crônica, doença inflamatória do intestino), sintomas gastrointestinais presentes (exemplo: diarreia, vômito), doença hepática ou renal, ou outra condição conhecida que pode interferir na absorção, distribuição, metabolismo, ou excreção do medicamento. Voluntários que apresentaram episódios de vômito dentro das 24 horas antes da administração do medicamento deverão ser avaliados pelo investigador clínico quanto à possibilidade de permanecer no estudo;
14. O voluntário ter história clinicamente significativa e/ou presença de doença neurológica, endócrina, pulmonar (inclusive recente história de asma), hematológica, imunológica, cerebral, metabólica ou doença cardiovascular, ter hipo ou hipertensão de qualquer etiologia que necessite de tratamento farmacológico; ter história ou caso clínico de infarto do miocárdio, angina e/ou insuficiência cardíaca;
15. O voluntário ter doado ou perdido 450mL ou mais de sangue dentro dos três meses que antecederam ao estudo;
16. O voluntário ter qualquer condição que o impeça de participar do estudo pelo julgamento do investigador;
17. O voluntário ser vegetariano ou ter hábitos alimentares que impossibilitem a ingestão da dieta oferecida no estudo;
18. O voluntário apresentar inabilidade para manter-se sentado durante 1 hora após a administração do medicamento, ou tempo necessário a critério do investigador clínico;
19. O voluntário ser fumante inveterado (fumar mais de 5 cigarros por dia);
20. Exame de ßHCG positivo para mulheres;
21. Mulheres que estejam em período de amamentação.

Quanto à confidencialidade e sigilo, os registros que possam identificar o participante de pesquisa serão mantidos em sigilo. Contudo, a pesquisadora principal, membros da equipe, auditores, o patrocinador do estudo, os membros do Comitê de Ética ou autoridades dos órgãos

Endereço: Av. Rio Verde, Qd - 06 - Lt - 1 a 7
Bairro: CIDADE VERA CRUZ CEP: 74.935-530
UF: GO Município: APARECIDA DE GOIANIA
Telefone: (62)3240-1906 E-mail: oep@icf.com.br

Página 03 de 06

INSTITUTO DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DE
ESTUDOS E PESQUISAS S/S



Continuação do Parecer: 508.026

regulamentares envolvidos terão acesso aos registros originais de dados clínicos do participante de pesquisa, na extensão em que for permitido pela Lei e regulamentações aplicáveis, com o objetivo de verificar os procedimentos e dados do ensaio, sem violar a condição de que as informações não poderão ser divulgadas.

O valor total do orçamento apresentado faz referência à etapa clínica do estudo.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar os impactos de anticoagulantes sobre parâmetros da validação de métodos bioanalíticos para estudos farmacocinéticos e de biodisponibilidade para fármacos com diferentes características iônicas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:



* Riscos referentes ao Naproxeno sódico: dor abdominal, constipação, diarreia, náuseas, estomatite ulcerativa, esofagite, sangramento e/ou perfuração esofágica, ulceração gastrointestinal péptica e não péptica, hematêmese, melena, colite, dispepsia; disfunção cognitiva, depressões, incapacidade de concentração, anormalidades do sono, insônia, sede, sudorese, convulsões, sonolência, vertigens, tontura, mal estar, fraqueza muscular, mialgia; erupções cutâneas, prurido, púrpura, edemas, alopecia, necrólise epidermal, eritema multiforme e nodoso, liquen planus, rash cutâneo, Síndrome de Stevens-Johnson, urticária, reações fotossensíveis, epidermólise bolhosa; dispneia, asma, pneumonite eosinofílica; palpitações, insuficiência; cardíaca congestiva, hipertensão, edema pulmonar e vasculite; distúrbios auditivos e visuais, tinitus, opacidade corneana, papilite, neurite óptica retrobulbar e papiledema.

*Riscos referentes ao Succinato de sumatriptano: dispneia; bradicardia, taquicardia, palpitações, arritmias cardíacas, alterações isquêmicas transitórias no ECG, vasoespasm arterial coronariano, angina, infarto do miocárdio; hipotensão, hipertensão transitória, síndrome de Raynaud, rubor, vertigem, sonolência, distúrbios sensoriais incluindo parestesia e hipoestesia; náuseas e vômitos, colite isquêmica; reações de hipersensibilidade, variando de hipersensibilidade cutânea a anafilaxia; Nistagmo, escotoma, oscilação, diplopia, visão reduzida, tremor, distonia.

*Benefícios da Pesquisa: A participação do participante da pesquisa no estudo é de caráter experimental, não tendo o objetivo de submetê-lo a um tratamento terapêutico. Ao participar deste estudo o participante da pesquisa será avaliado e acompanhado por uma equipe médica qualificada além de realizar uma avaliação clínica criteriosa e detalhada, incluindo exames clínicos e laboratoriais, que irão atestar a higidez do mesmo. A participação do participante da pesquisa é muito importante e desta forma estará contribuindo efetivamente na garantia da

Endereço: Av. Rio Verde, Qd - 06 - Lt - 1 a 7
Bairro: CIDADE VERA CRUZ CEP: 74.935-530
UF: GO Município: APARECIDA DE GOIANIA
Telefone: (62)3240-1906 E-mail: oep@icf.com.br

Página 04 de 06

<p style="text-align: center;">INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ESTUDOS E PESQUISAS S/S</p> 	<p style="text-align: center;">INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ESTUDOS E PESQUISAS S/S</p> 
<p>Continuação do Parecer: 508.028</p> <p>qualidade do medicamento oferecido ao paciente.</p> <p>Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Trata-se de um estudo mono-cêntrico, prospectivo, um tratamento, um período, truncado em 06 horas utilizando-se de 04 participantes de pesquisa sadios de ambos os sexos, com idade entre 18 e 50 anos. A dose a ser administrada será de 275mg de naproxeno sódico, correspondente a 1 comprimido revestido (via oral) e uma dose de 50 mg de succinato de sumatriptano correspondente a 1 comprimido revestido (via oral) juntamente com 200ml de água após um período de no mínimo 10 horas de jejum. De acordo com as bulas dos medicamentos, esta dose é menor que a recomendada para um adulto, ou seja, não há risco de superdosagem.</p> <p>Os participantes de pesquisa ficarão internados durante 18 horas sendo liberados da internação após a coleta de 06 horas.</p> <p>O volume total de sangue coletado não ultrapassará 420mL, o que é considerado seguro, por ser menor que o volume coletado em uma doação de sangue (450mL).</p> <p>Após coletadas as amostras de material biológico, as mesmas serão processadas e transportadas para unidade analítica da Universidade Federal de Minas Gerais - Faculdade de Farmácia. Técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) será utilizada para determinação simultânea de naproxeno sódico e succinato de sumatriptano. A análise estatística para os fármacos em questão será feita a comparação de médias de ASC(0-t) e Cmax para os dois tipos de anticoagulantes.</p> <p>Os dados e exames dos participantes de pesquisa serão arquivados em sigilo por, pelo menos, 15 anos.</p> <p>Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Todos os termos foram apresentados e estão em conformidade com o exigido legalmente. Protocolo avaliado: Versão 1.0 Data 02/01/14 TCLE: Versão 1.0 Data 02/01/14</p> <p>Recomendações: Não há recomendações.</p> <p>Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: *Pendência 01: No protocolo página 28, item 9.3.4, consta que o transporte de amostras deverá ser realizado pelo Laboratório Santa Inês. Favor esclarecer se o transporte realmente será realizado por este laboratório.</p>	<p>Continuação do Parecer: 508.028</p> <p>Resposta: O item 9.3.4 referente ao Transporte externo e entrega das amostras biológicas da etapa clínica para a etapa analítica ficou descrito de maneira errada, não será o laboratório Santa Inês que irá realizar o transporte. Estaremos adequando o item do protocolo e um novo protocolo versão 1.0 de 02/01/2014 será anexado à plataforma Brasil.</p> <p>Análise: Na nova versão de protocolo apresentada, o Centro explicita que as amostras biológicas serão transferidas através de transporte aéreo e descreve procedimentos que serão seguidos para garantir a integridade das mesmas, durante o transporte. Pendência atendida.</p> <p>*Pendência 02: no 'Projeto de pesquisa' é mencionado orçamento somente para a realização da etapa clínica. Favor complementar o documento para constar o orçamento para as etapas analítica e estatística. Esclarecemos que o pesquisador responsável deve demonstrar garantias de que existem recursos para a realização da pesquisa do seu início até o seu fim.</p> <p>Resposta: Um novo orçamento contemplando as etapas analítica e estatística foi anexado na plataforma Brasil.</p> <p>Análise: Pendência atendida.</p> <p>Situação do Parecer: Aprovado</p> <p>Necessita Apreciação da CONEP: Não</p> <p>Considerações Finais a critério do CEP:</p> <p style="text-align: right;">APARECIDA DE GOIANIA, 08 de Janeiro de 2014</p> <p style="text-align: right;">_____ Assinador por: Sara Graciella Feliz Pereira (Coordenador)</p>
<p>Endereço: Av. Rio Verde, Qd - 06 - Lt - 1 a 7 Bairro: CIDADE VERA CRUZ CEP: 74.935-530 UF: GO Município: APARECIDA DE GOIANIA Telefone: (62)3240-1906 E-mail: cep@icf.com.br</p>	<p>Endereço: Av. Rio Verde, Qd - 06 - Lt - 1 a 7 Bairro: CIDADE VERA CRUZ CEP: 74.935-530 UF: GO Município: APARECIDA DE GOIANIA Telefone: (62)3240-1906 E-mail: cep@icf.com.br</p>
Página 05 de 06	Página 05 de 06