**Validação analítica de um método de análise para Anandamida**

O composto endógeno anandamida (AEA), derivado do ácido araquidônico, faz parte de uma classe de neurotransmissores conhecidos como endocanabinóides (ECs) que, juntamente dos receptores celulares canabinóides (CB1 e CB2) e enzimas metabólicas, compõem o chamado sistema endocanabinóide (eCB). Estudos realizados indicam que os níveis endógenos desses ECs sofrem alterações à estímulos fisiológicos, farmacológicos e patológicos, fazendo com que a determinação de suas concentrações em amostras biológicas sejam alvo de estudos de diversas patologias.

****

**Figura 1.** Estrutura química da anandamida

Desenvolveu-se um método de extração líquido-líquido assistida por salting-out para a analise desse composto em um sistema de cromatografia de ultra eficiência acoplado a espectrometria de massas em tandem (SALLE-UHPLC-MS/MS) em amostras de encéfalos de ratos. Após o preparo adequado da amostra o extrato resultante é injetado no sistema cromatográfico sob as seguintes condições:

Coluna cromatográfica: Kinetex C18 (100 mm x 2,1 mm x 1,7 μm)

Temperatura da coluna: 40 °C

Fase móvel: A) Solução aquosa de ácido fórmico (0,5%) e B) Acetonitrila, (30:70 v/v), na vazão de 0,4 mL min-1.

Para as determinações quantitativas UHPLC-MS/MS adotou-se o uso de padrões internos, empregando o padrão isotópico AEA d4 na concentração de 5,0 ng mL-1.

1. **Linearidade e Limite de Quantificação**

Com base nos conjuntos de dados apresentados nas tabelas de 1 a 3, defina a linearidade estabelecida no método desenvolvido bem como o limite de quantificação (Lower Limit of Quantification, LLOQ). As curvas obtidas atendem aos critérios de validação?

**Tabela 1**. Conjunto de dados 1

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Concentração nominal (ng mL-1) | Área AEA | Área AEAd |
| 1,00 | 5739 | 2051 |
| 3,00 | 21789 | 7145 |
| 4,00 | 23957 | 7411 |
| 5,00 | 20084 | 5796 |
| 7,00 | 26071 | 7169 |
| 10,00 | 19602 | 4762 |

**Tabela 2**. Conjunto de dados 2

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Concentração nominal (ng mL-1) | Área AEA | Área AEAd |
| 1,00 | 17831 | 6306 |
| 3,00 | 25300 | 8089 |
| 4,00 | 23243 | 7308 |
| 5,00 | 28943 | 8515 |
| 7,00 | 26393 | 7203 |
| 10,00 | 8738 | 2100 |

 **Tabela 3**. Conjunto de dados 3

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Concentração nominal (ng mL-1) | Área AEA | Área AEAd |
| 1,00 | 3076 | 1102 |
| 3,00 | 6455 | 2061 |
| 4,00 | 23905 | 7214 |
| 5,00 | 26016 | 7598 |
| 7,00 | 26181 | 6997 |
| 10,00 | 16468 | 3975 |

1. **Precisão e exatidão**

Baseado nos dados apresentados nas tabelas 4 e 5, calcule os valores de precisão e exatidão inter e intra-dia para as concentrações de 1,00; 5,00 e 10,00 ng mL-1. Após os cálculos verifique se os valores obtidos estão de acordo com o estabelecido pelos guias de validação.

**Tabela 4.** Dados coletados para ensaios de precisão e exatidão inter-dia

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Concentração nominal (ng mL-1) | Área AEA | Área AEAd |
| 1,00 | 5739 | 2051 |
| 17831 | 6306 |
| 3076 | 1102 |
| 4534 | 1629 |
| 10345 | 3681 |
| 5,00 | 20084 | 5796 |
| 28943 | 8515 |
| 26016 | 7598 |
| 23481 | 6606 |
| 26213 | 7440 |
| 10,00 | 19602 | 4762 |
| 8738 | 2100 |
| 16468 | 3975 |
| 29727 | 7339 |
| 24510 | 2516 |

**Tabela 5.** Dados coletados para ensaios de precisão e exatidão intra-dia

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Concentração nominal (ng mL-1) | Área AEA | Área AEAd |
| 1,00 | 5739 | 2051 |
| 17831 | 6306 |
| 13951 | 4964 |
| 18464 | 6653 |
| 11723 | 4130 |
| 5,00 | 20084 | 5796 |
| 28943 | 8515 |
| 26732 | 7534 |
| 27314 | 8005 |
| 27145 | 8017 |
| 10,00 | 19602 | 4762 |
| 8738 | 2100 |
| 29727 | 7289 |
| 28482 | 6813 |
| 16378 | 3868 |

1. **Seletividade**

As figuras 2 e 3 apresentam, respectivamente, os cromatogramas de uma amostra branco e uma amostra enriquecida no LOQ. Comente sobre a seletividade do método.



**Figura 2.** Cromatograma amostra branco



**Figura 2.** Cromatograma amostra enriquecida no LOQ

1. **Efeito Matriz**

Para o estudo do efeito da matriz foram analisadas oito matrizes diferentes, ou seja, oito encéfalos distintos, enriquecidos nas concentrações de 3,00 e 7,00 ng mL-1 e soluções aquosas nas mesmas concentrações. A tabela 6 apresenta os valores de área obtidos. Calcular os fatores de matriz normalizados para cada matriz e verificar o coeficiente de variação. Discutir sobre o efeito da matriz no método desenvolvido.

**Tabela 6.** Valores de área para AEA e AEAd em oito matrizes distintas e em solução aquosa para avaliação do efeito matriz

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Amostra | Concentração de 3,00 ng mL-1 | Concentração de 7,00 ng mL-1 |
| **Área AEA** | **Área AEAd** | **Área AEA** | **Área AEAd** |
| Matriz 1 | 25300 | 8089 | 26393 | 7203 |
| Matriz 2 | 6455 | 2061 | 37309 | 10121 |
| Matriz 3 | 21789 | 7145 | 32948 | 8759 |
| Matriz 4 | 28103 | 9544 | 30931 | 8202 |
| Matriz 5 | 23308 | 7847 | 26181 | 6997 |
| Matriz 6 | 11513 | 3651 | 30313 | 8120 |
| Matriz 7 | 20839 | 6568 | 34356 | 9075 |
| Matriz 8 | 19544 | 6694 | 32790 | 8900 |
| Água | 25478 | 10726 | 34925 | 10698 |
| 26243 | 11004 | 34836 | 10799 |
| 27193 | 10457 | 34743 | 10253 |

1. **Efeito Residual**

Para a avaliação do efeito residual foram realizadas três injeções de uma mesma amostra branco, sendo uma antes e duas logo após a injeção da mesma amostra enriquecida na concentração de 10,00 ng mL-1. A tabela 7 apresenta os valores de área obtidos e a ordem das injeções, baseando-se nestes discuta se há efeito residual significativo.

As amostras branco foram adicionadas de padrão interno AEAd.

**Tabela 7.** Valores de área de AEA e do padrão deuterado AEAd para avaliação do efeito residual

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Injeção | Área AEA | Área AEAd |  |
| Branco | 213 | 5263 |  |
| Conc. 10,00 ng mL-1 | 32630 | 5770 |  |
| Branco | 192 | 5250 |  |
| Branco | 245 | 5077 |  |