

I Identificação do estudo

Título estudo	Validação de método bioanalítico para quantificação de cefadroxil em amostras de plasma para aplicação em ensaios de biodisponibilidade relativa ou bioequivalência de medicamentos contendo cefadroxil
Pesquisadores	
Fármaco(s) envolvido(s)	cefadroxil

II Etapa analítica

II.1 Método bioanalítico

Analito(s)	cefadroxil
Técnica bioanalítica	CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência
Detecção	UV
Padrão interno	lamivudina
Matriz biológica	plasma
Anticoagulante	n.i. (não informado)
Purificação amostra	precipitação de proteínas

II.2 Validação do método bioanalítico

Metodologia	Resolução ANVISA RE 899/03, 29 de maio de 2003
Analito(s)	cefadroxil
Padrão interno (PI)	lamivudina
Especificidade	plasma humano normal, plasma humano hemolisado, plasma humano lipêmico
Linearidade	0,4-40,0 µg/mL
Limite quantificação inferior	0,4 µL
Limite quantificação superior	40,0 µg/mL
Recuperação analito(s)	102,21 %
Recuperação PI	97,94 %
Precisão intra-dia	2,50-11,83 %
Precisão inter-dias	3,83-9,59 %
Exatidão intra-dia	97,01-104,79 %
Exatidão inter-dias	100,49-104,40 %
Estabilidade ciclos descongelamento	3 ciclos
Estabilidade condições análise	48 horas à temperatura ambiente
Estabilidade curta duração	4 horas à temperatura ambiente
Estabilidade longa duração	60 dias a -20°C

III Introdução

A confiabilidade dos resultados de ensaios de biodisponibilidade relativa e de bioequivalência depende da existência de métodos bioanalíticos que permitam a quantificação exata e precisa do fármaco presente nas amostras biológicas coletadas dos voluntários do estudo.

A validação garante que os métodos bioanalíticos apresentem precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, especificidade, reprodutibilidade, estabilidade e recuperação dentro dos limites de confiabilidade necessários à sua aplicação.

O presente estudo descreve a validação de método bioanalítico para quantificação de cefadroxil em amostras de plasma para aplicação em ensaios de biodisponibilidade relativa e de bioequivalência entre medicamentos contendo cefadroxil.

A quantificação de cefadroxil em amostras de plasma pode ser realizada por diversos métodos. Optou-se, no presente estudo, por desenvolver e validar método por CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência, tomando-se por base métodos já descritos na literatura.

IV Objetivo

O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar método bioanalítico por CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação de cefadroxil em amostras de plasma para aplicação em ensaios de biodisponibilidade relativa e de bioequivalência entre medicamentos contendo cefadroxil.

V Procedimentos

V.1 Padrões de referência

Os padrões de referência foram utilizados no preparo de soluções estoque e soluções de trabalho de cefadroxil (analito) e de lamivudina (padrão interno), de amostras de plasma da curva de calibração e de amostras de plasma de controle de qualidade.

Foram empregados padrões de referência primário de cefadroxil e secundário de lamivudina, conforme descrito no **Quadro 1**.

Quadro 1: Descrição dos padrões de referência utilizados no estudo “Validação de método bioanalítico para quantificação de cefadroxil em amostras de plasma para aplicação em ensaios de biodisponibilidade relativa ou bioequivalência de medicamentos contendo cefadroxil”

Substância	Função	Lote	Validade	Teor	Fornecedor
cefadroxil	analito	n.i.	n.i.	n.i.	Farmacopéia Brasileira
lamivudina	padrão interno	n.i.	n.i.	n.i.	FURP

V.2 Plasma branco

O plasma branco foi utilizado no preparo das amostras de plasma padrão da curva de calibração e das amostras de plasma de controle de qualidade.

Empregou-se plasma isento de analito (cefadroxil) e de padrão interno (lamivudina).

V.3 Soluções

V.3.1 Soluções de cefadroxil (analito)

V.3.1.1 Solução estoque padrão de cefadroxil (analito)

A solução estoque padrão de cefadroxil foi preparada pesando-se exatamente 100 mg de padrão de referência de cefadroxil em balança analítica e transferindo-se quantitativamente a massa pesada para balão volumétrico de 100 mL. Completou-se o volume do balão volumétrico com metanol, homogeneizando-se para garantir completa dissolução. A concentração final da solução estoque padrão de cefadroxil obtida foi 1 mg/mL. Esta solução foi acondicionada em frasco devidamente identificado com o código do projeto, a concentração e a data de preparo e armazenada.

V.3.1.2 Soluções de trabalho padrão de cefadroxil (analito)

As soluções de trabalho padrão de cefadroxil PA1, PA2, PA3, PA4, PA5, PA6, PA7 e PA8 foram preparadas a partir da solução estoque padrão, transferindo-se alíquotas adequadas para balões volumétricos e completando-se o volume com mistura água-metanol (90:10, v/v), conforme descrito no **Quadro 2**.

Quadro 2: Preparo das soluções de trabalho padrão de cefadroxil utilizadas no estudo "Validação de método bioanalítico para quantificação de cefadroxil em amostras de plasma para aplicação em ensaios de biodisponibilidade relativa ou bioequivalência de medicamentos contendo cefadroxil"

Solução de trabalho padrão	Concentração da solução estoque padrão (mg/mL)	Volume de solução estoque padrão (mL)	Volume final (mL)	Concentração final (µg/mL)
PA1	1	20	50	400
PA2	1	16	50	320
PA3	1	12	50	240
PA4	1	8	50	160
PA5	1	4	50	80
PA6	1	2	50	40
PA7	1	0,5	50	10
PA8	1	0,2	50	4

Estas soluções foram acondicionadas em frascos devidamente identificados com o código do projeto, a concentração e a data de preparo e armazenadas em geladeira à temperatura de 6°C.

V.3.1.3 Solução estoque controle de qualidade de cefadroxil (analito)

A solução estoque controle de qualidade de cefadroxil foi preparada pesando-se exatamente 100 mg de padrão de referência de cefadroxil em balança analítica e transferindo-se quantitativamente a massa pesada para balão volumétrico de 100 mL. Completou-se o volume do balão volumétrico com metanol, homogeneizando-se para garantir completa dissolução. A concentração final da solução estoque controle de qualidade de cefadroxil obtida foi 1 mg/mL. Esta solução foi acondicionada em frasco devidamente identificado com o código do projeto, a concentração e a data de preparo e armazenada.

V.3.1.4 Soluções de trabalho controle de qualidade de cefadroxil (analito)

As soluções de trabalho controle de qualidade de cefadroxil QA, QM, QB e QLIQ foram preparadas a partir da solução estoque controle de qualidade, transferindo-se alíquotas adequadas para balões volumétricos e completando-se o volume com mistura água-metanol (90:10, v/v), conforme descrito no **Quadro 3**.

Quadro 3: Preparo das soluções de trabalho controle de qualidade de cefadroxil utilizadas no estudo “Validação de método bioanalítico para quantificação de cefadroxil em amostras de plasma para aplicação em ensaios de biodisponibilidade relativa ou bioequivalência de medicamentos contendo cefadroxil”

Solução de trabalho controle de qualidade	Concentração da solução estoque controle de qualidade (mg/mL)	Volume de solução estoque controle de qualidade (mL)	Volume final (mL)	Concentração final (µg/mL)
QA	1	10	100	100
QM	1	5	100	50
QB	1	1	100	10
QLIQ	n.a. (não se aplica)	n.a.	n.a.	n.a.

Estas soluções foram acondicionadas em frascos devidamente identificados com o código do projeto, a concentração e a data de preparo e armazenadas em geladeira à temperatura de 6°C.

V.3.2 Soluções de lamivudina (padrão interno)

V.3.2.1 Solução estoque de lamivudina (padrão interno)

A solução estoque de lamivudina foi preparada pesando-se exatamente 10 mg de padrão de referência de lamivudina em balança analítica e transferindo-se quantitativamente a massa pesada para balão volumétrico de 100 mL. Completou-se o volume do balão volumétrico com metanol, homogeneizando-se para garantir completa dissolução. A concentração final da solução estoque de lamivudina obtida foi 100 µg/mL. Esta solução foi acondicionada em frasco devidamente identificado com o código do projeto, a concentração e a data de preparo e armazenada.

V.3.2.2 Solução de trabalho de lamivudina (padrão interno)

A solução de trabalho de lamivudina (PI1) foi preparada a partir da solução estoque, transferindo-se alíquota de 10 mL para balão volumétrico de 100 mL e completando-se o volume com mistura água-metanol (90:10, v/v), conforme descrito no **Quadro 4**.

Quadro 4: Preparo da solução de trabalho de lamivudina utilizada no estudo "Validação de método bioanalítico para quantificação de cefadroxil em amostras de plasma para aplicação em ensaios de biodisponibilidade relativa ou bioequivalência de medicamentos contendo cefadroxil"

Solução de trabalho de PI	Concentração da solução estoque de PI (µg/mL)	Volume de solução estoque de PI (mL)	Volume final (mL)	Concentração final (µg/mL)
PI1	100	10	100	10

Esta solução foi acondicionadas em frasco devidamente identificado com o código do projeto, a concentração e a data de preparo e armazenada em geladeira à temperatura de 6°C.

V.4 Amostras de plasma

V.4.1 Amostras de plasma padrão da curva de calibração

As amostras de plasma padrão da curva de calibração CC1, CC2, CC3, CC4, CC5, CC6, CC7 e CC8 foram preparadas a cada dia de análise a partir das soluções de trabalho padrão de cefadroxil.

Acrescentaram-se 25 µL das soluções de trabalho padrão de cefadroxil e 225 µL de plasma branco, conforme descrito no **Quadro 5**. As amostras foram homogeneizadas em agitador de tubo tipo vórtex.

Quadro 5: Preparo das amostras de plasma padrão da curva de calibração utilizadas no estudo "Validação de método bioanalítico para quantificação de cefadroxil em amostras de plasma para aplicação em ensaios de biodisponibilidade relativa ou bioequivalência de medicamentos contendo cefadroxil"

"Amostra de plasma padrão	Solução de trabalho padrão	Concentração da solução de trabalho padrão (µg/mL)	Volume de solução de trabalho padrão (µL)	Volume de plasma branco (µL)	Concentração final (µg/mL)
CC1	PA1	400	25	225	40
CC2	PA2	320	25	225	32
CC3	PA3	240	25	225	24
CC4	PA4	160	25	225	16
CC5	PA5	80	25	225	8
CC6	PA6	40	25	225	4
CC7	PA7	10	25	225	1
CC8	PA8	4	25	225	0,4

Estas amostras foram submetidas ao procedimento de purificação imediatamente após o preparo.

V.4.2 Amostras de plasma de controle de qualidade

As amostras de plasma de controle de qualidade CQA, CQM, CQB e CQLIQ foram preparadas na sua totalidade na mesma data, a partir de soluções de trabalho controle de qualidade de cefadroxil.

Transferiram-se volumes adequados de soluções de trabalho controle de qualidade de cefadroxil para balões volumétricos de 50 mL, conforme descrito no **Quadro 6**. A seguir, adicionou-se lentamente o plasma branco e homogeneizou-se gentilmente para evitar a formação de espuma. Após completar o volume agitou-se vigorosamente para garantir a homogeneização.

Quadro 6: Preparo das amostras de plasma de controle de qualidade utilizadas na etapa analítica no estudo “Validação de método bioanalítico para quantificação de cefadroxil em amostras de plasma para aplicação em ensaios de biodisponibilidade relativa ou bioequivalência de medicamentos contendo cefadroxil”

Amostra de plasma de controle de qualidade	Solução de tra-balho controle de qualidade	Concentração da solução de trabalho de controle de qualidade (µg/mL)	Volume de solução de trabalho controle de qualidade (mL)	Volume de plasma branco (mL)	Concentração final (µg/mL)
CQA	QA	100	16	50	32
CQM	QM	50	16	50	16
CQB	QB	10	5	50	1
CQLIQ	QLIQ	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Após o preparo, estas amostras foram aliquotadas em frascos devidamente identificados com o código do projeto, a concentração e a data de preparo, e armazenadas em congelador a -20°C.

V.5 Procedimento de purificação das amostras de plasma

[As amostras de plasma padrão da curva de calibração, amostras de plasma branco e amostras de plasma de controle de qualidade foram submetidas a procedimento de purificação por precipitação de proteínas plasmáticas.]

V.5.1 Procedimento de purificação das amostras de plasma padrão da curva de calibração

Volume de plasma	250 µL
Volume de solução de trabalho de lamivudina (padrão interno)	25 µL
Solvente de extração	acetonitrila
Volume de solvente de extração	200 µL
Tempo de homogeneização	15 s
Velocidade de homogeneização	n.i.
Tempo de centrifugação	15 min
Velocidade de centrifugação	10000 g
Volume de fase móvel para reconstituição dos extratos	300 µL

V.5.2 Procedimento de purificação das amostras de plasma branco e amostras de plasma de controle de qualidade

Volume de plasma	250 µL
Volume de solução de trabalho de lamivudina (padrão interno)	25 µL
Solvente de extração	acetonitrila
Volume de solvente de extração	200 µL
Tempo de homogeneização	15 s
Velocidade de homogeneização	n.i.
Tempo de centrifugação	15 min
Velocidade de centrifugação	10000 g
Volume de fase móvel para reconstituição dos extratos	300 µL

V.6 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas para quantificação de cefadroxil em amostras de plasma são resumidas a seguir:

Sistema cromatográfico	Sistema composto por: • bomba LC-10ADvp, Shimadzu Scientific Instruments • degaseificador DGU-10ADvp, Shimadzu Scientific Instruments • detector DAD SPD-10ADvp, Shimadzu Scientific Instruments • forno de coluna CTO-10ADvp, Shimadzu Scientific Instruments
Coluna cromatográfica	Phenomenex Synergy MAX RP C18, 150 mm x 4,6 mm, partículas de 4 µm
Pré-coluna cromatográfica	Phenomenex AJO-4287 C18
Temperatura da coluna	35°C
Fase móvel	dihidrogenofosfato de sódio (20 mmol/L)-metanol-acetonitrila, 90:8:2 (v/v/v)
Fluxo da fase móvel	1 mL/min
Detecção	UV, 230 nm
Volume de injeção	30 µL

V.7 Validação do método bioanalítico

V.7.1 Especificidade

Procedimento

A especificidade foi investigado pela análise de, no mínimo, seis amostras de plasma branco para verificação da existência de interferência por parte de componentes endógenos, sendo uma amostra de plasma lipêmico, uma amostra de plasma hemolisado e quatro amostras de plasma normal, obtidas de voluntários sadios e isentas de fármaco e padrão-interno. Interferentes no tempo de retenção do padrão e padrão interno foram aceitos desde que sua resposta representasse no máximo 20% da área do pico correspondente ao limite de quantificação inferior para o padrão e 5% da área do pico do padrão-interno.

As amostras de plasma branco foram submetidas ao procedimento de purificação e à análise cromatográfica nas condições previamente detalhadas.

A corrida analítica foi constituída por:

- ⇒ padrão seco de cefadroxil (analito) – análise simples
- ⇒ padrão seco de lamivudina (padrão interno) – análise simples
- ⇒ quatro amostras de plasma branco normal – análise simples
- ⇒ uma amostra de plasma branco lipêmico – análise simples
- ⇒ uma amostra de plasma branco hemolisado – análise simples

V.7.2 Recuperação

Procedimento

A recuperação foi determinada comparando-se resultados de análises de amostras de plasma de controle de qualidade, submetidas ao processo de purificação, a resultados de análises de amostras contendo cefadroxil (analito) e lamivudina (padrão interno) em água:metanol (90:10, v/v), não submetidas ao processo de purificação. O parâmetro utilizado na determinação da recuperação foi a área sob os picos de cefadroxil (analito) e de lamivudina (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 purificação previamente descrito.

As amostras de cefadroxil (analito) e lamivudina (padrão interno) em água:metanol (90:10, v/v), nas mesmas concentrações das amostras de plasma de controle de qualidade, foram adicionadas de plasma branco purificado conforme previamente descrito, submetidas a secagem e reconstituídas com fase móvel.

Todas as amostras foram analisadas nas condições cromatográficas previamente descritas.

A corrida analítica foi constituída por:

- ⇒ amostras de plasma de controle de qualidade CQA (32 µg/mL), CQM (16 µg/mL) e CQB (1 µg/mL) – análise em sextuplicata
- ⇒ amostras de cefadroxil (analito) e lamivudina (padrão interno) em água:metanol (90:10, v/v), nas mesmas concentrações das amostras de plasma de controle de qualidade (32 µg/mL, 16 µg/mL e 1 µg/mL), adicionadas de plasma branco extraído – análise em sextuplicata

V.7.3 Linearidade

Procedimento

A linearidade foi definida utilizando-se amostras de plasma padrão da curva de calibração. Estabeleceu-se correlação linear entre concentração, considerada variável independente (x), e a relação entre as áreas do pico de cefadroxil (analito) e de lamivudina (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 procedimento de purificação e à análise cromatográfica nas condições previamente descritas.

Foram avaliadas as curvas de calibração analisadas em sete dias diferentes, sendo cada curva de calibração constituída por:

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

V.7.4 Limite de detecção

Procedimento

O limite de detecção foi determinado utilizando-se amostras de plasma padrão em concentrações decrescentes do fármaco. Estas amostras foram analisadas para identificação do menor nível detectado.

As amostras de plasma padrão CC8 foram diluídas com plasma branco e submetidas ao procedimento de purificação e à análise cromatográfica nas condições previamente descritas.

A corrida analítica foi constituída por:

- ⇒ amostras de plasma padrão da curva de calibração de CC1 (40,0 µg/mL), CC2 (32,0 µg/mL), CC3 (24,0 µg/mL), CC4 (16,0 µg/mL), CC5 (8,0 µg/mL), CC6 (4,0 µg/mL), CC7 (1,0 µg/mL) e CC8 (0,4 µg/mL) – análise simples
- ⇒ amostras de plasma padrão CC8 diluídas com plasma branco (125 µL de plasma padrão CC8 e 125 µL de plasma branco) – análise em sextuplicata

V.7.5 Limite de quantificação

Procedimento

O limite de quantificação foi determinado utilizando-se amostras de plasma padrão em 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 CC8 foram submetidas ao procedimento de purificação e à análise cromatográfica nas condições previamente descritas.

A corrida analítica foi constituída por:

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

V.7.6 Precisão

Procedimento

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

As amostras de plasma de controle de qualidade foram submetidas ao processo de purificação e analisadas nas condições cromatográficas conforme previamente descrito.

As corridas analíticas foram constituídas por:

- ⇒ amostras de plasma padrão da curva de calibração de CC1 (40,0 µg/mL), CC2 (32,0 µg/mL), CC3 (24,0 µg/mL), CC4 (16,0 µg/mL), CC5 (8,0 µg/mL), CC6 (4,0 µg/mL), CC7 (1,0 µg/mL) e CC8 (0,4 µg/mL) – análise simples
- ⇒ amostras de plasma de controle de qualidade CQA (32 µg/mL), CQM (16 µg/mL) e CQB (1 µg/mL) – análise em sextuplicata para precisão intra-dia e de seis determinações por dia em quatro dias para precisão inter-dias.

V.7.7 Exatidão

Procedimento

A exatidão foi determinada pela análise de amostras de plasma de controle de qualidade em sextuplicata. Foram avaliadas a exatidão intra-dia (análises realizadas no mesmo dia) e inter-dias (análises realizadas em dias diferentes). A exatidão deve estar entre $\pm 15\%$ do valor nominal da concentração.

As amostras de plasma de controle de qualidade foram submetidas ao processo de purificação e analisadas nas condições cromatográficas conforme previamente descrito.

As corridas analíticas foram constituídas por:

- ⇒ amostras de plasma padrão da curva de calibração de CC1 (40,0 µg/mL), CC2 (32,0 µg/mL), CC3 (24,0 µg/mL), CC4 (16,0 µg/mL), CC5 (8,0 µg/mL), CC6 (4,0 µg/mL), CC7 (1,0 µg/mL) e CC8 (0,4 µg/mL) – análise simples
- ⇒ amostras de plasma de controle de qualidade CQA (32 µg/mL), CQM (16 µg/mL) e CQB (1 µg/mL) – análise em sextuplicata para exatidão intra-dia e de seis determinações por dia em quatro dias para exatidão inter-dias.

V.7.8 Estabilidade

V.7.8.1 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

Procedimento

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 submetidas a um, dois e três ciclos de congelamento e descongelamento com os resultados de amostras analisadas imediatamente após o preparo. Admitiram-se desvios entre $\pm 15\%$ com coeficiente de variação não superior a 15%.

As amostras de plasma de controle de qualidade utilizadas neste estudo foram congeladas a -20°C e mantidas nesta temperatura durante 12-24 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 (ciclo zero) e após cada ciclo de congelamento/descongelamento (ciclo 1, ciclo 2 e ciclo 3).

As amostras de plasma de controle de qualidade foram submetidas ao processo de purificação e analisadas nas condições cromatográficas conforme previamente descrito.

As corridas analíticas foram constituídas por:

- ⇒ CC1 (40,0 µg/mL), CC2 (32,0 µg/mL), CC3 (24,0 µg/mL), CC4 (16,0 µg/mL), CC5 (8,0 µg/mL), CC6 (4,0 µg/mL), CC7 (1,0 µg/mL) e CC8 (0,4 µg/mL) – análise simples

- ⇒ amostras de plasma de controle de qualidade CQA (32 µg/mL), CQM (16 µg/mL) e CQB (1 µg/mL) – análise em triplicata das amostras dos ciclos zero, 1, 2 e 3

V.7.8.2 Estabilidade de curta duração

Procedimento

A estabilidade de curta duração foi determinada por meio da comparação dos resultados de análises de amostras de plasma de controle de qualidade descongeladas e mantidas à temperatura ambiente por 4 horas antes do início do procedimento de purificação (tempo 4 horas) com os resultados de amostras recém-preparadas e imediatamente submetidas ao procedimento de purificação (tempo 0 horas). Admitiram-se desvios entre $\pm 15\%$ com coeficiente de variação não superior a 15%.

As amostras de plasma de controle de qualidade foram submetidas ao processo de purificação e analisadas nas condições cromatográficas conforme previamente descrito.

As corridas analíticas foram constituídas por:

- ⇒ amostras de plasma padrão da curva de calibração de CC1 (40,0 µg/mL), CC2 (32,0 µg/mL), CC3 (24,0 µg/mL), CC4 (16,0 µg/mL), CC5 (8,0 µg/mL), CC6 (4,0 µg/mL), CC7 (1,0 µg/mL) e CC8 (0,4 µg/mL) – análise simples
- ⇒ amostras de plasma de controle de qualidade CQA (32 µg/mL), CQM (16 µg/mL) e CQB (1 µg/mL) – análise em triplicata das amostras dos tempos 0 horas e 4 horas

V.7.8.3 Estabilidade de longa duração

Procedimento

A estabilidade de longa duração foi determinada por meio da comparação dos resultados de análises de amostras de plasma de controle de qualidade mantidas à temperatura de armazenamento (-20°C) por intervalo de tempo superior ao compreendido entre a coleta da primeira amostra biológica de voluntário na etapa clínica do estudo e a análise da última na etapa analítica (tempo máximo de armazenamento), com os resultados de amostras analisadas imediatamente após o preparo (tempo 0 horas).

Para a avaliação deste parâmetro, foram preparadas e analisadas amostras de plasma de controle de qualidade no tempo 0h. Estas permaneceram armazenadas a -20°C durante 60 dias, quando foram analisadas (tempo 60 dias) e os resultados comparados com a análise efetuada no tempo 0 horas.

Admitiram-se desvios entre $\pm 15\%$ com coeficiente de variação não superior a 15%.

As amostras de plasma de controle de qualidade foram submetidas ao processo de purificação e analisadas nas condições cromatográficas conforme previamente descrito.

As corridas analíticas foram constituídas por:

- ⇒ amostras de plasma padrão da curva de calibração de CC1 (40,0 µg/mL), CC2 (32,0 µg/mL), CC3 (24,0 µg/mL), CC4 (16,0 µg/mL), CC5 (8,0 µg/mL), CC6 (4,0 µg/mL), CC7 (1,0 µg/mL) e CC8 (0,4 µg/mL) – análise simples
- ⇒ amostras de plasma de controle de qualidade CQA (32 µg/mL), CQM (16 µg/mL) e CQB (1 µg/mL) – análise em triplicata das amostras dos tempos 0 horas e máximo de armazenamento

V.7.8.4 Estabilidade pós-processamento

Procedimento

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

As amostras de plasma de controle de qualidade foram submetidas ao processo de purificação e analisadas nas condições cromatográficas conforme previamente descrito.

As corridas analíticas foram constituídas por:

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

⇒ amostras de plasma de controle de qualidade CQA (32 µg/mL), CQM (16 µg/mL) e CQB (1 µg/mL) – análise em triplicata das amostras dos tempos 0 horas e 48 horas

V.7.8.5 Estabilidade das soluções padrão

Procedimento

A estabilidade das soluções de trabalho padrão de cefadroxil (analito) e de lamivudina (padrão-interno) de 6 horas foi avaliada por meio da análise de padrões secos de cefadroxil (analito) e de lamivudina (padrão-interno) provenientes destas soluções recém-preparadas, comparadas com padrões secos de cefadroxil (analito) e de lamivudina (padrão-interno) armazenados à temperatura ambiente durante 6 horas. Admitiram-se desvios entre $\pm 15\%$ com coeficiente de variação não superior a 15%.

A estabilidade das soluções de trabalho de cefadroxil (analito) e de lamivudina (padrão-interno), armazenadas à temperatura de 4°C, foi avaliada por meio da análise de padrões secos de cefadroxil (analito) e de lamivudina (padrão-interno) provenientes destas soluções recém-preparadas, comparadas com as soluções preparadas no início da validação do método bioanalítico e no início da análise de amostras de plasma de voluntários). Admitiram-se desvios entre $\pm 15\%$ com coeficiente de variação não superior a 15%.