

## I Identificação do estudo

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

## II Etapa analítica

### II.1 Método bioanalítico

Analito(s)	<b><u>metronidazol</u></b>
Técnica bioanalítica	<b>CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência</b>
Detecção	<b>espectrometria de massas (MS-MS)</b>
Padrão interno	<b>zidovudina</b>
Matriz biológica	<b>plasma</b>
Anticoagulante	<b>heparina</b>
Purificação amostra	<b>extração com acetato de etila</b>

## II.2 Validação do método bioanalítico

Metodologia	<b>Resolução ANVISA RE 899/03, 29 de maio de 2003</b>
Analito(s)	<b>metronidazol</b>
Padrão interno (PI)	<b>zidovudina</b>
Especificidade	<b>plasma humano normal, plasma humano hemolisado, plasma humano lipêmico</b>
Linearidade	<b>0,01-8 µg/mL</b>
Limite quantificação inferior	<b>0,01 µg/mL</b>
Limite quantificação superior	<b>8 µg/mL</b>
Recuperação analito(s)	<b>82,09 %</b>
Recuperação PI	<b>82,00 %</b>
Precisão intra-dia	<b>1,84-7,20 %</b>
Precisão inter-dias	<b>6,04-10,65 %</b>
Exatidão intra-dia	<b>101,16-103,85 %</b>
Exatidão inter-dias	<b>97,85-99,94 %</b>
Estabilidade ciclos descongelamento	<b>3 ciclos</b>
Estabilidade condições análise	<b>48 horas</b>
Estabilidade curta duração	<b>n.i.</b>
Estabilidade longa duração	<b>46 dias a -20°C</b>

### **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 metronidazol em amostras de plasma para aplicação em ensaios de biodisponibilidade relativa e de bioequivalência entre medicamentos contendo metronidazol.

A quantificação de metronidazol 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 metronidazol em amostras de plasma para aplicação em ensaios de biodisponibilidade relativa e de bioequivalência entre medicamentos contendo metronidazol.

## V Procedimentos

### V.1 Padrões de referência

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

Foram empregados padrões de referência secundários de metronidazol e de zidovudina conforme descrito no **Quadro 1**.

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

Substância	Função	Lote	Validade	Teor	Fornecedor
metronidazol	analito	n.i.	n.i.	n.i.	FUNED
zidovudina	padrão interno	n.i.	n.i.	n.i.	FUNED

### 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 (metronidazol) e de padrão interno (zidovudina), fornecido por voluntário sadios (coleta de sangue e posterior centrifugação do mesmo para obtenção de plasma).

## V.3 Soluções

### V.3.1 Soluções de metronidazol (analito)

#### V.3.1.1 Solução estoque padrão de metronidazol (analito)

A solução estoque padrão de metronidazol foi preparada pesando-se exatamente 500 mg de padrão de referência de metronidazol 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 metronidazol obtida foi 5000 µg/mL. Esta solução foi acondicionada em frasco devidamente identificado com o código do projeto, a concentração e a data de preparo e armazenada em congelador à temperatura de -20°C.

#### V.3.1.2 Soluções de trabalho padrão de metronidazol (analito)

As soluções de trabalho padrão de metronidazol 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 de água-metanol (90:10, v/v) conforme descrito no **Quadro 2**.

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

Solução de trabalho padrão	Concentração da solução estoque padrão (µg/mL)	Volume de solução estoque padrão (mL)	Volume final (mL)	Concentração final (µg/mL)
PA1	5000	0,1	1000	0,5
PA2	5000	0,3	1000	1,5
PA3	5000	0,1	100	5,0
PA4	5000	0,2	100	10,0
PA5	5000	0,4	100	20,0
PA6	5000	0,8	100	40,0
PA7	5000	1,2	100	60,0
PA8	5000	1,6	100	80,0

Estas soluções foram acondicionadas em frascos devidamente identificados com o código do projeto, a concentração e a data de preparo e armazenadas em refrigerador à temperatura de 4°C.

### V.3.1.3 Solução estoque controle de qualidade de metronidazol (analito)

A solução estoque controle de qualidade de metronidazol foi preparada pesando-se exatamente 500 mg de padrão de referência de metronidazol 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 metronidazol obtida foi 500 µg/mL. Esta solução foi acondicionada em frasco devidamente identificado com o código do projeto, a concentração e a data de preparo e armazenada em congelador à temperatura de -20°C.

### V.3.1.4 Soluções de trabalho controle de qualidade de metronidazol (analito)

As soluções de trabalho controle de qualidade de metronidazol 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 metronidazol utilizadas no estudo “Validação de método bioanalítico para quantificação de metronidazol em amostras de plasma para aplicação em ensaios de biodisponibilidade relativa ou bioequivalência de medicamentos contendo metronidazol”

Solução de trabalho controle de qualidade	Concentração da solução estoque controle de qualidade ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volume de solução estoque controle de qualidade (mL)	Volume final (mL)	Concentração final ( $\mu\text{g/mL}$ )
QA	5000	0,2	100,0	10
QM	5000	10,0	100,0	500
QB	5000	10,0	100,0	500
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 refrigerador à temperatura de 4°C.

### **V.3.2 Soluções de zidovudina (padrão interno)**

#### **V.3.2.1 Solução estoque de zidovudina (padrão interno)**

A solução estoque de zidovudina foi preparada pesando-se exatamente 10 mg de padrão de referência de zidovudina em balança analítica e transferindo-se quantitativamente a massa pesada para balão volumétrico de 100 mL. Completou-se o volume do balão volumétrico com mistura água-metanol (90:10 v/v), homogeneizando-se para garantir completa dissolução. A concentração final da solução estoque de zidovudina 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 em refrigerador à temperatura de 4°C.

#### **V.3.2.2 Solução de trabalho de zidovudina (padrão interno)**

A solução de trabalho de zidovudina foi a própria solução estoque.

## 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 metronidazol.

Adicionaram-se 25 µL das soluções de trabalho padrão de metronidazol a tubos de ensaio e evaporou-se o solvente a 40°C em corrente de nitrogênio. Em seguida, adicionaram-se 50 µL de solução de trabalho de zidovudina (padrão interno) e 250 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 metronidazol em amostras de plasma para aplicação em ensaios de biodisponibilidade relativa ou bioequivalência de medicamentos contendo metronidazol"

"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	0,5	25	250	0,05
CC2	PA2	1,5	25	250	0,15
CC3	PA3	5,0	25	250	0,5
CC4	PA4	10,0	25	250	1,0
CC5	PA5	20,0	25	250	2,0
CC6	PA6	40,0	25	250	4,0
CC7	PA7	60,0	25	250	6,0
CC8	PA8	80,0	25	250	8,0

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 e CQB foram preparadas na sua totalidade na mesma data, a partir de soluções de trabalho controle de qualidade de metronidazol.

Transferiram-se volumes adequados de soluções de trabalho controle de qualidade de metronidazol para balões volumétricos de 25 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 metronidazol em amostras de plasma para aplicação em ensaios de biodisponibilidade relativa ou bioequivalência de medicamentos contendo metronidazol"

Amostra de plasma de controle de qualidade	Solução de trabalho controle de qualidade	Concentração da solução de trabalho de controle de qualidade ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volume de solução de trabalho controle de qualidade ( $\mu\text{L}$ )	Volume de plasma branco (mL)	Concentração final ( $\mu\text{g/mL}$ )
CQA	QA	10	375	25	0,15
CQM	QM	500	175	25	3,5
CQB	QB	500	350	25	7,0
CQLIQ	QLIQ	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Após o preparo, estas amostras foram aliqüotadas em frascos devidamente identificados com o código do projeto, a concentração e a data de preparo, e armazenadas em congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 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 extração líquido-líquido com acetato de etila.]

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

Volume de plasma	<b>250 µL</b>
Volume de solução de trabalho de zidovudina (padrão interno)	-
Solvente de extração	<b>acetato de etila</b>
Volume de solvente de extração	<b>3,0 mL</b>
Tempo de homogeneização	<b>60 s</b>
Velocidade de homogeneização	<b>n.i.</b>
Tempo de centrifugação	<b>10 min</b>
Velocidade de centrifugação	<b>3500 rpm</b>
Volume de fase móvel para reconstituição dos extratos	<b>300 µL</b>

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

Volume de plasma	<b>250 <math>\mu</math>L</b>
Volume de solução de trabalho de zidovudina (padrão interno)	<b>50 <math>\mu</math>L</b>
Solvente de extração	<b>acetato de etila</b>
Volume de solvente de extração	<b>3,0 mL</b>
Tempo de homogeneização	<b>60 s</b>
Velocidade de homogeneização	<b>n.i.</b>
Tempo de centrifugação	<b>10 min</b>
Velocidade de centrifugação	<b>3500 rpm</b>
Volume de fase móvel para reconstituição dos extratos	<b>300 <math>\mu</math>L</b>

## V.6 Condições cromatográficas

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

Sistema cromatográfico	<p><b>Sistema composto por:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>bomba LC-10ADVP, Shimadzu Scientific Instruments;</b></li> <li>• <b>amostrador automático SIL-10ADVP com loop de 50 µL, Shimadzu Scientific Instruments;</b></li> <li>• <b>módulo de controle SCL-10AVP, Shimadzu Scientific Instruments;</b></li> <li>• <b>detector MS-MS triplo quadrupolo Micromass Quattro, Waters.</b></li> </ul>
Coluna cromatográfica	<b>Varian C<sub>18</sub> Microsorb, 150 mm x 4,6 mm, partículas de 5 µm</b>
Pré-coluna cromatográfica	<b>Phenomenex AJO-4287 C<sub>18</sub>, 5 mm x 4,6 mm, partículas de 5 µm</b>
Temperatura da coluna	<b>ambiente</b>
Fase móvel	<b>acetonitrila-acetato de amônia 10 mM (80:20, v/v), adicionada de ácido fórmico 0,1 %</b>
Fluxo da fase móvel	<b>1,0 mL/min</b>
Detecção	<b>transições m/z 171,97&gt;127,97 (metronidazol) e 268,08&gt;126,96 (zidovudina)</b>
Volume de injeção	<b>50 µL</b>

## 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 metronidazol (analito) – análise simples
- ⇒ padrão seco de zidovudina (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 metronidazol (analito) e zidovudina (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 metronidazol (analito) e de zidovudina (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 metronidazol (analito) e zidovudina (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 à 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 (7 µg/mL), CQM (3,5 µg/mL) e CQB (0,15 µg/mL) – análise em sextuplicata
- ⇒ amostras de metronidazol (analito) e zidovudina (padrão interno) em água:metanol (90:10, v/v), nas mesmas concentrações das amostras de plasma de controle de qualidade (7 µg/mL, 3,5 µg/mL e 0,15 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 o inverso da concentração, considerada variável independente ( $1/x$ ), e a relação entre as áreas do pico de metronidazol (analito) e de zidovudina (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 (0,05 µg/mL), CC2 (0,15 µg/mL), CC3 (0,5 µg/mL), CC4 (1 µg/mL), CC5 (2 µg/mL), CC6 (4 µg/mL), CC7 (6 µg/mL) e CC8 (8 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 CC1 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 (0,05 µg/mL), CC2 (0,15 µg/mL), CC3 (0,5 µg/mL), CC4 (1 µg/mL), CC5 (2 µg/mL), CC6 (4 µg/mL), CC7 (6 µg/mL) e CC8 (8 µg/mL) – análise simples
- ⇒ amostras de plasma padrão CC1 diluídas com plasma branco (125 µL de plasma padrão CC1 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 ± 20 % do valor nominal da concentração, com coeficiente de variação de, no máximo, 20 %.

As amostras de plasma padrão CC1 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 (0,05 µg/mL), CC2 (0,15 µg/mL), CC3 (0,5 µg/mL), CC4 (1 µg/mL), CC5 (2 µg/mL), CC6 (4 µg/mL), CC7 (6 µg/mL) e CC8 (8 µg/mL) – análise simples
- ⇒ amostras de plasma padrão CC1 – 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 (0,05 µg/mL), CC2 (0,15 µg/mL), CC3 (0,5 µg/mL), CC4 (1 µg/mL), CC5 (2 µg/mL), CC6 (4 µg/mL), CC7 (6 µg/mL) e CC8 (8 µg/mL) – análise simples
- ⇒ amostras de plasma de controle de qualidade CQA (7 µg/mL), CQM (3,5 µg/mL) e CQB (0,15 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 (0,05 µg/mL), CC2 (0,15 µg/mL), CC3 (0,5 µg/mL), CC4 (1 µg/mL), CC5 (2 µg/mL), CC6 (4 µg/mL), CC7 (6 µg/mL) e CC8 (8 µg/mL) – análise simples
- ⇒ amostras de plasma de controle de qualidade CQA (7 µg/mL), CQM (3,5 µg/mL) e CQB (0,15 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  $-20^{\circ}\text{C}$  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 (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:

- ⇒ amostras de plasma padrão da curva de calibração de CC1 (0,05 µg/mL), CC2 (0,15 µg/mL), CC3 (0,5 µg/mL), CC4 (1 µg/mL),

CC5 (2 µg/mL), CC6 (4 µg/mL), CC7 (6 µg/mL) e CC8 (8 µg/mL)  
– análise simples

⇒ amostras de plasma de controle de qualidade CQA (7 µg/mL),  
CQM (3,5 µg/mL) e CQB (0,15 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 (0,05 µg/mL), CC2 (0,15 µg/mL), CC3 (0,5 µg/mL), CC4 (1 µg/mL), CC5 (2 µg/mL), CC6 (4 µg/mL), CC7 (6 µg/mL) e CC8 (8 µg/mL)  
– análise simples

⇒ amostras de plasma de controle de qualidade CQA (7 µg/mL),  
CQM (3,5 µg/mL) e CQB (0,15 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 46 dias, quando foram analisadas (tempo 46 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 (0,05 µg/mL), CC2 (0,15 µg/mL), CC3 (0,5 µg/mL), CC4 (1 µg/mL), CC5 (2 µg/mL), CC6 (4 µg/mL), CC7 (6 µg/mL) e CC8 (8 µg/mL) – análise simples
- ⇒ amostras de plasma de controle de qualidade CQA (7 µg/mL), CQM (3,5 µg/mL) e CQB (0,15 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 24 horas ou 48 horas antes do início da análise cromatográfica (tempos 24 horas e 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 (0,05 µg/mL), CC2 (0,15 µg/mL), CC3 (0,5 µg/mL), CC4 (1 µg/mL), CC5 (2 µg/mL), CC6 (4 µg/mL), CC7 (6 µg/mL) e CC8 (8 µg/mL) – análise simples
- ⇒ amostras de plasma de controle de qualidade CQA (7 µg/mL), CQM (3,5 µg/mL) e CQB (0,15 µg/mL) – análise em triplicata das amostras dos tempos 0 horas, 24 horas e 48 horas

#### **V.7.8.5 Estabilidade das soluções padrão**

##### **Procedimento**

A estabilidade das soluções de trabalho padrão de metronidazol (analito) e de zidovudina (padrão-interno) de 6 horas foi avaliada por meio da análise de padrões secos de metronidazol (analito) e de zidovudina (padrão-interno) provenientes destas soluções recém-preparadas, comparadas com padrões secos de metronidazol (analito) e de zidovudina (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 metronidazol (analito) e de zidovudina (padrão-interno), armazenadas à temperatura de 4°C, foi avaliada por meio da análise de padrões secos de metronidazol (analito) e de zidovudina (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%.