

## Etapa Analítica

### Tarefa

Tendo por base o artigo disponibilizado (Kano, E.K.; Serra, C.H.D.R.; Koono, E.E.M.; Fukuda, K.; Porta, V. An efficient HPLC-UV method for the quantitative determination of cefadroxil in human plasma and its application in pharmacokinetic studies. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 35, p. 1871-1881, 2012) e a Resolução RDC 27/12 - Validação de Métodos Bioanalíticos, descreva como foram determinados os parâmetros de validação a seguir:

- linearidade
- limite inferior de quantificação (LIQ)
- recuperação
- estabilidade
- precisão
- exatidão

Descreva quais os tipos de amostras empregadas, quantas amostras e quantas replicatas foram analisadas, qual o tratamento ao qual as amostras foram submetidas e os cálculos empregados.

#### **Resolução:**

##### Linearidade

A linearidade foi definida utilizando-se amostras de plasma padrão da curva de calibração. Estabeleceu-se correlação linear entre a concentração, considerada variável independente (x) e a relação entre as áreas do pico de cefadroxila (analito) e de PI (padrão-interno) (P/PI), considerada variável dependente (y). Os parâmetros da correlação foram estimados através do método dos mínimos quadrados. A linearidade foi avaliada pelo valor do coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ), que deve ser superior a 0,98.

As amostras de plasma padrão da curva de calibração foram submetidas ao processo de pré-tratamento por precipitação de proteínas com acetonitrila após adição de padrão interno e analisadas por CLAE com detector UV-VIS a 230 nm.

A corrida analítica foi constituída por:

- amostras de plasma padrão da curva de calibração de 40,0 (CC1), 32,0 (CC2), 24,0 (CC3), 16,0 (CC4), 8,0 (CC5), 4,0 (CC6), 1,0 (CC7) e 0,4 (CC8) µg/mL– análise em replicata de cinco.

Para o estabelecimento da correlação empregaram-se os valores médios de relação entre as áreas do pico de cefadroxila (analito) e de PI (padrão-interno) (P/PI) das cinco replicatas de cada concentração.

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

O limite de quantificação foi determinado utilizando-se amostras de plasma padrão CC8 (0,4 µg/mL) diluídas com plasma branco para a obtenção de concentrações decrescentes do fármaco. Estas amostras foram analisadas para identificação do menor nível quantificado com precisão e exatidão aceitáveis. A exatidão deve estar entre  $\pm 20\%$  do valor nominal da concentração, com coeficiente de variação de, no máximo, 20 %.

As amostras de plasma padrão da curva de calibração e de plasma padrão CC8 diluídas com plasma branco foram submetidas ao processo de pré-tratamento por precipitação de proteínas com acetonitrila após adição de padrão interno e analisadas por CLAE com detector UV-VIS a 230 nm.

A corrida analítica foi constituída por:

- amostras de plasma padrão da curva de calibração de 40,0 (CC1), 32,0 (CC2), 24,0 (CC3), 16,0 (CC4), 8,0 (CC5), 4,0 (CC6), 1,0 (CC7) e 0,4 (CC8) µg/mL – análise em replicata de cinco.
- amostras de plasma padrão CC8 (0,4 µg/mL) diluídas com plasma branco – análise em replicata de cinco.

A concentração de cefadroxila nas amostras de plasma padrão CC8 (0,4 µg/mL) diluídas com plasma branco foi determinada a partir da curva de calibração. Os valores médios para cada concentração foram comparados com o valor de concentração nominal para determinação do desvio. O coeficiente de variação foi determinado para as cinco replicatas de cada concentração.

### Recuperação

A recuperação foi determinada comparando-se resultados de análises de amostras de plasma de controle de qualidade, submetidas a processo de purificação, a resultados de análises de amostras de cefadroxila (analito) e PI (padrão interno) em metanol, não submetidas ao processo de purificação. O parâmetro utilizado na determinação da recuperação foi a área sob os picos de cefadroxila (analito) e de PI (padrão-interno) obtidos após análise cromatográfica das amostras submetidas à purificação e das amostras não submetidas à purificação. Porcentagens próximas a 100% são desejáveis, porém admitem-se valores menores (50-60%), desde que a recuperação seja precisa e exata, ou seja, admite-se uma variação menor ou igual a 15%.

As amostras de plasma de controle de qualidade foram submetidas ao processo de pré-tratamento por precipitação de proteínas com acetonitrila após adição de padrão interno e analisadas por CLAE com detector UV-VIS a 230 nm. As amostras de cefadroxila (analito) e PI (padrão interno) em metanol, nas mesmas concentrações das amostras de plasma de controle de qualidade, foram submetidas apenas à evaporação do solvente e à reconstituição com fase móvel nas mesmas condições das amostras de plasma.

A corrida analítica foi constituída por:

- amostras de plasma de controle de qualidade de 32,0 (CQA), 16,0 (CQM) e 1,0 (CQB) µg/mL – análise em replicata de cinco
- amostras de cefadroxila (analito) e PI (padrão interno) em metanol, nas mesmas concentrações das amostras de plasma de controle de qualidade (CQA, CQM e CQB) – análise em replicata de cinco

A recuperação de cefadroxila corresponde à relação entre área do pico de cefadroxila para amostras submetidas ao processo de pré-tratamento e área do pico de cefadroxila para amostras não submetidas ao processo de pré-tratamento. Utilizaram-se os valores médios de área do pico das cinco replicatas de cada concentração.

A recuperação de PI corresponde à relação entre área do pico de PI para amostras submetidas ao processo de pré-tratamento e área do pico de PI para amostras não submetidas ao processo de pré-tratamento. Utilizaram-se os valores médios de área do pico das quinze replicatas, uma vez que a quantidade de PI é sempre a mesma.

## Estabilidade

### Estabilidade de curta duração

A estabilidade de curta duração foi determinada por meio da comparação dos resultados de análises de amostras de plasma de controle de qualidade em três concentrações (CQB, CQM, CQA) recém-preparadas e mantidas à temperatura ambiente por 4 horas antes do início do procedimento de pré-tratamento (tempo 4 horas) com os resultados de amostras de plasma de controle de qualidade em três concentrações (CQB, CQM, CQA) recém-preparadas e imediatamente submetidas ao procedimento de pré-tratamento (tempo 0 horas). Admitiram-se desvios entre concentração de 4 horas e concentração de 0 horas entre  $\pm 15\%$

As amostras foram submetidas ao processo de pré-tratamento por precipitação de proteínas com acetonitrila após adição de padrão interno e analisadas por CLAE com detector UV-VIS a 230 nm.

As corridas analíticas foram constituídas por:

- amostras de plasma padrão da curva de calibração de 40,0 (CC1), 32,0 (CC2), 24,0 (CC3), 16,0 (CC4), 8,0 (CC5), 4,0 (CC6), 1,0 (CC7) e 0,4 (CC8)  $\mu\text{g/mL}$  – análise simples
- amostras de plasma de controle de qualidade de 32,0 (CQA), 16,0 (CQM) e 1,0 (CQB)  $\mu\text{g/mL}$  – análise em replicata de três amostras do tempo 0 horas três amostras do tempo 4 horas

A concentração de cefadroxila nas amostras de CQ de 0 e 4 horas foi determinada a partir da curva de calibração. Os valores médios para cada concentração e tempo foram comparados entre si para determinação do desvio.

### Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

A estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento foi determinada por meio da comparação dos resultados de análises de amostras de plasma de controle de qualidade recém-preparadas e submetidas a um, dois e três ciclos de congelamento e descongelamento antes do início do procedimento de pré-tratamento com os resultados de amostras recém-preparadas e imediatamente submetidas ao procedimento de pré-tratamento. Admitiram-se desvios entre  $\pm 15\%$ .

As amostras de plasma de controle de qualidade utilizadas neste estudo foram preparadas, congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  e mantidas nesta temperatura durante 24 horas após o que foram

descongeladas à temperatura ambiente. O processo de congelamento/descongelamento foi repetido por mais duas vezes, completando-se três ciclos. As amostras foram analisadas imediatamente após o preparo (tempo 0 horas) e após cada ciclo de congelamento/descongelamento (tempos 24 horas, 48 horas e 72 horas).

As amostras foram submetidas ao processo de pré-tratamento por precipitação de proteínas com acetonitrila após adição de padrão interno e analisadas por CLAE com detector UV-VIS a 230 nm.

As corridas analíticas foram constituídas por:

- amostras de plasma padrão da curva de calibração de 40,0 (CC1), 32,0 (CC2), 24,0 (CC3), 16,0 (CC4), 8,0 (CC5), 4,0 (CC6), 1,0 (CC7) e 0,4 (CC8) µg/mL – análise simples
- amostras de plasma de controle de qualidade de 32,0 (CQA), 16,0 (CQM) e 1,0 (CQB) µg/mL – análise em replicata de três amostras do tempo 0 horas, três amostras do tempo 24 horas, três amostras do tempo 48 horas e três amostras do tempo 72 horas

A concentração de cefadroxila nas amostras de CQ de 0, 24, 48 e 72 horas foi determinada a partir da curva de calibração. Os valores médios para cada concentração e tempo foram comparados entre si para determinação do desvio.

#### Estabilidade pós-processamento

A estabilidade pós-processamento foi determinada por meio da comparação dos resultados de análises de amostras de plasma de controle de qualidade recém-preparadas, submetidas ao procedimento de pré-tratamento e mantidas à temperatura ambiente por 48 horas antes do início da análise cromatográfica (tempo 48 horas) com os resultados de amostras de plasma de controle de qualidade recém-preparadas, submetidas ao procedimento de pré-tratamento e à análise cromatográfica imediatamente após o procedimento de pré-tratamento (tempo 0 horas). Admitiram-se desvios entre  $\pm 15\%$ .

As amostras foram submetidas ao processo de pré-tratamento por precipitação de proteínas com acetonitrila após adição de padrão interno e analisadas por CLAE com detector UV-VIS a 230 nm.

As corridas analíticas foram constituídas por:

- amostras de plasma padrão da curva de calibração de 40,0 (CC1), 32,0 (CC2), 24,0 (CC3), 16,0 (CC4), 8,0 (CC5), 4,0 (CC6), 1,0 (CC7) e 0,4 (CC8) µg/mL – análise simples
- amostras de plasma de controle de qualidade de 32,0 (CQA), 16,0 (CQM) e 1,0 (CQB) µg/mL – análise em replicata de três amostras do tempo 0 horas e de três amostras do tempo 48 horas.

A concentração de cefadroxila nas amostras de CQ de 0 e 48 horas foi determinada a partir da curva de calibração. Os valores médios para cada concentração e tempo foram comparados entre si para determinação do desvio.

#### Estabilidade de longa duração

A estabilidade de longa duração foi determinada por meio da comparação dos resultados de análises de amostras de plasma de controle de qualidade recém-preparadas e mantidas à temperatura de armazenamento (-20°C) por 60 dias (tempo 60 dias) com os resultados de amostras recém-preparadas analisadas imediatamente após o preparo (tempo 0 horas). Admitiram-se desvios entre  $\pm 15\%$ .

As amostras foram submetidas ao processo de pré-tratamento por precipitação de proteínas com acetonitrila após adição de padrão interno e analisadas por CLAE com detector UV-VIS a 230 nm.

As corridas analíticas foram constituídas por:

- amostras de plasma padrão da curva de calibração de 40,0 (CC1), 32,0 (CC2), 24,0 (CC3), 16,0 (CC4), 8,0 (CC5), 4,0 (CC6), 1,0 (CC7) e 0,4 (CC8)  $\mu\text{g/mL}$  – análise simples
- amostras de plasma de controle de qualidade de 32,0 (CQA), 16,0 (CQM) e 1,0 (CQB)  $\mu\text{g/mL}$  – análise em replicata de três amostras do tempo 0 horas e de três amostras tempo 60 dias

A concentração de cefadroxila nas amostras de CQ de 0 horas e 60 dias foi determinada a partir da curva de calibração. Os valores médios para cada concentração e tempo foram comparados entre si para determinação do desvio.

### Precisão

A precisão foi determinada pela análise de amostras de plasma de controle de qualidade em replicata. Foram avaliadas a precisão intra-ensaio (análises realizadas no mesmo dia) e inter-ensaios (análises realizadas em dias diferentes). O valor do coeficiente de variação (CV%) não deve ser superior a 15%.

As amostras foram submetidas ao processo de pré-tratamento por precipitação de proteínas com acetonitrila após adição de padrão interno e analisadas por CLAE com detector UV-VIS a 230 nm.

As corridas analíticas foram constituídas por:

- amostras de plasma padrão da curva de calibração de 40,0 (CC1), 32,0 (CC2), 24,0 (CC3), 16,0 (CC4), 8,0 (CC5), 4,0 (CC6), 1,0 (CC7) e 0,4 (CC8)  $\mu\text{g/mL}$  – análise simples
- amostras de plasma de controle de qualidade de 32,0 (CQA), 16,0 (CQM) e 1,0 (CQB)  $\mu\text{g/mL}$  – análise em replicata de cinco no mesmo dia para precisão intra-dia e análise em replicata de cinco em cinco dias diferentes para precisão inter-dias

A concentração de cefadroxila nas amostras de CQ foi determinada a partir da curva de calibração. O coeficiente de variação foi determinado para as cinco replicatas de cada concentração tanto para precisão intra-ensaio quanto para precisão inter-ensaios.

### Exatidão

A exatidão foi determinada pela análise de amostras de plasma de controle de qualidade em replicata. Foram avaliadas a exatidão intra-ensaio (análises realizadas no mesmo dia) e inter-

ensaios (análises realizadas em dias diferentes). A exatidão deve estar entre  $\pm 15\%$  do valor nominal da concentração.

As amostras foram submetidas ao processo de pré-tratamento por precipitação de proteínas com acetonitrila após adição de padrão interno e analisadas por CLAE com detector UV-VIS a 230 nm.

As corridas analíticas foram constituídas por:

- amostras de plasma padrão da curva de calibração de 40,0 (CC1), 32,0 (CC2), 24,0 (CC3), 16,0 (CC4), 8,0 (CC5), 4,0 (CC6), 1,0 (CC7) e 0,4 (CC8)  $\mu\text{g/mL}$  – análise simples
- amostras de plasma de controle de qualidade de 32,0 (CQA), 16,0 (CQM) e 1,0 (CQB)  $\mu\text{g/mL}$  – análise em replicata de cinco no mesmo dia para exatidão intra-dia e análise em replicata de cinco em cinco dias diferentes para exatidão inter-dias

A concentração de cefadroxila nas amostras de CQ foi determinada a partir da curva de calibração. Os valores médios para cada concentração foram comparados ao valor nominal para determinação do desvio.