

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

MÁRCIO CARDOSO PINTO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
ANÁLITICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DO URSODIOL E SEUS
PRINCIPAIS METABÓLITOS EM PLASMA HUMANO ATRAVÉS
DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
ACOPLADA À ESPECTRÔMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL**

Bragança Paulista
2019

MÁRCIO CARDOSO PINTO – R.A. 001201403280

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
ANÁLITICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE URSODIOL E SEUS
PRINCIPAIS METABÓLITOS EM PLASMA HUMANO ATRAVÉS
DE CROMATOGRRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
ACOPLADA À ESPECTRÔMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Farmacologia Geral e Clínica.

Orientador: Profa Dra. Silvana A. Calafatti Carandina.

Bragança Paulista
2019

QV 38
P729d

Pinto, Márcio Cardoso
Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para
quantificação do ursodiol e seus principais metabólitos em
plasma humano através de cromatografia líquida de alta
eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial /
Márcio Cardoso Pinto. – Bragança Paulista, 2019.
177 p.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São
Francisco.

Orientação de: Silvana Aparecida Calafatti Carandina.

1. Ursodiol. 2. Ácido Glicoursodesoxicólico.
3. Ácido Tauroursodesoxicólico. 4. Validação analítica.
I. Carandina, Silvana Aparecida Calafatti. II. Título.

PINTO, Márcio Cardoso *"Desenvolvimento e Validação de Métodos Analíticos para Quantificação do Ursodiol e Seus Principais Metabólitos em Plasma Humano Através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrômetria de Massas Sequencial"*. Tese defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 27 de junho de 2019 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



Patrícia de Oliveira Carvalho
Universidade São Francisco



Silvana Aparecida Calafatti Carandina
(Orientadora e Membro externo)



Andréia de Melo Porcari
Universidade São Francisco



Mário Angelo Claudino
Universidade São Francisco



André Augusto Gutierrez Fernandes Beati
Universidade São Francisco

“Dedico a todos que fazem parte da minha vida”.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus pela vida, por me dar forças para superar desafios com dignidade e crescer como ser humano.

A minha irmã, Tânia Regina Cardoso Pinto, e ao meu cunhado Wagner e família, por estarem presentes em momentos especiais em minha vida.

Ao meu pai, Pedro Cardoso Pinto, por todo apoio.

A Profa. Dra. Silvana Aparecida Calafatti Carandina, pela oportunidade de trabalhar sob sua orientação e, sobretudo, pelo constante apoio e confiança demonstrado durante o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Aos amigos, Alexandre Cavenatti e Danilo, por toda ajuda e cooperação, sem vocês seria difícil conseguir atingir esse objetivo.

A todos da UNIFAG, sempre preparados e dispostos a colaborar de alguma forma.

Aos meus amigos, àqueles que torcem e me acompanham, seja em momentos difíceis ou de alegrias.

Aos meus queridos companheiros de trabalho, que lutam e se dedicam, sempre com o mesmo objetivo, vencer.

Agradeço de coração a todos os professores, alunos, amigos e colegas que sempre me apoiaram e contribuíram de alguma forma no meu crescimento tanto profissional como pessoa.

“O discípulo não é mais que o mestre, o servidor não é mais que o patrão. Basta ao discípulo ser tratado como seu mestre, e ao servidor como seu patrão”.

Mateus 10:24-25

RESUMO

O Ursodiol, ou Ácido ursodesoxicólico (3 α , 7 β -di-hidroxi-5 β -colano-24-óico) é um ácido biliar que ocorre naturalmente em pequenas quantidades no plasma humano e regula o colesterol reduzindo os níveis em que o intestino absorve estas moléculas. No fígado é conjugado com glicina ou taurina e depois secretado nos ductos biliares hepáticos, estes conjugados são absorvidos no intestino delgado e desconjugados no íleo levando à formação de ursodiol livre. O ácido ursodesoxicólico (UDCA) e seus metabólitos ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA) e ácido glicoursodesoxicólico (GUDCA), tem sido alvo de diversas pesquisas na área farmacológica. Por esta razão o objetivo deste trabalho foi desenvolver métodos de quantificação para os compostos Ácido Ursodesoxicólico, Ácido Glicoursodesoxicólico e Ácido Tauroursodesoxicólico em plasma humano adequados e de baixo custo, para aplicação em estudos de bioequivalência. Além disso, a determinação destes metabólitos no plasma humano pode ser útil na compreensão do metabolismo do composto original. A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) é a técnica de escolha para análise de fármacos e metabólitos em matrizes biológicas na área farmacêutica. A metodologia de extração foi baseada em extração líquido-líquido para o ácido ursodesoxicólico e para o ácido glicoursodesoxicólico, utilizando como solvente extrator em ambas extrações éter dietílico / diclorometano (70:30 v/v). Para o ácido tauroursodesoxicólico a extração foi baseada em extração por precipitação de proteínas (desproteínização). Em todos os procedimentos de extração foram utilizados padrões internos deuterados. Os métodos foram validados seguindo normas da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 27 de 2012, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos e que é harmonizado com os principais guias internacionais como pré-requisito para a realização de um estudo *in-vivo* em voluntários humanos. A faixa linear foi de 15-10000 ng mL⁻¹ para UDCA e GUDCA, e 5-500 ng mL⁻¹ para TUDCA. Os métodos analíticos foram desenvolvidos e validados com sucesso, uma vez que não apresentaram efeito de matriz e efeito residual, demonstrando serem seletivos para as moléculas em estudo, com adequada exatidão e precisão. Além disso os métodos se apresentaram sensíveis obtendo coeficiente de variação menor que 20% para o limite inferior de quantificação de cada composto. Desta forma, os métodos podem ser aplicados em estudos de bioequivalência para determinação do Ursodiol e seus metabólitos de maneira reprodutível, simples e eficaz.

Palavras-Chave: Ursodiol. Ácido Glicoursodesoxicólico. Ácido Tauroursodesoxicólico. Validação Analítica. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial (LC-MS/MS).

ABSTRACT

The Ursodiol, or Ursodeoxycholic acid (3 α , 7 β -dihydroxy-5 β -cholane-24-oic), is a bile acid naturally occurring in small amounts at human plasma and regulates cholesterol by reducing the rate at which the intestine absorbs cholesterol molecules. In the liver, it is conjugated with glycine or taurine and then secreted into the hepatic bile ducts. These conjugates are absorbed in the small intestine, and then disrupted in the ileum leading to the formation of free Ursodiol. Ursodeoxycholic acid (UDCA) and its metabolites tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) and glyoursodeoxycholic acid (GUDCA) have been the subject of several pharmacological studies. The objective of this study was to develop innovative methods for the quantification of Ursodeoxycholic acid, tauroursodeoxycholic acid and glyoursodeoxycholic acid in human plasma with a lower cost and suitable for application in bioequivalence studies. In addition, the measurement of these metabolites in human plasma may be useful in understanding the metabolism of the original compound. High Performance Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) is the technique of choice for the analysis of drugs and metabolites in biological matrices in the pharmaceutical area. The extraction protocol of the samples was based on liquid-liquid extraction for ursodeoxycholic acid and glyoursodeoxycholic acid, using diethyl ether / dichloromethane (70:30 v/v) as extraction solvent in both extractions. For tauroursodeoxycholic acid, the extraction was based on protein precipitation (deproteinization). In all the extraction procedures, internal deuterated standards were used. The methods were validated according to the normative RDC 27 of 2012, of the Brazilian National Agency of Sanitary Surveillance (ANVISA), that establishes the minimum requirements for the validation of bioanalytical methods and which is harmonized with the main international guides as a prerequisite for conducting in-vivo studies in human volunteers. The linear range was 15-10000 ng mL⁻¹ for UDCA and GUDCA, and 5-500 ng mL⁻¹ for TUDCA. The analytical methods were successfully developed and validated, since they did not present relevant matrix effect or residual effect, both proving to be selective for the studied molecules with adequate accuracy and precision. In addition, the methods were found to be sensitive and reached relative standard deviation inferior than 20% for the lowest limit of quantification for each compound. In this way, the method can be applied for bioequivalence studies to determine Ursodiol and its metabolites in reproducible, simple and effective procedures.

Key Words: Ursodiol. Glyoursodeoxycholic Acid. Tauroursodeoxycholic Acid. Analytical Validation. High Performance Liquid Chromatography tandem Sequential Mass Spectrometry (HPLC-MS / MS).

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CQ - Controle de Qualidade
CQA - Controle de Qualidade Alto
CQB - Controle de Qualidade Baixo
CQD - Controle de Qualidade Diluído
CQM - Controle de Qualidade Médio
CV% - Coeficiente de Variação Relativo
DP - Desvio Padrão
DPR - Desvio Padrão Relativo
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EFS - Extração em Fase Sólida
ESI - Ionização por Electrospray
GUDCA - Ácido Glicoursodesoxicólico
HPLC - High Performance Liquid Cromatography
LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial
HUSF - Hospital Universitário São Francisco
M/z - razão massa/carga
MeCN - Acetonitrila
MeOH - Metanol
MRM - Monitoramento de Reações Múltiplas
MS – Espectrometria de massas, do inglês *Mass spectrometry*
MS/MS – Espectrometria de massas sequencial
NBR - Norma Brasileira
PI - Padrão Interno
R - Coeficiente de Correlação
RDC - Resolução da Diretoria Colegiada
RE - Resolução (Legislação)
T_{max} - Tempo Máximo
T_r - Tempo de Retenção
TUDCA - Ácido Tauroursodesoxicólico
UDCA - Ácido Ursodesoxicólico
UNIFAG - Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia
USP - United States Pharmacopeia

LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS

FIGURA 1. Principais ácidos biliares.....	22
FIGURA 2. Ácido Ursodesoxicólico.	25
FIGURA 3. Ácido Tauroursodesoxicólico.....	28
FIGURA 4. Ácido Glicoursodesoxicólico.....	29
FIGURA 5. Esquematização básica de um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência.....	33
FIGURA 6. Esquema de básico de um espectrômetro de massas	34
FIGURA 7. Os íons formados no processo Electrospray são conduzidos para o cone de amostragem pelo campo elétrico aplicado	36
FIGURA 8. Modelo de triplo quadrupolo. (A) triplo quadruplo, fonte: Waters; (B) esquema de seleção do íon precursor e sua fragmentação.	37
FIGURA 9. Estrutura química do UDCA (A) e seus principais metabólitos, TUDCA (B) e GUDCA (C).	69
FIGURA 10. Espectro MS/MS Ácido Ursodesoxicólico: Ion precursor m/z 391.3 Da e ion produto, utilizado para formação do canal de monitoramento, m/z 373.5 Da.....	71
FIGURA 11. Espectro MS/MS Ácido Ursodesoxicólico D4: Ion precursor m/z 395.3 Da e ion produto, utilizado para formação do canal de monitoramento, m/z 377.1 Da.....	72
FIGURA 12. Espectro MS/MS Ácido Glicoursodesoxicólico: Ion precursor m/z 448.5 Da e ion produto, utilizado para formação do canal de monitoramento, m/z 73.7 Da.....	73
FIGURA 13. Espectro MS/MS Ácido Glicoursodesoxicólico D4: Ion precursor m/z 451.9 Da e ion produto, utilizado para formação do canal de monitoramento, m/z 73.7 Da.....	74
FIGURA 14. Espectro MS/MS Ácido Tauroursodesoxicólico: Ion precursor m/z 498.0 Da e ion produto, utilizado para formação do canal de monitoramento, m/z 79.6 Da.....	75
FIGURA 15. Espectro MS/MS Ácido Tauroursodesoxicólico D4: Ion precursor m/z 502.4 Da e ion produto, utilizado para formação do canal de monitoramento, m/z 79.5 Da.....	76
FIGURA 16. Plasma branco normal lote PLS 76/2017 referente ao analito e PI.....	83
FIGURA 17. Plasma branco normal lote PLS 111/2017 referente ao analito e PI.....	84
FIGURA 18. Plasma branco normal lote PLS 54/2017 referente ao analito e PI.....	84
FIGURA 19. Plasma branco normal lote PLS 148/2017 referente ao analito e PI.....	84
FIGURA 20. Plasma branco lipêmico lote PLS 464/2016 referente ao analito e PI.....	85
FIGURA 21. Plasma branco hemolisado lote PLS 36/2017 referente ao analito e PI.....	85
FIGURA 22. Plasma branco normal lote PLS 76/2017 referente ao analito e PI.....	85
FIGURA 23. Plasma branco normal lote PLS 65/2017 referente ao analito e PI.....	86

FIGURA 24. Plasma branco normal lote PLS 453/2016 referente ao analito e PI.	87
FIGURA 25. Plasma branco normal lote PLS 147/2017 referente ao analito e PI.	87
FIGURA 26. Plasma branco normal lote PLS 388/2016 referente ao analito e PI.	87
FIGURA 27. Plasma branco lipêmico lote PLS 464/2016 referente ao analito e PI.	88
FIGURA 28. Plasma branco hemolisado lote PLS 36/2017 referente ao analito e PI.	88
FIGURA 29. Plasma branco normal lote PLS 65/2017 referente ao analito e PI.	88
FIGURA 30. Plasma branco normal lote PLS 388/2016 referente ao analito e PI.	89
FIGURA 31. Plasma branco normal lote PLS 50/2017 referente ao analito e PI.	90
FIGURA 32. Plasma branco normal lote PLS 127/2017 referente ao analito e PI.	90
FIGURA 33. Plasma branco normal lote PLS 39/2017 referente ao analito e PI.	90
FIGURA 34. Plasma branco lipêmico lote PLS 34/2017 referente ao analito e PI.	91
FIGURA 35. Plasma branco hemolisado lote PLS 139/2017 referente ao analito e PI.	91
FIGURA 36. Plasma branco normal lote PLS 388/2016 referente ao analito e PI.	92
FIGURA 37. Representação gráfica das linearidades UDCA.	97
FIGURA 38. Representação gráfica das linearidades do GUDCA.	98
FIGURA 39. Representação gráfica das linearidades do TUDCA.	99
FIGURA 40. Resultados obtidos das análises intra-lote dos controles de qualidade e do LQ para matriz (plasma) normal de UDCA.	101
FIGURA 41. Resultados obtidos das análises intra-lote dos controles de qualidade e do LIQ para matriz (plasma) normal de UDCA.	102
FIGURA 42. Resultados obtidos das análises intra-lote dos controles de qualidade e do LIQ para matriz (plasma) normal do UDCA.	103
FIGURA 43. Resultados obtidos das análises intra-lote dos controles de qualidade e do LIQ para matriz (plasma) normal de GUDCA.	104
FIGURA 44. Resultados obtidos das análises intra-lote dos controles de qualidade e do LIQ para matriz (plasma) normal de GUDCA.	105
FIGURA 45. Resultados obtidos das análises intra-lote dos controles de qualidade e do LIQ para matriz (plasma) normal de GUDCA.	106
FIGURA 46. Resultados obtidos das análises intra-lote dos controles de qualidade e do LQ para matriz (plasma) normal de TUDCA.	107
FIGURA 47. Resultados obtidos das análises intracorrída dos controles de qualidade e do LIQ para matriz (plasma) normal de TUDCA.	108
FIGURA 48. Resultados obtidos das análises intra-lote dos controles de qualidade e do LQ para matriz (plasma) normal de TUDCA.	109

FIGURA 49. Resultados obtidos das análises interlote dos controles de qualidade e do LIQ para matriz (plasma) normal de UDCA.	111
FIGURA 50. Resultados obtidos das análises interlote dos controles de qualidade e do LIQ para matriz (plasma) normal de GUDCA.....	113
FIGURA 51. Resultados obtidos das análises interlote dos controles de qualidade e do LQ para matriz (plasma) normal de TUDCA.	114

LISTA DE QUADROS E TABELAS

TABELA 1. Descrição de equipamentos e materiais.	50
TABELA 2. Componentes do CL-MS/MS.	50
TABELA 3. Padrões utilizados no desenvolvimento e validação da metodologia analítica.	51
TABELA 4. Reagentes e solventes utilizados para o UDCA, GUDCA E TUDCA.	52
TABELA 5. Padrões da curva de calibração do UDCA, GUDCA E TUDCA.	56
TABELA 6. Amostras de controle de qualidade do UDCA, GUDCA E TUDCA.	57
TABELA 7. Condições de detecção UDCA.	58
TABELA 8. Condições de detecção TUDCA.	59
TABELA 9. Condições de detecção GUDCA.	60
TABELA 10. Dados referentes as curvas de calibração de cada analito.	62
TABELA 11. Definição dos controles de qualidade (CQ) de UDCA e GUDCA	63
TABELA 13. Datas de preparo das amostras de cada análise da validação do UDCA.	80
TABELA 14. Datas de preparo das amostras de cada análise da validação do GUDCA.	81
TABELA 15. Datas de preparo das amostras de cada análise da validação do TUDCA.	82
TABELA 16. Amostras branco de plasma do UDCA.	83
TABELA 17. Amostras branco de plasma do GUDCA.	86
TABELA 18. Amostras branco de plasma do TUDCA.	89
TABELA 19. Efeito residual (carryover) do UDCA.	92
TABELA 20. Efeito residual (carryover) do GUDCA.	93
TABELA 21. Efeito residual (carryover) do TUDCA.	93
TABELA 22. Efeito de matriz do UDCA.	94
TABELA 23. Efeito de matriz do GUDCA.	95
TABELA 24. Efeito de matriz do TUDCA.	96
TABELA 25. Dados das curvas de calibração de UDCA.	97
TABELA 26. Dados das curvas de calibração de GUDCA.	98
TABELA 27. Dados das curvas de calibração de TUDCA.	99
TABELA 28. Análise intracorrída dos controles de qualidade CQB, CQM e CQA de UDCA.	100
TABELA 29. Análise intracorrída do controle de qualidade CQD (diluído com plasma branco, usando uma diluição de 1:3) para UDCA.	101
TABELA 30. Análise intracorrída do controle de qualidade liq de UDCA.	102
TABELA 31. Análise intracorrída dos controles de qualidade CQB, CQM e CQA de GUDCA.	104
TABELA 32. Análise intracorrída do controle de qualidade CQD (diluído com plasma branco, usando uma diluição de 1:3) para GUDCA.	105
TABELA 33. Análise intracorrída do controle de qualidade liq de GUDCA.	106

TABELA 34. Análise intracorrída dos controles de qualidade CQB, cqm e cqa de TUDCA....	107
TABELA 35. Análise intracorrída do controle de qualidade CQD (diluído com plasma branco, usando uma diluição de 1:3) para TUDCA.....	108
TABELA 36. Análise intracorrída do controle de qualidade liq de TUDCA.....	109
TABELA 37. Análise intercorrídas dos controles de qualidade CQB, CQM e CQA de UDCA.	110
TABELA 38. Análise intercorrídas do controle de qualidade CQD (diluído com plasma branco, usando uma diluição de 1:3) de UDCA.	110
TABELA 39. Análise intercorrídas do controle de qualidade liq de UDCA.	111
TABELA 40. Análise intercorrídas dos controles de qualidade CQB, cqm e cqa de GUDCA..	112
TABELA 41. Análise intercorrídas do controle de qualidade CQD (diluído com plasma branco, usando uma diluição de 1:3) de GUDCA.	112
TABELA 42. Análise intercorrídas do controle de qualidade liq de GUDCA.	112
TABELA 43. Análise intercorrídas dos controles de qualidade CQB, CQM e CQA de TUDCA.	113
TABELA 44. Análise intercorrídas do controle de qualidade CQD (diluído com plasma branco, usando uma diluição de 1:3) de TUDCA.....	114
TABELA 45. Análise intercorrídas do controle de qualidade de TUDCA.....	114
TABELA 46. Análise intracorrída dos controles de qualidade CQB, CQM e CQA de UDCA...	115
TABELA 47. Análise intracorrída dos controles de qualidade CQB, CQM e CQA de GUDCA.	116
TABELA 48. Análise intracorrída dos controles de qualidade CQB, CQM e CQA de TUDCA.	117
TABELA 49. Variação das médias dos controles de qualidade para UDCA na reinjeção em relação às médias obtidas para as amostras da primeira injeção.	117
TABELA 50. Variação das médias dos controles de qualidade para GUDCA na reinjeção em relação às médias obtidas para as amostras da primeira injeção.	118
TABELA 51. Variação das médias dos controles de qualidade para TUDCA na reinjeção em relação às médias obtidas para as amostras da primeira injeção.	118
TABELA 52. Padrões de referência utilizados na validação UDCA.....	119
TABELA 53. Padrões de referência utilizados na validação GUDCA.	120
TABELA 54. Padrões de referência utilizados na validação TUDCA.....	121
TABELA 55. Seletividade do analito e do padrão interno na presença de fármacos de uso concomitante para UDCA.	122
TABELA 56. Seletividade do analito e do padrão interno na presença de fármacos de uso concomitante para GUDCA.....	122
TABELA 57. Seletividade do analito e do padrão interno na presença de fármacos de uso concomitante para TUDCA.	123
TABELA 58. Efeito de matriz para UDCA na presença de fármacos de uso concomitante. ...	124
TABELA 59. Efeito de matriz para GUDCA na presença de fármacos de uso concomitante..	125
TABELA 60. Efeito de matriz para TUDCA na presença de fármacos de uso concomitante. .	126

TABELA 61. Exatidão e precisão na presença de fármacos de uso concomitante para UDCA.	127
TABELA 62. Exatidão e precisão na presença de fármacos de uso concomitante para GUDCA.	127
TABELA 63. Exatidão e precisão na presença de fármacos de uso concomitante para TUDCA.	128
TABELA 64. Datas de preparo das amostras de cada análise do estudo de estabilidade UDCA Ee UDCA D4.....	129
TABELA 65. Datas de preparo das amostras de cada análise do estudo de estabilidade GUDCA e GUDCA D4.	129
TABELA 66. Datas de preparo das amostras de cada análise do estudo de estabilidade TUDCA e TUDCA D4.....	130
TABELA 67. Estabilidade pós-processamento (autoinjeter) de UDCA.	131
TABELA 68. Estabilidade pós-processamento (autoinjeter) de GUDCA.....	132
TABELA 69. Estabilidade pós-processamento (autoinjeter) de TUDCA.	133
TABELA 70. Amostras recém-preparadas utilizadas no estudo de estabilidade de UDCA.....	134
TABELA 71. Amostras recém-preparadas utilizadas no estudo de estabilidade de GUDCA. .	135
TABELA 72. Amostras recém-preparadas utilizadas no estudo de estabilidade de TUDCA. .	136
TABELA 73. Estabilidade de UDCA submetido a três ciclos de congelamento e degelo.....	137
TABELA 74. Estabilidade de GUDCA submetido a três ciclos de congelamento e degelo.	137
TABELA 75. Estabilidade de TUDCA submetido a três ciclos de congelamento e degelo.	138
TABELA 76. Estabilidade de curta duração de UDCA.....	139
TABELA 77. Estabilidade de curta duração de GUDCA.....	140
TABELA 78. Estabilidade de curta duração de TUDCA.	141
TABELA 79. Estabilidade das soluções padrão de UDCA.	142
TABELA 80. Estabilidade das soluções padrão de UDCA D4.	142
TABELA 81. Estabilidade das soluções padrão de GUDCA.....	143
TABELA 82. Estabilidade das soluções padrão de GUDCA D4.	143
TABELA 83: Estabilidade das soluções padrão de TUDCA.	144
TABELA 84. Estabilidade das soluções padrão de TUDCA D4.....	145
TABELA 85. Estabilidade de longa duração de UDCA.....	146
TABELA 86. Estabilidade de longa duração de GUDCA.	147
TABELA 87. Estabilidade de longa duração de TUDCA.....	148

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. ÁCIDOS BILIARES	21
1.2. ÁCIDO URSODESOXICÓLICO	24
1.2.1. ÁCIDO TAUROURSODESOXICÓLICO	27
1.2.2. ÁCIDO GLICOURSODESOXICÓLICO	29
1.3. BIOEQUIVALÊNCIA	31
1.4. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	32
1.5. ESPECTROMETRIA DE MASSAS	33
1.5.1. MÉTODOS DE IONIZAÇÃO	34
1.5.2. IONIZAÇÃO POR ESI	35
1.5.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL	36
1.6. APLICAÇÕES DOS MÉTODOS LC-MS/MS EM ESTUDOS DOS ÁCIDOS BILIARES ..	37
1.7. PREPARO DA AMOSTRA	40
1.8. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS	42
1.8.1. PADRÃO INTERNO	42
1.8.2. LIMITE INFERIOR DE QUANTIFICAÇÃO (LIQ) E LIMITE DE DETECÇÃO (LD)	43
1.8.3. AMOSTRAS DE CONTROLE DE QUALIDADE	43
1.9. VALIDAÇÃO PRÉ-ESTUDO	44
2. OBJETIVOS	49
2.1. OBJETIVO GERAL	49
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
3. MATERIAIS E MÉTODOS	50
3.1. MATERIAIS	50
3.2. MÉTODOS	53
3.2.1. PREPARO DA FASE MÓVEL DO UDCA, GUDCA E TUDCA	53
3.2.2. PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO	53
3.2.4. PREPARO DOS PADRÕES DA CURVA DE CALIBRAÇÃO E DAS AMOSTRAS CONTROLE DE QUALIDADE	55
3.2.5. PREPARO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO URSODESOXICÓLICO, ÁCIDO GLICOURSODESOXICÓLICO E ÁCIDO TAUROURSODESOXICÓLICO	55
3.2.6. PREPARO DOS CONTROLES DE QUALIDADE DO UDCA, GUDCA E TUDCA	56
3.2.7. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICA E DE DETECÇÃO NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS SEQUENCIAL	57

3.2.8. VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS BIOANALÍTICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADO À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL	60
3.2.8.1. VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DO UDCA, GUDCA E TUDCA	60
3.2.8.2. VALIDAÇÃO PRÉ-ESTUDO	60
3.2.8.2.1. SELETIVIDADE	60
3.2.8.2.2. EFEITO RESIDUAL (CARRYOVER)	61
3.2.8.2.3. EFEITO DE MATRIZ	61
3.2.8.2.4. CURVA DE CALIBRAÇÃO	61
3.2.8.2.4.1. DETERMINAÇÃO DO LIMITE INFERIOR DE QUANTIFICAÇÃO	61
3.2.8.2.4.2. LINEARIDADE / CURVA DE CALIBRAÇÃO	61
3.2.8.2.5. PRECISÃO E EXATIDÃO	62
3.2.8.2.6. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DOS CONTROLES DE QUALIDADE	63
3.2.8.2.7. VALIDAÇÃO INTRACORRIDA	63
3.2.8.2.8. VALIDAÇÃO INTERCORRIDAS	64
3.2.8.2.9. VALIDAÇÃO DA REINJEÇÃO	64
3.2.8.2.10. VALIDAÇÃO DE ANÁLISE DE FÁRMACOS DE USO CONCOMITANTE	64
3.2.8.2.10.1. SELETIVIDADE NA PRESENÇA DE FÁRMACOS DE USO CONCOMITANTE	65
3.2.8.2.10.2. EFEITO DE MATRIZ NA PRESENÇA DE FÁRMACOS DE USO CONCOMITANTE	65
3.2.8.2.10.3. EXATIDÃO E PRECISÃO NA PRESENÇA DE FÁRMACOS DE USO CONCOMITANTE	66
3.2.8.2.11. ESTUDO DE ESTABILIDADE DO FÁRMACO NO FLUIDO BIOLÓGICO	66
3.2.8.2.11.1. AMOSTRAS RECÉM PREPARADAS	66
3.2.8.2.11.2. ESTABILIDADE DE CURTA DURAÇÃO	66
3.2.8.2.11.3. ESTABILIDADE DO FÁRMACO EM CICLOS DE CONGELAMENTO E DEGELO	67
3.2.8.2.11.4. ESTABILIDADE PÓS PROCESSAMENTO	67
3.2.8.2.11.5. ESTABILIDADE DE LONGA DURAÇÃO	67
3.2.8.2.11.6. ESTUDO DE ESTABILIDADE DE SOLUÇÕES PADRÃO	68
3.2.8.2.12. CÁLCULOS DAS CONCENTRAÇÕES DE AMOSTRAS	68
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.1. PRÉ-DESENVOLVIMENTO	69
4.2. DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA BIOANALÍTICA	70
4.2.1. OBTENÇÃO DO ESPECTRO DE MASSAS (MS)	70
4.2.2. OTIMIZAÇÃO DO EQUIPAMENTO, SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA E PROCESSO DE EXTRAÇÃO	76

4.3. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA BIOANALÍTICA	79
4.3.1. SELETIVIDADE	82
4.3.2. EFEITO RESIDUAL (CARRYOVER)	92
4.3.3. EFEITO DE MATRIZ	93
4.3.4. CURVA DE CALIBRAÇÃO	96
4.3.5. PRECISÃO E EXATIDÃO: VALIDAÇÃO INTRACORRIDA	100
4.3.6. PRECISÃO E EXATIDÃO: VALIDAÇÃO INTERCORRIDAS	110
4.3.7. VALIDAÇÃO DA REINJEÇÃO	115
4.3.8. VALIDAÇÃO DE FÁRMACOS DE USO CONCOMITANTE	118
4.3.9. SELETIVIDADE NA PRESENÇA DE FÁRMACOS DE USO CONCOMITANTE	121
4.3.10. EFEITO DE MATRIZ NA PRESENÇA DE FÁRMACOS DE USO CONCOMITANTE	123
4.3.11. EXATIDÃO E PRECISÃO NA PRESENÇA DE FÁRMACOS DE USO CONCOMITANTE	126
4.3.12. ESTUDO DE ESTABILIDADE DO FÁRMACO EM FLUÍDO BIOLÓGICO	128
4.3.13. ESTABILIDADE PÓS PROCESSAMENTO	130
4.3.14. AMOSTRAS RECÉM-PREPARADAS UTILIZADAS NOS ESTUDOS DE ESTABILIDADE DO FÁRMACO	133
4.3.15. ESTABILIDADE DO FÁRMACO EM CICLOS DE CONGELAMENTO E DEGELO	136
4.3.16. ESTABILIDADE DE CURTA DURAÇÃO	138
4.3.17. ESTABILIDADE DE SOLUÇÕES PADRÃO	141
4.3.18. ESTABILIDADE DE LONGA DURAÇÃO	145
5. CONCLUSÕES	149
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	150
7. ANEXOS	162

1. INTRODUÇÃO

Os ácidos biliares, os principais componentes lipídicos da bÍlis, são sintetizados a partir do colesterol no fÍgado e subseqüentemente conjugados com taurina ou glicina, levando a um aumento na sua solubilidade. Imediatamente após a síntese, os ácidos biliares são secretados na bile, bem como concentrados e armazenados na vesÍcula biliar. Após a ingestão alimentar, a vesÍcula biliar é estimulada pelo entero-hormônio colecistocinina para liberar a bile no duodeno, onde os ácidos biliares auxiliam na digestão e absorção de lipÍdeos e vitaminas lipossolúveis (LI; CHIANG, 2014).

Os ácidos biliares principais dos seres humanos adultos são os ácidos cólico (CA), quenodesoxicólico (CDCA), desoxicólico (DCA), litocólico (LCA) e ursodesoxicólico (UDCA). Esses compostos estimulam o fluxo da bile, inibem por retroalimentação a síntese do colesterol, promovem a excreção intestinal de colesterol e facilitam a dispersão e a absorção dos lipÍdios e das vitaminas lipossolúveis. Depois da secreção nas vias biliares, os ácidos biliares são em grande parte (95%) reabsorvidos no intestino (principalmente no íleo terminal), retornam ao fÍgado e são secretados novamente na bile (circulação êntero-hepática). Ácido cólico, ácido quenodesoxicólico, ácido desoxicólico constituem 95% dos ácidos biliares, enquanto os ácidos litocólico e ursodesoxicólico são componentes menos significativos. Os ácidos biliares são encontrados principalmente na forma de conjugados com glicina e taurina, cujos sais são conhecidos como sais biliares. As bactÍrias do intestino grosso convertem os ácidos biliares primários (cólico e quenodesoxicólico) em ácidos secundários por desconjugação e desidroxilação sequenciais (GOODMAN; GILMAN, 2010).

Os ácidos biliares secundários como o ácido desoxicólico e o ácido litocólico, são constituÍdos de formas conjugadas de ácido cólico e ácido quenodesoxicólico, respectivamente, através da flora intestinal. Os ácidos biliares terciários são o ácido ursodesoxicólico e o sulfolitocólico, formados através da epimerização do ácido quenodesoxicólico ou sulfatação do ácido litocólico, respectivamente. No cólon, cerca de 10% dos ácidos biliares secretados são reabsorvidos através de difusão passiva. O resultado é que cerca de 2-5% dos ácidos biliares secretados são eliminados nas fezes (DEBRUYNE et al., 2001).

O ácido ursodesoxicólico ou ursodiol (UDCA) é um ácido biliar que ocorre naturalmente em pequenas quantidades no plasma humano. Atua fisiologicamente através da regulação do colesterol, reduzindo a taxa em que o intestino absorve e sintetiza estas moléculas (TONIN; ARENDS, 2018). Por esta razão, o UDCA é utilizado farmacologicamente em patologias onde há

disfunção desta regulação, como para o tratamento de cálculos biliares formados por colesterol, síndrome pós colecistectomia, cirrose biliar primária, discinesias, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, colestases, hepatite crônica, entre outras (CHIESI PHARMA INC; ZAMBOM LAB PHARMA INC, 2015).

O UDCA é um ácido biliar hidrofílico desidroxilado formado pela epimerização do ácido biliar quenodesoxicólico no intestino pelas bactérias intestinais; esse composto constitui de 1 a 3% das reservas totais de ácidos biliares dos seres humanos, mas está presente em concentrações muito mais alta nos ursos. Quando administrado por via oral, os ácidos biliares litolíticos como o quenodesoxicólico e UDCA podem alterar as concentrações relativas dos ácidos biliares, reduzir a secreção lipídica biliar e diminuir o teor de colesterol na bile, de forma que se torne menos litogênica. O UDCA também pode ter efeitos citoprotetores nos hepatócitos e efeitos no sistema imune, que explicam parte dos seus efeitos benéficos nas doenças hepáticas colestáticas (GOODMAN; GILMAN, 2010).

Após ingestão, o UDCA passa pelo fígado, onde através de processos de amidação é conjugado com glicina ou taurina, dando origem aos seus principais metabólitos, o GUDCA e TUDCA. Depois de secretados nos ductos biliares hepáticos, estes conjugados são concentrados na vesícula e expelidos no duodeno onde será realizada sua função farmacológica (ZAMBOM LAB PHARMA INC, 2015; THAKARE, 2018). Portanto, se faz necessária a quantificação tanto do fármaco principal (UDCA) quanto de seus metabólitos (TUDCA e GUDCA) em estudos de bioequivalência (HORKOVICS-KOVATS, 2018).

Os ácidos biliares estão presentes em baixas concentrações ($\mu\text{mol L}^{-1}$) no plasma e muitos deles como os ácidos quenodesoxicólico, desoxicólico e ursodesoxicólico são estruturalmente similares. Isso implica que a determinação e quantificação dos ácidos biliares, analisados individualmente, exige métodos sensíveis e específicos (BURKARD; VON ECKARDSTEIN; RENTSCH, 2005).

Como os ácidos biliares apresentam similaridade entre si, à determinação individual de cada um destes pode indicar mais especificamente o dano hepático (CHENG; BUCKLEY; KLAASSEN, 2007). Para a determinação individual dos ácidos biliares a cromatografia acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) tem sido utilizada para as análises. A cromatografia gasosa apresenta maior sensibilidade e resolução, porém faz necessária a derivatização prévia dos analitos, o que pode ser um fator limitante em relação a etapa de extração utilizada (KUMAR et al., 2011). As análises por LC-MS vêm sendo utilizada e não necessitam de derivatização prévia

dos analitos e os procedimentos de extração são compatíveis com a análise instrumental (ALNOUTI; CSANAKY; KLAASSEN, 2008; BENTAYEB et al., 2008; TAGUCHI; FUKUSAKI; BAMBA, 2013).

Uma metodologia, eficiente e simples, para quantificação de Ursodiol e seus principais metabólitos em baixas concentrações no plasma humano através do uso de LC-MS/MS, permite sua aplicação em estudos de bioequivalência e biodisponibilidade.

Dados analíticos não-confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominado validação. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Para registro de novos produtos, todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologia analítica e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação. Um processo de validação bem-definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (WHO, 1992; CODEX, 1995).

1.1. Ácidos Biliares

Os ácidos biliares apresentam 24 átomos de carbono em suas estruturas, com um, dois ou três grupos hidroxila e uma cadeia lateral com um grupo carboxílico terminal. São compostos anfipáticos. Assim, esses compostos possuem uma parte polar e outra apolar e podem atuar como agentes emulsificadores no intestino, ajudando na preparação dos triacilgliceróis, e de outros compostos lipídicos da dieta, para a degradação pelas enzimas digestivas pancreáticas (EL KIHIL et al., 2008; VALKONEN et al., 2008; QIAO et al., 2012).

Os principais ácidos biliares (Figura 1) são o ácido cólico (hidroxilação na posição C-3 α , C-7 α e C-12 α), ácido quenodesoxicólico (hidroxilação na posição C-3 α e C-7 α), ácido desoxicólico (hidroxilação na posição C-3 α , C-7 α e C-12 α), ácido litocólico (hidroxilação na posição C-3 α e C-24 α) e UDCA (hidroxilação na posição C-3 α , C-7 α e C-24 α) (GOODMAN; GILMAN, 2010).

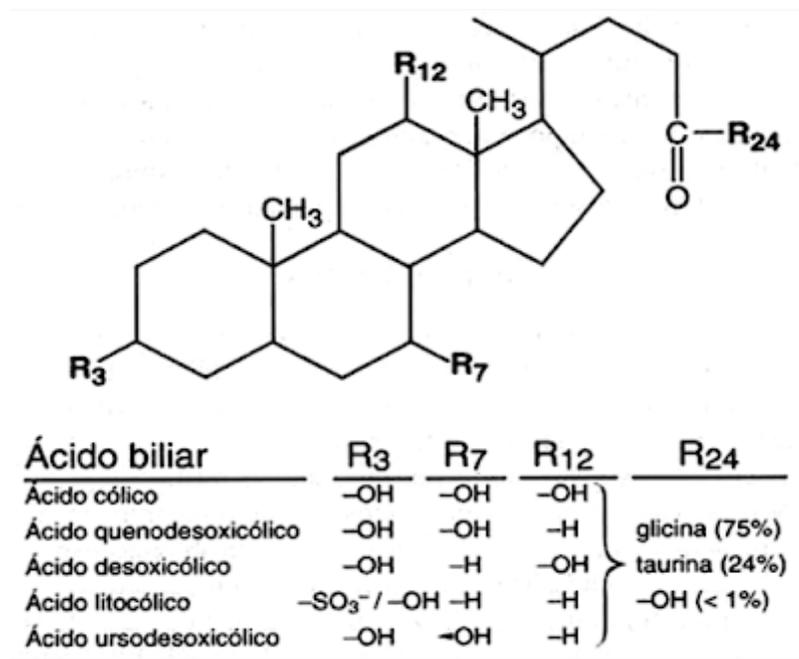


FIGURA 1. Principais ácidos biliares.

A conversão do colesterol em ácidos biliares é fundamental para manter a homeostase do colesterol e evitar o acúmulo de colesterol, triglicérides e metabólitos tóxicos, além de lesões no fígado e outros órgãos. A circulação entero-hepática de ácidos biliares do fígado para o intestino e de volta para o fígado desempenha um papel central na absorção e distribuição de nutrientes e na regulação e homeostase metabólica. Este processo fisiológico é regulado por um complexo sistema de transporte de membrana no fígado e intestino regulado por receptores nucleares (CHIANG, 2013).

A partir de uma série de reações de hidroxilação e redução do colesterol, são produzidos, nos hepatócitos, os ácidos biliares primários cólico e quenodesoxicólico, cujas diferenças estruturais se baseiam nas posições dos grupos α -hidroxil. A etapa limitante na produção dos ácidos biliares ocorre quando se forma um grupo hidroxila na posição 7 do colesterol, reação catalisada pela enzima 7 α -hidroxilase, a qual é inibida quando a produção dos ácidos biliares aumenta (LIEBERMAN; MARKS, 2013). Eles são secretados na bile geralmente conjugados com os aminoácidos glicina ou taurina, o que aumenta sua solubilidade em água; em pH fisiológico do meio duodenal, eles se encontram na forma ionizada, e em geral formam sais com cátions monovalentes, especialmente o sódio (HOFMANN, 1999). Os ácidos biliares secundários são derivados dos primários através de modificações pela microbiota intestinal, sendo as principais

delas desidroxilação e desconjugação; a desconjugação bacteriana causa a menor solubilidade das moléculas em meio ácido, característico das porções mais distais do intestino. Os ácidos biliares secundários de maior importância no organismo são os ácidos litocólico (oriundo da desidroxilação do ácido quenodesoxicólico) e desoxicólico (da desidroxilação do ácido cólico) (GOWDA et al., 2009). Os ácidos biliares terciários, o ursodesoxicólico e o sulfolitocólico são produzidos no intestino ou no fígado a partir dos secundários (PIRES; COLAÇO, 2004).

A manutenção de um *pool* de ácido biliar apropriado no corpo é determinada pela síntese hepática de ácido biliar, secreção biliar, concentração e contração da vesícula biliar, trânsito intestinal, biotransformação microbiana, reabsorção intestinal e excreção fecal. As bactérias intestinais desempenham um papel importante no metabolismo de ácido biliar porque são responsáveis pela transformação dos ácidos biliares primários em secundários. As etapas envolvidas incluem desconjugação, desidroxilação e oxidação de grupos hidroxila nas posições 3, 7 e 12 (RIDLON; KANG; HYLEMON, 2006). A microbiota intestinal humana é um sistema extremamente dinâmico tanto na saúde quanto na doença (BONFRATE, 2013; LONG; GAHAN; JOYCE, 2017) e, portanto, tem efeitos profundos no perfil final de ácidos biliares. Esse processo aumenta significativamente a hidrofobicidade do *pool* de ácidos biliares e, conseqüentemente, o risco de efeitos carcinogênicos potenciais (CAO et al., 2017).

Os ácidos biliares individuais variam acentuadamente em suas propriedades físico-químicas, funções fisiológicas, afinidades com receptores de superfície e nucleares, bem como suas toxicidades (POWELL, et al., 2001; KATONA; 2009; CHIANG, 2013). Devido à diversidade dos seus efeitos fisiológicos vs. tóxicos e devido às diferenças marcantes entre os ácidos biliares individuais, a homeostase de ácidos biliares é firmemente regulada em condições normais, nos níveis de síntese, transporte e metabolismo para manter os seus papéis fisiológicos e prevenir os seus efeitos patológicos (ALNOUTI, 2009).

Os ácidos biliares têm se destacado no tratamento de diversas patologias, assim como obesidade e diabetes mellitus 2 (DM2). Estes compostos levam a redução do peso corpóreo e depósitos de gordura (DA-SILVA et al., 2011; GUO et al., 2015) aumento na β -oxidação e redução na esteatose hepática (GUO et al., 2015), melhora na tolerância a glicose e sensibilidade a insulina (OZCAN et al., 2009; YANG et al., 2010; GUO et al., 2015; TURDI; HU; REN, 2013), modulação na secreção de insulina e glucagon (DÜFER et al., 2012; KUMAR et al., 2016), além de serem utilizados no tratamento do Alzheimer (DIONÍSIO et al., 2015), doenças cardíacas

(TURDI; HU; REN, 2013), renais (WANG et al., 2016), visuais (WOO; KIM; YU, 2010) e pulmonares (SIDDESHA et al., 2016) em modelos animais.

Foi recentemente determinado que os ácidos biliares têm muitos efeitos metabólicos além de sua função digestiva. Efeitos endócrinos e parácrinos de alguns receptores ativados por ácidos biliares foram determinados (ARAB, 2017). Foi demonstrado que o receptor farnesóide X (FXR), o receptor pregnan X (PXR), o receptor constitutivo de androstano (CAR) e o receptor nuclear de vitamina D (VDR) são estimulados por ácidos biliares (LI; CHIANG, 2014).

Ácidos biliares, que por décadas foram considerados apenas envolvidos na digestão lipídica no lúmen intestinal e solubilização do colesterol na bile, agora parecem ter efeitos pleiotrópicos: contribuem para a homeostase de lipídios, glicose e outros substratos metabólicos (LI; CHIANG 2014), afetando as funções do sistema imunológico (SIPKA; BRUCKNER 2014), bem como a composição do microbioma intestinal (RIDLON et al., 2014). Ligando-se a múltiplos receptores citoplasmáticos e nucleares em vários órgãos e tecidos, eles atuam como hormônios reais.

Está se tornando evidente que os ácidos biliares não podem mais ser considerados como simples compostos detergentes que são úteis em processos digestivos. A lista de seus papéis fisiológicos, bem como dos processos patológicos em que estão envolvidos, seja como agentes etiológicos, mediadores do processo patogênico ou simplesmente afetados por alterações induzidas por doenças no fígado ou no manejo intestinal desses esteróides, é longo e ainda não está completa. Além disso, devido às suas peculiares características físico-químicas e biológicas, a enorme utilidade potencial dos ácidos biliares no desenvolvimento de abordagens farmacêuticas, bem como a sua utilização como fármacos naturais ou como base para a síntese de novos fármacos semissintéticos, está a encorajar muitos grupos diferentes em todo o mundo a investirem esforços neste sentido (MONTE et al., 2009).

1.2. Ácido Ursodesoxicólico

O UDCA (Figura 2) é um pó branco de sabor amargo composto por partículas cristalinas livremente solúveis em etanol e ácido acético glacial, ligeiramente solúvel em clorofórmio, pouco solúvel em éter e praticamente insolúvel em água. O nome químico do UDCA é 3a,7p-di-hidroxi-5p-colano-24-oico e sua fórmula molecular é $C_{24}H_{40}O_4$. Possui massa molecular de 392,56 g mol⁻¹.

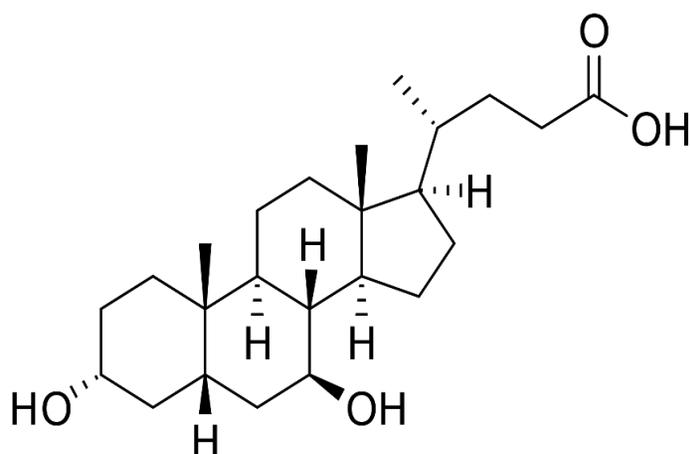


FIGURA 2. Ácido Ursodesoxicólico.

O UDCA foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para a dissolução de cálculos biliares e a cirrose biliar primária. O UDCA é relatado para aumentar o fluxo da bile, alterar o índice de hidrofobicidade do grupo de ácido biliar e tem efeitos imunossupressores (BACHRACH; HOMANN, 1982; LEUSCHNER et al., 1985).

O UDCA e o TUDCA foram sintetizados pela primeira vez a partir do ácido cólico em 1954 no Japão. Hoje, o UDCA é produzido por vários fabricantes em todo o mundo e comercializado sob vários nomes comerciais, incluindo Ursodiol, Actigall, Ursosan, Urso, Urso Forte e Deursil. O UDCA é aprovado por vários governos para o tratamento de doenças do fígado e para a dissolução de cálculos biliares. Na Itália, TUDCA é comercializado como Taurilite e é usado de forma semelhante. A dosagem oral típica de UDCA é 7-15 mg kg⁻¹ de peso corporal por dia. Tanto o TUDCA quanto o UDCA são bem tolerados; o efeito colateral mais comum é a diarreia em menos de 2% das várias populações testadas (WARD, et al., 1984; CROSIGNANI, ET AL., 1996)

Um estudo direcionado para investigação do efeito do UDCA em crianças, para reduzir transaminases hepáticas elevadas induzidas por drogas anticonvulsivantes (hepatite induzida por drogas). O estudo foi conduzido a partir das propriedades citoprotetoras e antioxidantes do UDCA para serem usadas na inflamação induzida por fármaco no fígado. Vinte e dois pacientes epiléticos com idade entre 4 meses e 3 anos de idade que estavam sob terapia anticonvulsivante com drogas como ácido valpróico, primidona, levetiracetam, fenobarbital ou qualquer combinação deles demonstraram elevação das transaminases no fígado, após a exclusão das causas virais-autoimunes, metabólicas e anatômicas, receberam UDCA em dose de 10-15 mg kg⁻¹/dia, pelo

menos durante 6 meses. Os resultados obtidos indicaram que o UDCA foi eficaz e bem tolerável nas crianças com hipertransaminasemia induzida por drogas. Nenhum efeito colateral foi visto e registrado e com base no estudo e devido aos resultados apresentados, é recomendado o uso do UDCA como uma escolha segura e efetiva em hepatotoxicidades induzidas por drogas (Asgarshirazi; et al., 2015).

O UDCA é usado para colelitíase, tratar cirrose biliar, refluxo de bile na gastrite, no tratamento do câncer coloretal (TAY et al., 2007), colangite esclerosante primária (LINDOR, 1997), prevenção da pancreatite causada por microlitíases em pacientes com a vesícula biliar intacta e também em pacientes com hepatite C aumentando o nível da enzima alanina aminotransferase (IKEGAMI; MATSUZAKI, 2008). Pode antagonizar a progressão da doença hepática gordurosa não hepática para esteato-hepatite não alcoólica através da proteção dos hepatócitos na mediação dos sais biliares no trauma mitocondrial, sinalizando caminho antiapoptótico, anti-inflamatório, antioxidante, função imunomodulatória, propriedades antifibróticas, que está sendo largamente usado em doenças hepáticas (CHO; KIM; PAIK, 2012; LE; LOOMBA, 2012; HIGUERA-DE LA TAJERA; CAMANO, 2015).

O UDCA é um ácido biliar hidrofílico de ocorrência natural, epímero 7 β do ácido quenodesoxicólico, que aparenta ter menos propriedades hepatotóxicas comparativamente aos ácidos biliares hidrofóbicos endógenos. Desta forma, a sua principal ação terapêutica passa pela substituição desses ácidos por inibição competitiva a nível do íleo terminal (CAREY, 2015). Ao inibir a absorção intestinal dos ácidos biliares, este fármaco aumenta a sua secreção e a eliminação de substâncias tóxicas dos hepatócitos. Além disso, atua como anti-inflamatório, estimula a secreção de um fluido rico em bicarbonato pelos colangiócitos, o que diminui a colestase e aumenta a formação de micelas, diminuindo o efeito tóxico dos ácidos biliares nas membranas celulares. Por fim, exerce efeitos imunomoduladores e, ao atuar como agonista dos receptores dos glicocorticoides, apresenta propriedades antiapoptóticas de grande interesse (CZUL; PEYTON; LEVY, 2013; CAREY, 2015).

O medicamento UDCA possui registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Os usos aprovados pela ANVISA são:

1. Dissolução dos cálculos biliares, formados por colesterol que: Apresentam litíase por cálculos não radiopacos, com diâmetro inferior a 1cm, em vesícula funcionante ou no canal colédoco. Recusaram a intervenção cirúrgica ou apresentam contra-indicações para a mesma.

Apresentam supersaturação biliar de colesterol na análise da bile colhida por cateterismo duodenal;

2. Tratamento da forma sintomática da cirrose biliar primária;
3. Alterações qualitativas e quantitativas da bile;
4. Colecistopatia calculosa em vesícula biliar funcionante;
5. Litíase residual do colédoco ou recidivas após intervenção sobre as vias biliares;
6. Síndrome dispéptico-dolorosas das colecistopatias com ou sem cálculos e pós-colecistectomia; discinesias das vias biliares e síndromes associadas;
7. Alterações lipêmicas por aumento do colesterol e/ou triglicérides;
8. Terapêutica coadjuvante da litotripsia (BRASIL, 2012a).

Em 28 de abril de 2011, foi publicada a Lei nº 12.401 que dispõe sobre a assistência terapêutica e a incorporação de tecnologias em saúde no âmbito do SUS. Esta lei é um marco para o SUS, pois define os critérios e prazos para a incorporação de tecnologias no sistema público de saúde. Define, ainda, que o Ministério da Saúde, assessorado pela Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias (CONITEC), tem como atribuições a incorporação, exclusão ou alteração de novos medicamentos, produtos e procedimentos, bem como a constituição ou alteração de protocolo clínico ou de diretriz terapêutica. Os membros da CONITEC presentes na 71ª reunião ordinária, no dia 04 de outubro de 2018, deliberaram (Registro de Deliberação nº 379/2018), por unanimidade, por recomendar a incorporação no SUS do UDCA para Colangite Biliar Primária e através da Portaria nº 47, de 16 de outubro de 2018, tornou pública a decisão de incorporar o UDCA para colangite biliar no âmbito do Sistema Único de Saúde – SUS (BRASIL, 2018).

1.2.1. Ácido Tauroursodesoxicólico

O ácido Tauroursodeoxicólico (Figura 3) é formado pela conjugação do ácido ursodeoxicólico (UDCA) com taurina, é um ácido biliar hidrofílico aprovado pela Food and Drug Administration para o tratamento de certas doenças hepáticas colestáticas (VANG, 2014) O nome químico do TUDCA é (2- [(3 α , N-(3 α ,7 β -Dihydroxy-5 β -cholan-24-oyl)]-taurine; TUDCA), possui fórmula molecular C₂₆H₄₅NO₆S e peso molecular 499.707 g mol⁻¹.

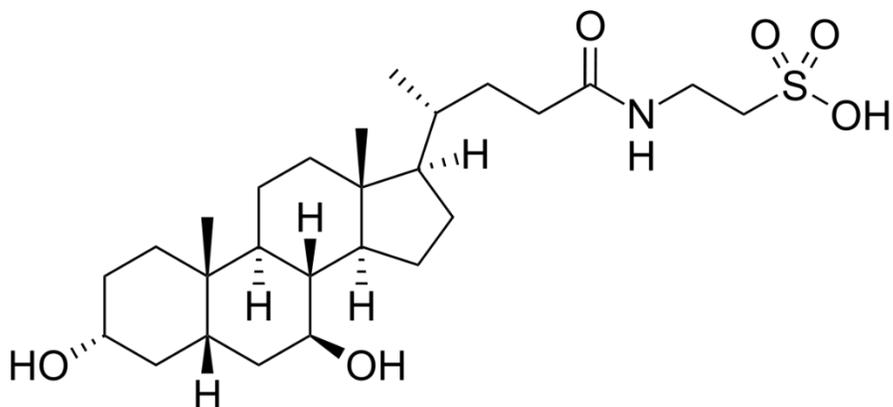


FIGURA 3. Ácido Tauroursodesoxicólico.

O ácido biliar conjugado a taurina (TUDCA) apresenta atividade de chaperona química, levando a redução do estresse de retículo em diversos tipos celulares, inclusas células beta pancreáticas (VETORAZZI, 2017).

O TUDCA tem sido alvo de diversas pesquisas em uma ampla variedade de doenças não hepáticas. Tanto o UDCA quanto o TUDCA são potentes inibidores da apoptose, em parte interferindo na via mitocondrial a montante da morte celular, inibindo a produção de radicais de oxigênio, reduzindo o estresse do retículo endoplasmático e a estabilização da resposta à proteína desdobrada. Vários estudos demonstraram que o TUDCA serve como agente antiapoptótico para uma série de doenças neurodegenerativas, incluindo esclerose lateral amiotrófica, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e doença de Huntington. Além disso, TUDCA desempenha um papel importante na proteção contra a morte celular em certos distúrbios da retina, como retinite pigmentosa. Verificou-se que reduz o estresse do retículo endoplasmático associado a níveis elevados de glicose no diabetes, inibindo a ativação da caspase, aumentando a resposta de proteína desdobrada e inibindo as espécies reativas de oxigênio. Obesidade, acidente vascular cerebral, infarto agudo do miocárdio, lesão da medula espinhal e uma longa lista de doenças agudas e crônicas não hepáticas associadas ao apoptose são possíveis alvos terapêuticos para TUDCA (VANG, 2014).

Além disso, o UDCA é uma molécula aprovada pela Food and Drug Administration e os estudos publicados concluíram que o tratamento com UDCA representa uma opção segura e efetiva para pacientes com cirrose biliar primária (LOTTERER et al., 1989). Posteriormente,

TUDCA também mostrou ser, disponível oralmente, um agente de penetração do sistema nervoso central e com a capacidade de inibir a apoptose (XAVIER et al., 2014).

O TUDCA é um ácido biliar endógeno produzido em pequenas quantidades. É utilizado como estratégia terapêutica em indivíduos com disfunções biliares. O TUDCA demonstrou ser neuroprotetor em diversos modelos animais de doenças neurodegenerativas (WARD et al., 2011).

O UDCA e seus conjugados perfazem 60% do conteúdo total da bile de ursos, sendo evidenciado que o TUDCA compreende apenas 0,13% do conteúdo total de ácidos biliares no soro de humanos (BOATRRIGHT et al., 2009; WOO; KIM; YU, 2010).

1.2.2. Ácido Glicoursodesoxicólico

Foi demonstrado que GUDCA (Figura 4) impede a morte celular, bem como a liberação de citocinas pró-inflamatórias em astrócitos expostos à bilirrubina não conjugada. O GUDCA (N-[(3 α ,5 β ,7 β)-3,7-dihydroxy-24-oxocholan-24-yl] Glycine; GUDCA), possui fórmula molecular $C_{26}H_{43}NO_5$ e massa molecular de $449,6 \text{ g mol}^{-1}$.

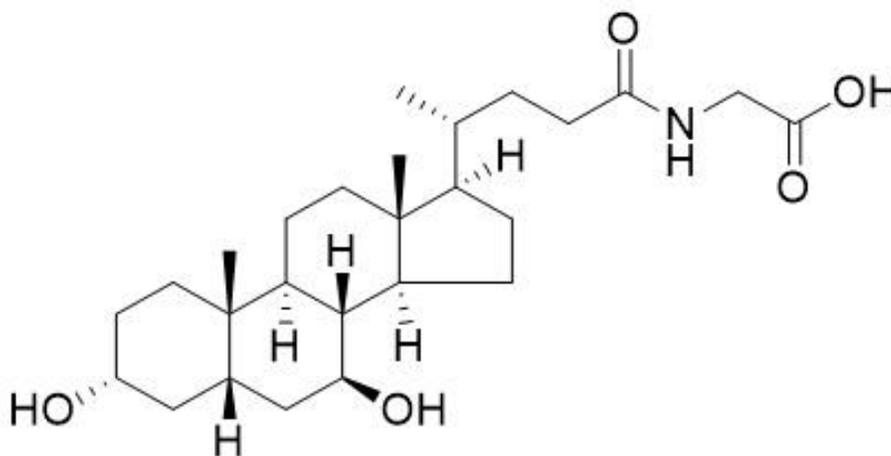


FIGURA 4. Ácido Glicoursodesoxicólico.

Após a administração oral, o UDCA é conseqüentemente submetido à conjugação hepática com glicina ou taurina, produzindo, respectivamente, os ácidos glicoursodesoxicólico e tauroursodesoxicólico. O GUDCA é a espécie principal, responsável por 79,8% da conjugação do

UDCA e, portanto, é a forma com maior relevância clínica (LAZARIDIS et al., 2001). Estas espécies conjugadas resultantes mostraram propriedades citoprotetoras em diferentes células do sistema nervoso central, tais como neurônios, astrócitos ou microglia (SILVA et al., 2012; VAZ et al., 2010).

O GUDCA é formado pela conjugação do UDCA com glicina durante o metabolismo de primeira passagem (VAN DEN BOSSCHE et al., 2017), sendo mais hidrofílico. Em um modelo de rato com colite, a administração oral diária de GUDCA (500 mg kg⁻¹/dia) diminuiu a gravidade dos sintomas e aumentou a quantidade de uma espécie bacteriana (*A. muciniphila*) comumente diminuída em pacientes com doença inflamatória intestinal. Tem efeitos antioxidantes *in vitro* nas células esofágicas de Barrett e em neurônios primários de ratos (BRITO et al., 2008; GOLDMAN et al., 2010). Também previne a morte celular astrogliar da exposição à bilirrubina não conjugada, um modelo *in vitro* de hiperbilirrubinemia neonatal, e reduz os níveis de citocinas inflamatórias em culturas astrogliais (FERNANDEZ et al., 2007).

O UDCA e seu principal conjugado GUDCA são ácidos biliares com propriedades neuroprotetoras. Estudos anteriores demonstraram suas propriedades anti-apoptóticas, anti-inflamatórias e antioxidantes em células neurais expostas a níveis elevados de bilirrubina não conjugada como na icterícia grave. Em um modelo simplificado da barreira hematoencefálica, formada por monocamadas confluentes de uma linha celular de células endoteliais microvasculares do cérebro humano, a bilirrubina não conjugada demonstrou induzir a ativação da caspase-3 e a morte celular, bem como a liberação de interleucina-6 e a perda de integridade da barreira hematoencefálica. Foram testados os efeitos preventivos e restauradores desses ácidos biliares em relação ao rompimento das propriedades da barreira hematoencefálica pela bilirrubina não conjugada em condições *in vitro* simulando hiperbilirrubinemia neonatal grave e usando o mesmo modelo experimental de barreira hematoencefálica. Ambos os ácidos biliares reduziram a morte celular apoptótica induzida pela bilirrubina não conjugada, mas somente o GUDCA contrabalançou significativamente a ativação da caspase-3. Os dados divulgam uma janela de tempo terapêutico para efeitos preventivos e restaurativos do UDCA e do GUDCA contra a ruptura da barreira hematoencefálica induzida por bilirrubina não conjugada e danos às células endoteliais microvasculares do cérebro humano (PALMELA, et. al., 2016).

Foi demonstrado que o GUDCA evita a morte celular, bem como a liberação de citocinas pró-inflamatórias em astrócitos expostos a bilirrubina não conjugada. Este efeito imunomodulador é feito no nível pós-tradução, uma vez que afeta principalmente a atividade das enzimas

conversoras de TNF- α e IL-1 β , evitando assim a maturação dessas citocinas e sua consequente liberação (FERNANDES et al., 2007b). Além disso, GUDCA contrariou a morte de células neuronais induzidas por bilirrubina não conjugada e o estresse oxidativo, inibindo a oxidação da proteína induzida por bilirrubina não conjugada, a peroxidação lipídica e a perda de glutatona em neurônios maduros (BRITO et al., 2008a), além de induzir uma diminuição rápida e sustentada de concentrações de bilirrubina não conjugada em plasma em modelo de ratos Gunn (CUPERUS et al., 2009).

1.3. Bioequivalência

Para que um medicamento possa ser registrado como genérico ou para obter seu registro como similar no Brasil é necessária a execução de uma série de testes analíticos regulamentados por legislações e resoluções do Ministério da Saúde. Estes ensaios só podem ser realizados por centros de pesquisa devidamente habilitados pela ANVISA. Um dos testes mais importantes é o estudo de biodisponibilidade relativa / bioequivalência, onde são comparados dois medicamentos de mesma forma farmacêutica e composição química, sendo um destes o medicamento de referência, também conhecido como inovador, utilizado como comparador e o outro medicamento chamado de teste, que corresponderá àquele medicamento objeto da investigação farmacêutica para estabelecimento de sua intercambialidade (PEREIRA, 2014).

Um estudo de bioequivalência tem por objetivo comparar as biodisponibilidades de duas ou mais formulações de um mesmo fármaco, considerados equivalentes farmacêuticos e que tenham sido administrados na mesma dose molar de maneira que as formulações possam ser consideradas intercambiáveis. Em farmacologia o termo intercambialidade indica a possibilidade de substituição de um medicamento por outro equivalente terapêutico receitado pelo prescritor (BRASIL, 1999).

Os estudos de bioequivalência/biodisponibilidade relativa são realizados em seres humanos e devem assegurar a identidade dos produtos (teste e referência) em relação à velocidade da absorção e quantidade do fármaco absorvido. Conforme a ANVISA, a resolução - RE nº 1.170, de 19 de abril de 2006: guia para provas de biodisponibilidade relativa / bioequivalência de medicamentos o estudo da bioequivalência se desenvolve em três etapas: Clínica, Analítica e Estatística. A etapa clínica compreende o recrutamento e a seleção de voluntários, a administração dos medicamentos e a coleta de amostras para análises referentes ao estudo e de monitoramento clínico dos voluntários durante as etapas pré e pós-estudo. A

etapa analítica compreende a análise das amostras coletadas na etapa clínica com a quantificação do fármaco inalterado e/ou seu metabólito ativo estudado, utilizando para isso métodos bioanalíticos validados, desenvolvidos no laboratório ou obtidos de compêndios e literatura adequada, conforme a legislação e normatização vigente. A etapa estatística compreende a análise dos dados obtidos na etapa analítica com o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos através de intervalos de confiança e testes de hipóteses, utilizando-se para isso ferramentas como planilhas e softwares devidamente validados. Todas as atividades realizadas nas três etapas devem apresentar ferramentas de comprovação da rastreabilidade, de forma a permitir a recuperação segura e confiável dos dados do estudo (ICTQ, 2018).

Os estudos de equivalência e bioequivalência são de relevância considerável para a saúde pública e interesses sócio-econômicos, sendo importante a criação de mecanismos e ferramentas que possam dar garantias de que os medicamentos a serem lançados no mercado apresentem as mesmas características e propriedades físico-químicas que o medicamento inovador, conhecido como de referência. Sendo assim, faz-se necessário o desenvolvimento de metodologias seguras e dinâmicas de avaliação da garantia da qualidade e dos processos referentes aos estudos realizados.

1.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia pode ser considerada um método físico-químico de separação por conter uma fase móvel e uma estacionária, sendo que a amostra a ser analisada é injetada na entrada da coluna e a fase móvel é bombeada continuamente fazendo com que a amostra migre de acordo com as interações e as propriedades físico-químicas da fase móvel e da estacionária. Do outro lado da coluna é instalado um detector que transmite para um registrador um sinal que é interpretado em forma de cromatograma, sendo a área e a altura deste proporcional a concentração do analito (CIOLA, 1985; JIN et al., 2008).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) permite a separação de misturas complexas. Suas principais características são a boa estabilidade, a resposta rápida, sua alta confiabilidade, o alto poder de resolução, a separação rápida de misturas, o monitoramento contínuo do eluente, as acuradas medidas quantitativas, a repetibilidade e reprodutibilidade da análise com a mesma coluna e a automação do procedimento analítico e do manuseio dos dados (MENDHAM et al., 2002). Na Figura 5, está demonstrado um esquema dos componentes de um cromatógrafo líquido.

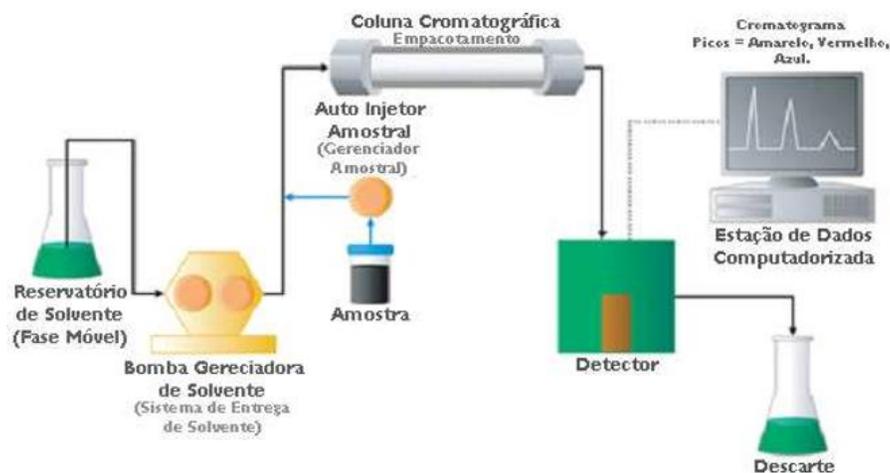


FIGURA 5. Esquematização básica de um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência.

A HPLC é uma das principais técnicas utilizadas na análise de compostos não voláteis e/ou termicamente instáveis. Apesar de ser uma excelente técnica de separação, a HPLC necessita de uma técnica confirmatória quando a análise qualitativa (confirmação da identidade química) é também necessária. Dentre as várias opções existentes neste momento, a espectrometria de massas (MS) é a técnica que melhor fornece as informações estruturais necessárias; o acoplamento entre estas duas técnicas dá origem a uma ferramenta analítica versátil e de grande potencial na análise qualitativa e quantitativa: a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) (LANÇAS, 2009).

1.5. Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica utilizada no estudo das massas de átomos, moléculas ou fragmentos de moléculas. De uma forma geral, a espectrometria de massas baseia-se em propriedades físicas do analito de forma a determinar a relação entre a massa e a carga (m/z) de espécies ionizadas em fase gasosa (AEBERSOLD et al., 2003).

Em geral, a análise por MS compreende cinco etapas (Figura 6): (1) a introdução da amostra, (2) a ionização das moléculas, (3) a passagem de um íon por um analisador de massas que separa os íons formados de acordo com a m/z ou a permanência de um “pacote” de íons no

interior de um analisador de massas, (4) o detector que “conta” os íons e transforma o sinal em corrente elétrica ou um sensor que percebe a órbita dos íons e (5) o processador que converte a magnitude do sinal elétrico em função da m/z ou a transformada de Fourier que desdobra frequências em dados, proporcionando o espectro de massas correspondente.

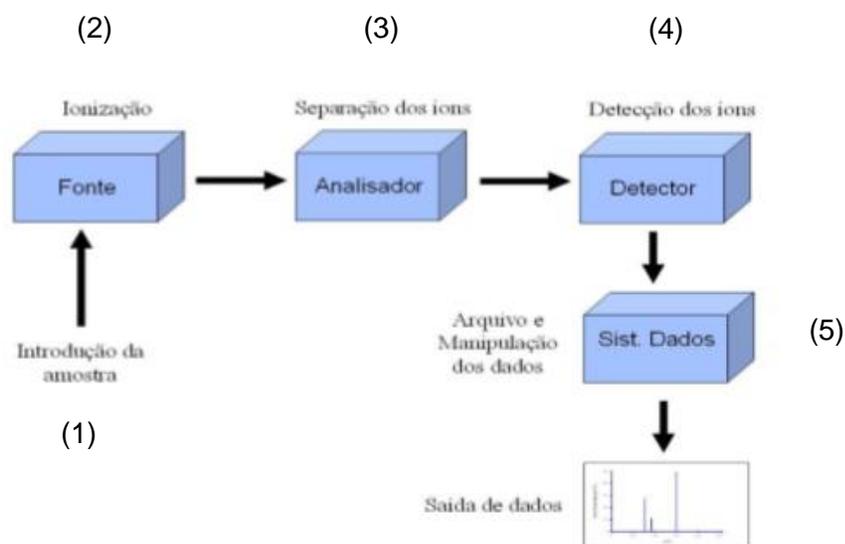


FIGURA 6. Esquema de básico de um espectrômetro de massas (ALVES, 2014).

Quase todas as substâncias podem ser analisadas por MS, já que existem diversos tipos de fontes de ionização, analisadores de massas e detectores (HOFFMANN; STROOBANT, 2007; EKMAN et al., 2009).

O acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massa (LC-MS) tornou-se essencial na identificação de compostos em nível traço. No entanto a hifenação das duas técnicas exigiu especial atenção na solução dos problemas de interface, tais como, vaporização da fase móvel vinda do LC, baixa volatilidade e sensibilidade a altas temperaturas dos analitos separados cromatograficamente. (YOU DIM, 2010; HOLCAPEK; JIRÁSKO; LÍSA, 2012).

1.5.1. Métodos de Ionização

A fonte de ionização é um dispositivo que promove a ionização dos analitos da amostra antes da sua entrada no analisador de massas. Existe uma grande variedade de técnicas de

ionização, cuja escolha deve levar em conta as propriedades físico-químicas do analito e a energia transferida durante o processo de ionização (DALMÁZIO, 2007).

No presente trabalho foi utilizada a técnica de ionização por Electrospray (ESI).

1.5.2. Ionização por ESI

Embora seja normalmente considerada como uma fonte de ionização, o ESI é, na realidade, um processo de transferência de íons pré-existentes em solução para a fase gasosa. Pode-se dizer que a efetiva ionização (transformação de uma espécie neutra em um íon) é um efeito secundário. De qualquer forma, é fácil entender porque uma técnica que permite a transferência de íons de uma solução para a fase gasosa para análise por MS, em tão pouco tempo, teve um impulso tão grande: isto se deve ao fato da maioria dos processos químicos e bioquímicos ocorrerem em fase líquida, envolvendo muitas vezes espécies pouco voláteis (MORAES; LAGO, 2003).

A fonte de ionização é a parte do equipamento responsável por converter os analitos de interesse em íons em fase gasosa, pré-requisito fundamental para qualquer análise por MS. A compreensão dos mecanismos envolvidos na ionização de cada uma das fontes é de extrema importância, já que isso define quais são os analitos possíveis de serem analisados. Na maioria dos equipamentos comerciais, algumas fontes de ionização podem ser facilmente substituídas, aumentando ainda mais a capacidade analítica dos mesmos. A ionização pode ocorrer tanto no modo positivo quanto negativo, dependendo das características do analito de interesse, e em geral ocorre de uma das seguintes formas: i) ejeção ou captura de elétrons, formando espécies conhecidas como íon molecular (M^+ ou M^-); ou ii) protonação ou desprotonação (adição ou remoção de um íon H^+), levando a formação de moléculas protonadas ou desprotonadas.

No processo de ionização por ESI, o potencial elétrico (em kV) aplicado à ponta do capilar metálico gera o acúmulo de cargas na superfície do líquido ocorrendo a deformação da gota denominada de cone de Taylor. Com a evaporação do solvente devido ao fluxo de gás nebulizante (geralmente N_2) ocorre o aumento da densidade de carga da gota, e no momento em que a densidade é capaz de vencer a tensão superficial do líquido, há um colapso, e ocorre a fissão da gota ascendente formando gotas descendentes cada vez menores. Essa tensão superficial faz com que as gotas se tornem cada vez menores ocorrendo o fenômeno denominado

“explosão coulômbica”. Com isso, forma-se o spray eletrostático (Figura 7) composto por partículas do solvente e do analito carregados (LANÇAS, 2009; CROTTI et al., 2006).

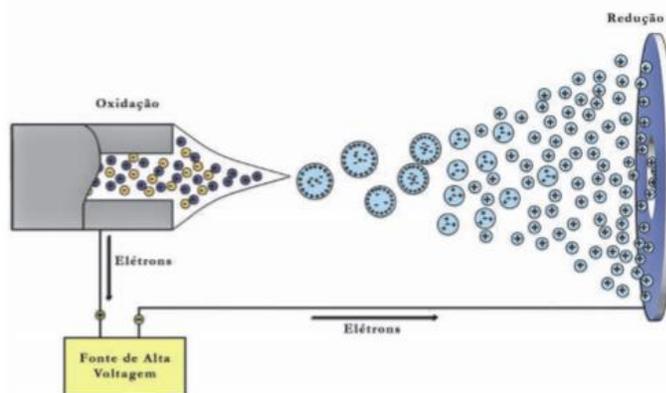


FIGURA 7. Os íons formados no processo electro spray são conduzidos para o cone de amostragem pelo campo elétrico aplicado (LANÇAS, 2001).

Em LC-MS/MS as interfaces de ionização por pressão atmosférica (API) – ESI e APCI (do inglês, atmospheric-pressure chemical ionization) – permitem a análise de variadas faixas de polaridade e de massa molecular, além de possibilitar a seleção do modo de ionização, sendo predominantemente utilizadas para a análise de fármacos e seus metabólitos em várias matrizes biológicas (FENN, 2000).

1.5.3. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial

Técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) baseiam-se em dois estágios de análise de massas, o que caracteriza a MS sequencial (MS/MS). Dessa forma há duas seleções da razão m/z , uma para o precursor e outra para o fragmento. Um espectrômetro de massas para um sistema LC-MS/MS pode ser constituído de um triplo quadrupolo, onde o primeiro e terceiro quadrupolos (Q1 e Q3) funcionam como seletores de m/z (ou filtros de massa) e o segundo quadrupolo (Q2) funciona como câmara de colisão. Assim, íons precursores podem ser isolados em Q1, fragmentados em Q2 e terem seus fragmentos identificados e quantificados em Q3 (Figura 8). Diz-se assim que monitorou uma transição de m/z . Este modo de monitoramento é chamado de MRM (monitoramento de reações

múltiplas) e permite a redução significativa do ruído de base da análise (*background*) resolvendo definitivamente o problema na quantificação de isômeros que co-eluem, desde que possuam fragmentos com diferentes razões de m/z . Em estudos de quantificação, utiliza-se uma transição de m/z para quantificar o analito e outra para confirmar sua identidade, o que aumenta ainda mais a seletividade do método (PORCARI, 2012).

O emprego da técnica MRM permite a detecção de íons específicos em amostras complexas. Maior seletividade é obtida utilizando o sistema QqQ quando comparado a técnicas que utilizam um único quadrupolo (PUTRI E FUKUSAKI, 2014).

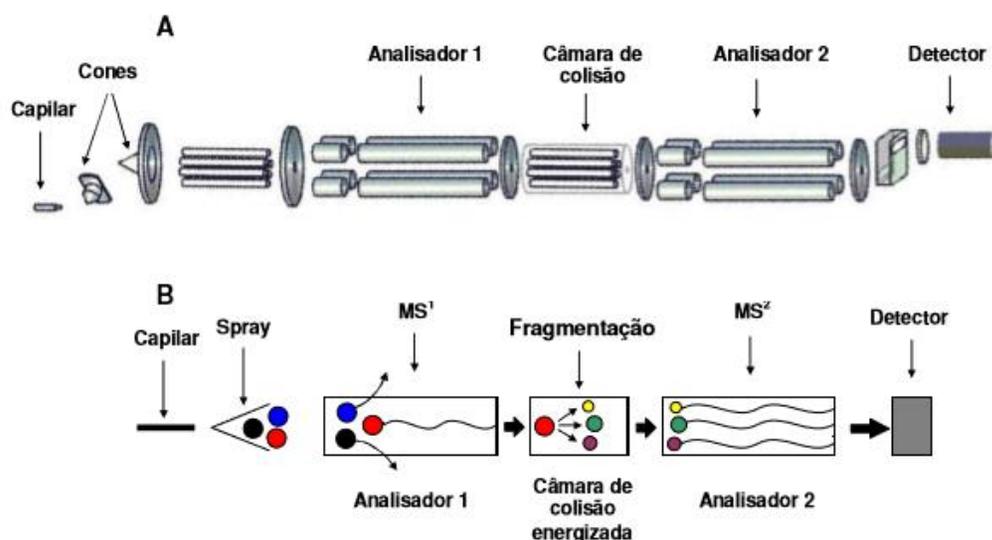


FIGURA 8. Modelo de triplo quadrupolo. (A) triplo quadruplo, fonte: Waters; (B) esquema de seleção do íon precursor e sua fragmentação. (SOUZA, 2008).

1.6. Aplicações dos métodos LC-MS/MS em estudos dos ácidos biliares

Vários métodos analíticos foram desenvolvidos para a determinação de ácidos biliares em fluidos biológicos (RAGHUNADHA et al., 2010). Estes métodos podem não ser adequados para o processamento de amostras múltiplas num período de tempo limitado para estudos farmacocinéticos. Nos últimos anos, os estudos de bioequivalência são o método comumente aceito para demonstrar a equivalência terapêutica entre os medicamentos. Um método LC-MS/MS adequado e simples para a determinação simultânea de ursodiol e seus metabólitos TUDCA e GUDCA é mais importante para estudos farmacocinéticos (SIMONI ET AL., 1995;

ALVISI et al., 1996). Também a medição destes metabolitos no plasma humano pode ser útil na compreensão do metabolismo do composto original.

Os métodos de detecção e quantificação de ácidos biliares centram-se principalmente em LC com detectores de fluorescência e MS e cromatografia gasosa acoplada à MS (GC-MS) (BURKARD; VON ECKARDSTEIN; RENTSCH, 2005). O método GC-MS exige que os ácidos biliares sejam tratados por hidrólise e derivatização de acordo com sua categoria (BIRK et al., 2012; MATYSIK; SCHMITZ, 2013). O método de LC-fluorescência também requer derivatização de fluorescência (YOU et al, 2010), enquanto que os ácidos biliares conjugados com taurina requerem derivatização após a hidrólise, mas o método LC-MS/MS não exigiu hidrólise e derivatização, tornando-se um método operacional relativamente simples para a detecção de vários tipos de ácidos biliares no soro ao mesmo tempo com as vantagens de ser rápido, reprodutível e relativamente sensível com alta eficiência de separação.

Boscolo et al. (2018) desenvolveram um método altamente sensível de LC-MS/MS aplicado à detecção e quantificação de substâncias relacionadas ao UDCA (ácido ursodesoxicólico) como CA (ácido cólico), DCA (ácido desoxicólico), CDCA (ácido quenodesoxicólico) e LCA (ácido litocólico) em matéria-prima e formulação farmacêutica. O método de LC-MS/MS desenvolvido e validado para a determinação de UDCA e substâncias relacionadas na matéria-prima e em suspensão foi vantajoso, uma vez que exigia uma quantidade mínima de amostra. Por sua vez, pode ser usado como um método indicador de estabilidade.

Um método rápido e sensível é descrito para a quantificação do ursodiol e de seus principais metabolitos, o GUDCA e o TUDCA em plasma humano usando um padrão interno único (ácido ursodeoxicólico D4). A extração em fase sólida foi realizada e a separação cromatográfica de 5 μ L da amostra injetada foi realizada usando coluna Waters Xterra de 5 μ m com uma fase móvel composta de metanol e de formiato de amônio 5 mM com 0,1% de ácido acético (70:30, v/v). O espectrômetro de massas foi utilizado em modo negativo e o monitoramento de múltiplas reações utilizando o modo de ionização por ESI como interface. O método foi totalmente validado e as curvas de calibração foram lineares no intervalo de concentração de 25,9 a 15300,1 ng mL⁻¹ para ursodiol, 2,7 a 1587,5 ng mL⁻¹ para ácido taurorresodesoxicólico e 25,4 a 15040,9 ng mL⁻¹ para GUDCA. O método foi sensível e específico, com o limite inferior de quantificação de 25,9; 2,7 e 25,4 ng mL⁻¹ para o ursodiol, o TUDCA e o ácido glicocoursodesoxicólico, respectivamente. O método inclui uma preparação de amostra simples e rápida com tempo de execução de análise mais curto e menor taxa de fluxo em comparação com os métodos relatados anteriormente. O

método pode ser aplicado em estudo de bioequivalência em indivíduos saudáveis (GANESAN et al., 2012).

Si et. al. (2016) desenvolveram um método baseado em LC-MS/MS para a determinação de ácidos biliares individuais e seus conjugados em amostras de bÍlis de suínos. O procedimento de extração em fase sÓlida (SPE) foi baseado em C18 e otimizado para que os ácidos biliares alvo e seus conjugados com glicina e taurina fossem coletados com altas recuperações para os padrões (89,1–100,2%). Em seguida, todos os 19 compostos foram separados e quantificados em uma Única etapa cromatogrÁfica de 12 min. O método foi validado em termos de linearidade, sensibilidade, precisão, precisão e recuperação. Um Limite de detecção na faixa de partes por bilhão (ppb) e com precisões medidas na faixa de 0,5 a 9,3% foi alcançado. As recuperações para todos os 19 analitos em amostras de bÍlis foram todas acima de 80%. O método validado foi aplicado com sucesso ao perfilamento de ácidos biliares e seus conjugados na bile de suínos tratados com peptÍdeo exÓgeno tipo glucagon-2 (GLP-2) em um modelo prÉ-clínico de doença hepática associada à nutrição parenteral neonatal. O método desenvolvido é rápido e pode ser facilmente implementado para análises de rotina de ácidos biliares e seus conjugados em outros biofluidos ou tecidos.

O estudo das funções de ácidos biliares requer métodos que cubram a complexidade desse grupo de moléculas estruturalmente diverso. Vários métodos usando LC-MS/MS foram desenvolvidos permitindo a análise de ácidos biliares livres e conjugados sem derivatização (YE, et al., 2007; ALNOUTI; CSANAKY; KLAASSEN, 2008). No entanto, a maioria dos métodos mostra desvantagens com procedimentos demorados de extração (BURKARD; VON ECKARDSTEIN; RENTSCH, 2005; YE, et al., 2007), longos tempos de análise (BENTAYEB et al., 2008) ou falta de separação de linha de base de espécies isobÁricas (BURKARD; VON ECKARDSTEIN; RENTSCH, 2005; YE, et al., 2007; BENTAYEB et al., 2008). A análise direta de ácidos biliares por LC-ESI-MS/MS não permite a identificação de espécies isobÁricas (PERWAIZ et al., 2001). Para análise de rotina de ácido biliar, o alto rendimento da amostra é de grande importância. Portanto, é imperativo desenvolver um método baseado em LC-MS/MS com um tempo de execução abaixo de 10 minutos incluindo a separação da linha de base de espécies isobÁricas. Este método deve ser aplicado para diagnÓsticos de rotina de ácido biliar, bem como para a determinação de espécies de ácidos biliares em grandes ensaios clÍnicos.

1.7. Preparo da amostra

Fluidos biológicos não devem ser injetados diretamente nas colunas analíticas comuns de LC em virtude das proteínas presentes nas matrizes biológicas, que causam o entupimento e perda de eficiência das mesmas, por sua adsorção acumulativa no suporte. Para evitar a rápida deterioração da coluna analítica, é necessário realizar um pré-tratamento da amostra antes de sua injeção no sistema cromatográfico; este pré-tratamento visa obter os analitos livres da presença de proteínas e da interferência dos compostos endógenos presentes na matriz biológica (HAGESTAM; PINKERTON, 1995; STEVENSON, 1995).

A determinação de fármacos em amostras biológicas, principalmente no plasma de pacientes, coletadas com base no contexto clínico e nos princípios da farmacocinética, tem sido um procedimento usual na área clínica, para assegurar a eficácia terapêutica e minimizar os efeitos adversos (sintomas de toxicidade) dos fármacos prescritos (QUEIROZ; LANÇAS, 2005).

A etapa de preparo de amostra é uma das etapas envolvidas no procedimento analítico. Essa etapa é de extrema importância porque visa isolar o analito da matriz, realizar uma limpeza de interferentes e, quando possível, pré-concentrar o composto de interesse. Devido à importância da análise química, o tempo gasto na etapa de preparo de amostra em um procedimento analítico torna-se cada vez maior (CHEN; QIU, 2008).

A etapa de preparação de amostra é geralmente o passo limitante de todo o processo analítico, podendo envolver em média até cerca de dois terços do tempo total dispendido (ALMEIDA et al., 2004). Esta etapa abrange, fundamentalmente, a extração e concentração dos analitos a partir da matriz biológica, permitindo não só alcançar menores limites de detecção, mas também a limpeza dos extratos, ou até mesmo a derivatização dos analitos, dependendo das suas características. A escolha do modo de preparação de amostras depende principalmente da natureza dos analitos (ex. volatilidade ou polaridade), da natureza da matriz e dos níveis de concentração que se pretendem detectar. Neste sentido, a preparação das amostras é um processo de vital importância, dele dependendo o sucesso da análise cromatográfica, pelo que as técnicas utilizadas assumem extrema relevância (ALMEIDA et al., 2004).

As técnicas de extração e/ou pré-concentração permitem que a análise dos componentes de interesse se torne possível. A meta final é a obtenção de uma subfração da amostra original enriquecida com as substâncias de interesse analítico, de forma que se obtenha uma separação cromatográfica livre de interferentes, com detecção adequada e um tempo razoável de análise (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). Convencionalmente, as técnicas de preparo de amostra

utilizando precipitação de proteínas, extração líquido-líquido e extração em fase sólida são as mais utilizadas em bioanálise (CHAVES et al., 2015; KOLE et al., 2011; NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009^a). A eficiência de extração (recuperação) é avaliada a partir das características de cada analito em questão, como seu pKa, coeficiente de partição e estabilidade no meio de extração (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Precipitação proteica: A precipitação proteica é uma técnica de preparo de amostra bastante utilizada visto que é uma técnica simples, rápida, de fácil manipulação e de baixo custo (MAJORS, 2014). Essa técnica se baseia na desnaturação das proteínas pelos agentes precipitantes que alteram suas estruturas secundárias e terciárias devido à quebra de interação intramoleculares fazendo com que a proteína exponha grupos hidrofóbicos e conseqüentemente se enovele e precipite (RAJALINGAM et al., 2009). As etapas envolvidas na precipitação são: adição de solvente, agitação, centrifugação e remoção do sobrenadante.

Extração líquido-líquido: Nessa técnica, em geral, uma das fases possui caráter aquoso (amostra de fluído biológico) e a outra fase caráter orgânico e imiscível (solvente orgânico). Os compostos que estão na fase aquosa quando em contato com a fase orgânica irão se distribuir, entre as fases, segundo seus coeficientes de partição e, após a agitação, migrar para a fase extratora. Para que ocorra a extração é importante que a fase orgânica seja imiscível na amostra e ainda solubilize bem os analitos de interesse, tornando assim a fase orgânica um melhor acceptor (MAJORS, 2014; BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015). Para alguns sistemas, o valor da constante de distribuição, K_D , entre as fases pode ser aumentado pelo ajuste do pH, para prevenir a ionização de ácidos ou bases, pela formação de par iônico com solutos ionizáveis, pela formação de complexos lipofílicos com íons metálicos ou pela adição de sais neutros, para diminuir a solubilidade de compostos orgânicos na fase aquosa (SNYDER; KIRKLAND, 1997).

Extração em fase sólida: A extração em fase sólida (SPE) é um método poderoso para preparação de amostras e é atualmente usado para a maioria dos estudos usando cromatografia. Possui capacidades em uma ampla gama de aplicações, como análises ambientais, análises farmacêuticas e bioquímicas, química orgânica e análises de alimentos. As vantagens da SPE em comparação com a extração líquido-líquido clássica são o baixo consumo de solvente, a enorme economia de tempo e o potencial de automação. Além disso, uma tarefa de preparo de amostras pode ser resolvida mais especificamente usando SPE, uma vez que são possíveis interações diferentes do analito com a fase sólida (adsorvente), e os métodos podem ser otimizados ajustando as condições cromatográficas. A SPE oferece uma infinidade de

adsorventes para interações polares, hidrofóbicas e/ou iônicas, enquanto a extração líquido-líquido é limitada aos equilíbrios de partição na fase líquida (MACHEREY-NAGEL, 2019). O método de SPE, embora mais limpo e efetivo, possui alto custo.

1.8. Validação de Métodos Bioanalíticos

A validação de métodos analíticos e bioanalíticos é um processo dinâmico e constante que inicia nas fases de seleção, desenvolvimento e otimização das metodologias, qualificação dos instrumentos, materiais e pessoal. Um processo de validação bem definido e documentado fornece evidências objetivas de que o sistema e o método atendem às exigências das aplicações analíticas, sendo adequado para o uso pretendido. Os parâmetros fundamentais avaliados na validação de um método analítico são: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação. No caso de métodos bioanalíticos, devem-se incluir também parâmetros de efeito de matriz, recuperação e estabilidade do fármaco na matriz biológica (ICH, 1996; CAUSON, 1997; SHAH et al. 2000; FDA, 2001).

Os parâmetros que devem ser avaliados, conforme RDC nº 27/2012, na validação bioanalítica são: seletividade, efeito residual, efeito matriz, curva de calibração, precisão, exatidão e estabilidade. A interferência de metabólitos, fármacos de uso concomitante, produtos de degradação formados durante o preparo da amostra, nicotina, cafeína e outros possíveis interferentes deve ser avaliado sempre que necessário (BRASIL, 2012).

A adoção da Política Nacional de Medicamentos Genérico pelo Governo Federal (Lei nº 9.787, de 10 de fevereiro de 1999) envolve a produção de medicamentos de melhor qualidade, mais seguros e eficazes, comprovados mediante realização de testes de equivalência farmacêutica e bioequivalência contribuindo para aumento do acesso aos medicamentos e fortalecendo a indústria nacional através do desenvolvimento tecnológico. Para isso, são necessários o desenvolvimento e validação de metodologias analíticas capazes de quantificar o fármaco em fluidos biológicos (BRASIL, 1999).

1.8.1. Padrão Interno

O padrão interno (PI) é uma substância química proveniente de uma solução padrão de concentração fixa, adicionada em uma mesma quantidade aos padrões de calibração, amostras de controle de qualidade e amostras de estudo (BRASIL, 2012).

A substância utilizada como PI idealmente deve possuir um tempo de retenção próximo ao do analito, não reagir com o analito, não fazer parte da amostra e ficar separada dos componentes da matriz (RIBANI et al. 2004).

Para que a resposta do PI não interfira na resposta do analito, sua escolha deve considerar o tipo de detector acoplado ao sistema cromatográfico, e, caso o sistema de detecção não seja seletivo para essas moléculas, a etapa cromatográfica deve ser capaz de separá-las. Como os sistemas cromatográficos acoplados a detectores de massas sequencial (LC-MS/MS) são seletivos para moléculas com diferentes pesos moleculares, nessas técnicas pode-se utilizar um PI que coelua com o analito, desde que possua massa diferente deste, podendo ser o próprio analito marcado por isótopo. O padrão deuterado é uma molécula de estrutura idêntica a do analito que contém um ou mais hidrogênios substituídos por hidrogênios de peso 2 (deutério). É vantagem desse tipo de padrão a apresentação de propriedades físico-químicas extremamente semelhantes às do analito e ainda a diferenciação em relação a ele no detector MS (VIEIRA; REDIGUIERI; REDIGUIERI, 2013).

1.8.2. Limite Inferior de Quantificação (LIQ) e Limite de Detecção (LD)

O LIQ corresponde à concentração mínima que o método é capaz de mensurar. Para os métodos cromatográficos considera-se o LIQ como a menor concentração na qual se obtém relação sinal/ruído superior a 10. No caso do LD, a menor concentração na qual a relação sinal/ruído é superior a 3 (BRASIL, 2012).

1.8.3. Amostras de Controle de Qualidade

Os ensaios de validação são realizados através da análise de amostras de controle de qualidade. Consistem em amostras de matriz na qual é adicionada uma concentração específica da substância a ser analisada e padrão interno. Ao longo dos ensaios de validação são utilizadas 6 concentrações de controle de qualidade de acordo com a legislação e estes são descritos a seguir (BRASIL, 2012).

- 1- O Limite inferior de quantificação (LIQ) corresponde à concentração mínima que o método é capaz de mensurar. Para os métodos cromatográficos considera-se o LIQ como a menor concentração na qual se obtém relação sinal/ruído superior a 10. No caso do LD, a menor concentração na qual a relação sinal/ruído é superior a 3.

- 2- O Limite superior de quantificação (LSC) é a maior concentração na curva de calibração do método.
- 3- O Controle de qualidade baixo (CQB) é preparado com concentração equivalente a até 3 vezes o LIQ.
- 4- O Controle de qualidade médio (CQM) é composto da matriz adicionada do analito em uma concentração próxima entre a média dos limites superior e inferior de quantificação do método.
- 5- O Controle de qualidade alto (CQA) é preparado com concentração entre 75 e 85% do Limite Superior de Quantificação (LSQ) do método.
- 6- O Controle de qualidade de diluição (CQD) é uma amostra adicionada com analito acima da concentração do LSQ, analisada por procedimento pré-estabelecido de diluição.

1.9. Validação pré-estudo

Na fase de pré-estudo, o procedimento de validação consiste em mensurar um conjunto de amostras para o qual os valores nominais sejam conhecidos e organizados de acordo com um desenho de experimento ideal. O desenho deverá permitir que sejam mensurados a Veracidade e a Precisão nos diferentes valores nominais e, se necessário, prover uma decomposição da precisão global nos seus diversos componentes de variâncias (repetibilidade, entre-ensaios e entre-laboratórios) (BOULANGER et al., 2007).

É de primordial importância ter definições claras dos parâmetros de validação diferentes para avaliar a validade deste. Também é necessário ter metodologias de acordo com essas definições e, conseqüentemente, utilizar métodos estatísticos que sejam relevantes com essas definições, com o objetivo da validação e com o objetivo do método analítico (POSSAS et al., 2012). As condições de análises selecionadas foram: (a) seletividade; (b) efeito residual; (c) efeito matriz; (d) curva de calibração; (e) precisão; (f) exatidão; (g) validação de fármacos de uso concomitante; (h) estabilidade.

(a) Seletividade

A seletividade de um método bioanalítico é um importante parâmetro a ser avaliado para garantir que a quantificação do analito de interesse não seja afetada pela presença de

metabólitos, produtos de degradação, fármacos co-administrados ou compostos endógenos (LANG; BOLTON, 1991).

A seletividade é a capacidade do método de diferenciar e quantificar o analito e o PI na presença de outros componentes da amostra. Para o ensaio de seletividade é necessário comparar a matriz biológica de diferentes fontes para investigar interferentes que possam afetar a seletividade do método. Conforme a aplicação do método deve-se testar também amostras lipêmicas (com alto teor de lipídeos) e hemolisadas (contendo hemácias lisadas) (BRASIL 2010, U.S, 2013),

Aplica-se no ensaio de seletividade testes em que o analito na concentração do limite inferior de quantificação (LIQ) e o PI são mensurados e seu perfil cromatográfico é comparado aos perfis das diferentes matrizes biológicas. As respostas de picos interferentes próximo ao tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% (vinte por cento) da resposta do analito nas amostras do LIQ. Da mesma forma a resposta dos interferentes próximos ao tempo de retenção do PI devem ser inferiores a 5%. Caso estes resultados não possam ser obtidos deve-se alterar o método de forma a garantir a seletividade e testar novamente com novas amostras de fontes distintas (BRASIL, 2012).

(b) Efeito Residual

O efeito residual, ou carryover, é o efeito gerado por aparecimento ou aumento do sinal do analito ou PI proveniente de contaminação de amostras anteriores. Para que o efeito residual seja testado é necessário que sejam injetadas consecutivamente, uma amostra em branco, uma amostra contendo o analito na concentração do LSQ e o PI, e depois mais duas amostras em branco (BRASIL, 2012). Para fins de validação compara-se o perfil cromatográfico antes e depois da passagem do analito e PI. As respostas no tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta do analito em LIQ e inferiores a 5% da resposta do PI (BRASIL, 2012).

(c) Efeito Matriz

A investigação do efeito de matriz durante a quantificação de compostos endógenos ou exógenos e/ou seus metabólitos é um importante parâmetro a ser avaliado durante o desenvolvimento e validação de um método bioanalítico. Este efeito ocorre quando substâncias inerentes à matriz biológica coeluem com os compostos de interesse, sendo alvo de especulação

em métodos bioanalíticos convencionais, tais como: LC-fluorescência, LC-ultra violeta, LC-eletroquímica e em LC-MS/MS (MATUSZEWSK; CONSTANZER; CHAVEZ-ENG, 2003). Este último, em virtude da elevada seletividade e especificidade quando na presença de matrizes biológicas, apresenta-se propenso a erros, uma vez que a presença de substâncias não monitoradas e que coeluem da matriz podem afetar a detecção dos analitos comprometendo a eficiência de ionização dos mesmos, caracterizando assim o efeito de matriz. Este fenômeno foi primeiramente descrito por Tang; Kebarle, 1991 que mostraram que a resposta para bases orgânicas em uma determinada matriz, utilizando a fonte de ionização electrospray, diminuiu à medida que a concentração de outras bases orgânicas foi aumentada. O mecanismo exato do efeito de matriz é desconhecido, mas, provavelmente, é originado da competição entre um analito e a coeluição de um componente da matriz não monitorado (TAYLOR, 2005).

O uso de LC-MS/MS para determinação ou quantificação de fármacos em fluidos biológicos é uma estratégia na obtenção de um método de análise com alta seletividade e sensibilidade (SENNBRO et al., 2011).

O efeito causado por componentes da matriz biológica na resposta do analito ou PI é denominado efeito matriz, e é necessário realizar um ensaio específico para sua avaliação. São comparadas amostras em concentração de quantificação baixa (CQB) e concentração de quantificação alta (CQA), em solução e em matriz biológica normal, lipêmica e hemolisada. Para cada amostra deve ser obtido o fator de matriz normalizado por PI (FMN) (BRASIL, 2012).

O coeficiente de variação (CV) dos FMN deve ser inferior a 15%. O FMN é dado pela seguinte equação 1:

$$\text{FMN} = \frac{(\text{Resposta do Analito em matriz/Resposta do PI em matriz})}{(\text{Resposta do Analito em solução/Resposta do PI em solução})}$$

Em casos em que os CV% dos FMN sejam superiores a 15% devido ao resultado de amostras hemolisadas, calcula-se um novo coeficiente de variação após exclusão das amostras hemolisadas, as quais não poderão ser analisadas por este método (BRASIL, 2012).

(d) Curva de Calibração

A curva de calibração é a relação dada entre a resposta do instrumento analítico e a concentração conhecida do analito. Para obter a curva de concentração é necessário utilizar a mesma matriz proposta para o estudo e adicionar a esta o analito e o padrão interno. A matriz fortificada com diferentes concentrações do analito e concentração constante de PI passa por todo o processo de preparação ao qual a amostra deve ser submetida (BRASIL, 2012).

As respostas do instrumento são relacionadas através de modelo matemático, preferencialmente o modelo linear (linearidade). Segundo a legislação, a curva deve contar com no mínimo 6 amostras de diferentes concentrações. Aprova-se uma variação de no máximo 20% em relação a concentração nominal para padrões de LIQ e 15% para as outras concentrações. No mínimo 75% dos padrões de calibração devem ser aprovados por estes critérios e no mínimo 6 padrões de concentrações diferentes devem ser aprovados incluindo LIQ e LSQ. O coeficiente de correlação linear r^2 da curva deve ser igual ou superior a 0,98 (BRASIL, 2012).

(e) Precisão

A precisão denota a proximidade entre os resultados obtidos por repetidas aferições de múltiplas alíquotas de uma única fonte, relata a dispersão dos resultados obtidos. Para validar um método bioanalítico é necessário determinar a precisão em uma mesma corrida (intracorrída) e a precisão entre 3 corridas diferentes realizadas em dias distintos (intercorrída). Segundo a norma, em cada corrida são analisadas 5 replicatas nas concentrações de LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD. A precisão é expressa como desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (CV%), o qual não deve ser superior a 20% para o LIQ e 15% para as demais concentrações (BRASIL, 2012).

O CV (%) é obtido pela seguinte equação 2:

$$CV = \frac{\text{Desvio Padrão} \times 100}{\text{Concentração média experimental}}$$

(f) Exatidão

A exatidão se refere à proximidade dos resultados obtidos pela análise em relação ao valor de referência esperado. O ensaio para validar a exatidão do método exige que sejam realizadas pelo menos 3 corridas em dias distintos, com pelo menos 5 replicatas de pelo menos 5 concentrações: LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD. A exatidão deve ser avaliada em uma mesma corrida com uma mesma curva de calibração (intracorrída) e em 3 corridas cada uma comparada a uma curva de calibração diferente e soluções novas preparadas (intercorrídas) (BRASIL, 2012).

A medida da exatidão é expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR%), o qual não deve ser superior a 15% em relação à concentração nominal, exceto às amostras de LIQ, na qual o EPR% não deve ser superior a 20% da concentração nominal (BRASIL, 2012).

O EPR% é obtido pela seguinte equação 3:

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

(g) Validação de análise de fármacos de uso concomitante

A análise de fármacos de uso concomitante tem como objetivo avaliar a interferência de fármacos que podem ser usados durante a etapa clínica de estudos do analito.

(h) Estabilidade

A estabilidade refere-se à manutenção da concentração do analito dentro de limites estabelecidos, sob condições específicas. Relaciona-se com a possível degradação do analito nas condições de ensaio. Para os estudos de estabilidade são empregadas no mínimo três amostras nas concentrações de CQB e CQA e adicionadas de PI. Admitem-se variações de até 15% da média das concentrações obtidas em relação ao valor nominal. A estabilidade é definida em diferentes condições: estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, estabilidade do analito em curta duração, longa duração e estabilidade pós-processamento (BRASIL, 2012).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver e validar três métodos bioanalíticos por LC-MS/MS que atendam aos critérios estabelecidos pela RDC nº 27, de 17 de maio de 2012 da ANVISA e que possam ser aplicadas à determinação de ácido ursodesoxicólico, ácido glicoursodesoxicólico e ácido tauroursodesoxicólico em plasma humano.

2.2. Objetivos específicos

- . Desenvolver metodologia de extração dos analitos em plasma;
- . Desenvolver métodos LC-MS/MS para detecção dos ácidos ursodesoxicólico, glicoursodesoxicólico e tauroursodesoxicólico;
- . Realizar o processo de validação do método proposto, contemplando: seletividade, efeito residual, efeito matriz, linearidade, precisão, exatidão, estabilidade e avaliação da interferência de fármacos de uso concomitante nas respostas do analito em plasma humano.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi realizado visando o desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos por LC-MS/MS, seguindo as recomendações da RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Os experimentos foram realizados na Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia (UNIFAG).

3.1. Materiais

Equipamentos e Materiais

Para o desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos dos ácidos ursodesoxicólico, tauroursodesoxicólico e glicoursodesoxicólico foram utilizados diferentes tipos de equipamentos e materiais. Os equipamentos e materiais utilizados e os componentes do sistema LC-MS/MS estão descritos nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

TABELA 1. Descrição de equipamentos e materiais.

Descrição	Fabricante / País de Origem
Pipetas de volume variável	Gilson / França
Ponteiras de pipeta descartáveis	Scientific Specialties Inc. / USA
Mesa agitadora (Finemixer)	Fine PCR / Coréia
Misturador (vortex)	Phoenix / USA
Balança Analítica	Sartorius / Alemanha

TABELA 2. Componentes do CLAE-MS/MS.

Descrição	Fabricante / Modelo
Espectrômetro de Massas	Waters / Quattro Micro™ API
Software	Waters / MassLynx 4.1
Bomba Analítica	Shimadzu / LC 20AD
Autoinjetor	Shimadzu / SIL 20A
Controladora	Shimadzu / SCL 10A VP
Degaseificador	Shimadzu / DGU 20A ₃

Padrões Analíticos

Os padrões utilizados no desenvolvimento e validação dos métodos bioanalíticos do ácido ursodesoxicólico, ácido tauroursodesoxicólico e ácido glicoursodesoxicólico foram padrões primários com certificados rastreáveis, conforme Tabela 3.

TABELA 3. Padrões utilizados no desenvolvimento e validação da metodologia analítica.

Descrição	Finalidade
Ursodiol (ácido ursodesoxicólico)	Analito
Ácido ursodesoxicólico D4	Padrão Interno
Ácido tauroursodesoxicólico	Analito
Ácido tauroursodesoxicólico D4 sódico	Padrão Interno
Ácido glicoursodesoxicólico	Analito
Ácido glicoursodesoxicólico D4	Padrão Interno

Reagentes e Solventes

Em todos os testes para o desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos foram utilizados reagentes e solventes de grau analítico conforme a Tabela 4.

TABELA 4. Reagentes e solventes utilizados para o UDCA, GUDCA e TUDCA.

Descrição	Finalidade	UDCA	GUDCA	TUDCA
Metanol	Preparo das soluções de ácido ursodesoxicólico, ácido ursodesoxicólico D4, dimenidrinato, paracetamol, cafeína e piridoxina e lavagem da agulha.	X	X	X
Água (Milli – Q)	Preparo das soluções de 4-MAA, escopolamina e metoclopramida, preparo da fase móvel e lavagem da agulha e preparo das amostras (extração).	X	X	X
Acetonitrila	Preparo da fase móvel e preparo das amostras (extração).	X	X	X
Acetato de amônio	Preparo da fase móvel e preparo das amostras (extração).	X	X	X
Ácido Clorídrico	Preparo das amostras (extração).	X	X	
Éter dietílico	Preparo das amostras (extração).	X	X	
Diclorometano	Preparo das amostras (extração).	X	X	
Acetato de etila	Preparo das amostras (extração).			X

Material Biológico

Conforme parecer do CEP (Comitê de Ética em Pesquisa) de número 2.969.992, presente no Anexo 1, para a validação do UDCA, foi coletado plasma humano de diferentes indivíduos (N=31), sendo 8 do sexo masculino e 23 do sexo feminino, na faixa etária de 18 a 50 anos.

Conforme parecer do CEP (Comitê de Ética em Pesquisa) de número 2.969.992, presente no Anexo 1, para validação do GUDCA foram utilizados lotes de 20 indivíduos, sendo 11 do sexo masculino e 9 do sexo feminino, na faixa etária de 18 a 50 anos.

Conforme parecer do CEP (Comitê de Ética em Pesquisa) de número 2.969.992, presente no Anexo 1, para validação do TUDCA foram utilizados lotes de 23 indivíduos, sendo 13 do sexo masculino e 10 do sexo feminino, na faixa etária de 18 a 50 anos.

As condições do plasma utilizado no preparo da matriz para construção das curvas de calibração e controles de qualidade foram plasma humano normal. Na seletividade foi avaliado plasma lipêmico e hemolisado para verificação da aplicação do método para esse tipo de amostra.

3.2. Métodos

3.2.1. Preparo da Fase Móvel do UDCA, GUDCA e TUDCA

A fase móvel utilizada nas análises do UDCA foi composta de MeCN:NH₄Ac 30 mM, (42:58, v/v), com pH ajustado para 7,0, filtrada e degaseificada.

A fase móvel utilizada nas análise do GUDCA foi composta de MeCN:NH₄Ac 10 Mm:NH₄OH, (57:43:0,5, v/v/v), com pH ajustado para 9,0, filtrada e degaseificada.

A fase móvel utilizada nas análises do TUDCA foi MeCN:NH₄Ac 10 mM, (40:60, v/v), com pH ajustado para 7,0, filtrada e degaseificada.

3.2.2. Preparo das soluções padrão

Solução padrão do UDCA, analito e padrão interno

Analito: Foi pesada uma massa correspondente a 0,00520 g de ursodiol (99,7% de teor) colocada em um balão volumétrico (10,0 mL) e preparada em metanol para a obtenção de uma solução de concentração 518,4 µg mL⁻¹ de ursodiol. A partir desta solução foi feita uma diluição na concentração de 500,0 µg mL⁻¹.

Padrão interno: Foi pesada uma massa correspondente a 0,00225 g de UDCA D4 (99,5% de teor), colocada em um balão volumétrico (10,0 mL) e preparada em metanol para a obtenção de uma solução de concentração de 223,9 µg mL⁻¹ de UDCA D4. A partir desta solução foram feitas diluições nas concentrações de 200,0 µg/mL e 9,0 µg mL⁻¹.

Solução padrão de TUDCA, analito e padrão interno

Analito: Foi pesada uma massa correspondente a 0,00126 g de TUDCA (99,5% de teor), colocada em um balão volumétrico (10,0 mL) e preparada em metanol para a obtenção de uma solução de concentração 125,4 µg mL⁻¹ de TUDCA. A partir desta solução foi feita uma diluição na concentração de 100,0 µg mL⁻¹.

Padrão interno: Foi pesada uma massa correspondente a 0,00109 g de TUDCA D4 sódico (99,86% de teor) foi cuidadosamente pesada, colocada em um balão volumétrico (10,0 mL) e preparada em metanol para a obtenção de uma solução de concentração de 104,1 µg mL⁻¹ de TUDCA D4 (base livre). A partir desta solução foram feitas diluições nas concentrações de 100,0 µg mL⁻¹ (100 000,0 ng mL⁻¹) e 2,0 µg mL⁻¹ (2000,0 ng mL⁻¹).

Solução padrão de GUDCA, analito e padrão interno

Analito: Foi pesada uma massa correspondente a 0,00280 g de GUDCA (100% de teor), colocada em um balão volumétrico (5,0 mL) e preparada em metanol para a obtenção de uma solução de concentração 560,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de GUDCA. A partir desta solução foi feita uma diluição na concentração de 500,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (500 000, ng mL^{-1}).

Padrão interno: Foi pesada ma massa correspondente a 0,00133 g de GUDCA D4 (99,06% de teor), colocada em um balão volumétrico (10,0 mL) e preparada em metanol para a obtenção de uma solução de concentração de 131,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de GUDCA D4. A partir desta solução foram feitas diluições nas concentrações de 100,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (100 000,0 ng mL^{-1}) e 3,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (3000,0 ng mL^{-1}).

3.2.3. Processo de extração das amostras na matriz biológica

Preparo das amostras do UDCA (extração líquido-líquido)

As amostras de UDCA foram preparadas por extração líquido-líquido através da agitação de 450 μL de plasma com 50 μL de solução de UDCA D4 9000,0 ng mL^{-1} (diluído em MeOH), 50 μL de solução de HCl 1M e 1250 μL de éter dietílico/diclorometano (70:30 v/v) por 5 minutos e em seguida, centrifugado por 10 minutos (13200 rpm, 4°C). Foram transferidos 850 μL do sobrenadante para outro microtubo e reservado. Foi adicionado 1250 μL de éter dietílico/diclorometano (70:30 v/v) ao plasma remanescente, este foi agitado por 5 minutos e em seguida, centrifugado por 10 minutos (13200 rpm, 4°C). Foram transferidos 850 μL do sobrenadante ao microtubo reservado e este foi seco sob fluxo de nitrogênio e ressuspendido em 150 μL de MeCN/ NH_4Ac 10 mM/ NH_4OH (70:30:0,1 v/v/v), agitado por 2 minutos e então injetado 30 μL para análise.

Preparo das amostras do GUDCA (extração líquido-líquido)

As amostras de GUDCA foram preparadas de forma similar ao UDCA, também por extração líquido-líquido, através da agitação de 300 μL de plasma com 50 μL de solução de GUDCA D4 3000 ng mL^{-1} ,0 (MeOH) e 50 μL de solução de HCl 1M por 1 minuto em mesa agitadora. Após, foi adicionado a mistura 1250 μL de éter dietílico/diclorometano (70:30, v/v) e foi agitado novamente por 5 minutos em mesa agitadora e em seguida, centrifugado por 10 minutos (13200 rpm, 4°C). Foi transferido 900 μL do sobrenadante para outro microtubo, este foi seco sob

fluxo de nitrogênio e ressuspenso em 150 µL de MeCN/NH₄Ac 10 mM/NH₄OH (70:30:0,1 v/v/v), agitado por 2 minutos e então injetado 15 µL para análise.

Preparos das amostras de TUDCA (extração por precipitação)

As amostras de TUDCA foram preparadas por extração de desproteinização (precipitação) através da agitação de 400 µL de plasma com 50 µL sol. TUDCA D₄ 2000,0 ng mL⁻¹ (MeCN) e 1250 µL de Acetato de Etila 100% por 3 minutos e em seguida, centrifugado por 5 minutos (13200 rpm, 4°C). As amostras foram congeladas por 10 minutos em freezer -70 °C, o sobrenadante foi descartado e após o total descongelamento do remanescente, foi adicionado 600 µL de MeCN 100%. A mistura foi agitada por 5 minutos e centrifugada por 10 minutos (13200 rpm, 4°C). Foi transferido 500 µL do sobrenadante para outro microtubo, adicionou-se 150 µL de H₂O Milli-Q, agitou-se por 2 minutos e então injetado 20 µL para análise.

3.2.4. Preparo dos padrões da curva de calibração e das amostras controle de qualidade

A curva de calibração foi construída incluindo a análise de uma amostra branco (matriz biológica isenta de padrão do fármaco e do padrão interno), uma amostra zero (matriz biológica com adição de padrão interno) e de amostras contendo padrão do fármaco e padrão interno contemplando a faixa prevista de concentrações analisadas. Os padrões da curva de calibração foram preparados adicionando-se o analito a ser analisado ao plasma humano.

Os controles de qualidade (CQ) têm 2 objetivos distintos: Os definidos por LIQ são utilizados para determinar o Limite Inferior de Quantificação (LIQ) do método analítico. Os controles de qualidade baixo (CQB), controles de qualidade médio (CQM), os controles de qualidade alto (CQA) e os controles de qualidade de diluição (CQD) foram utilizados para monitorar a precisão e exatidão do método de quantificação durante os ensaios.

3.2.5. Preparo da curva de calibração do ácido ursodesoxicólico, ácido glicoursodesoxicólico e ácido tauroursodesoxicólico

Os padrões da curva de calibração foram preparados adicionando-se o analito a ser analisado ao plasma humano. Foram preparadas soluções dos ácidos ursodesoxicólico (50000,0 ng mL⁻¹), glicoursodesoxicólico (50000,0 ng mL⁻¹) e tauroursodesoxicólico (5000,0 ng mL⁻¹) em

plasma branco. A partir dessas soluções realizaram-se as diluições obtendo soluções dos padrões de calibração (Tabela 5).

TABELA 5. Padrões da curva de calibração do UDCA, GUDCA e TUDCA.

Nível	Amostra	Concentração Nominal (ng mL ⁻¹)		
		UDCA	GUDCA	TUDCA
B	Branco	0	0	0
Z	Zero	0	0	0
1	Ponto da Curva	15	15	5
2	Ponto da Curva	50	50	10
3	Ponto da Curva	100	100	20
4	Ponto da Curva	1000	1000	50
5	Ponto da Curva	2000	2000	100
6	Ponto da Curva	4000	4000	200
7	Ponto da Curva	6000	6000	300
8	Ponto da Curva	10000	10000	500

3.2.6. Preparo dos controles de qualidade do UDCA, GUDCA e TUDCA

Todas as amostras dos controles de qualidade foram preparadas adicionando-se o analito a ser analisado ao plasma humano. Foram preparadas soluções dos ácidos ursodesoxicólico (50000,0 ng mL⁻¹), glicoursodesoxicólico (50000,0 ng mL⁻¹) e tauroursodesoxicólico (5000,0 ng mL⁻¹) em plasma branco. A partir dessas soluções realizaram-se as diluições obtendo as soluções dos padrões de calibração, conforme Tabela 6.

TABELA 6. Amostras de Controle de Qualidade do UDCA, GUDCA e TUDCA.

Tipo do CQ	Identificação do CQ	Definição de faixa	Valor definido UDCA e GUDCA (ng mL ⁻¹)	Valor definido TUDCA (ng mL ⁻¹)
CQ LIQ	LIQ	Mesma concentração do LIQ	15	5
CQ Baixo	CQB	Menor ou igual 3 x LIQ	45	15
CQ Médio	CQM	Aproximadamente a média entre LIQ e LSC	5000	250
CQ Alto	CQA	75-85% do LSC	8000	400
CQ Diluição	CQD	LSC acrescido de 70% ($f_d=4$)	4250	212,5

3.2.7. Condições cromatográfica e de detecção no espectrômetro de massas sequencial

UDCA e UDCA D4

Parâmetros Cromatográficos

As análises cromatográficas foram realizadas usando uma coluna analítica Phenomenex (5 μ C18 - 100A 250 x 4,6 mm) à temperatura ambiente. O fluxo no HPLC foi programado para operar com 0,450 mL min⁻¹, um volume de injeção de 30 μ L e o tempo total de corrida foi ajustado para 6,50 minutos. As análises foram realizadas com auto-injetor à temperatura ambiente. O tempo de retenção para o UDCA foi de 3,47 minutos e do UDCA D4 foi de 3,42 minutos.

Parâmetros de Detecção no Espectrômetro de Massas Sequencial

Na Tabela 7 são demonstrados os parâmetros do equipamento utilizados para a detecção do UDCA e UDCA D4.

TABELA 7. Condições de detecção UDCA.

MRM	UDCA: 391,30 > 373,41 UDCA D4: 395,42 > 377,15
Ionização	ES -
Temperatura da fonte	105 °C
Temperatura de dessolvatação	450 °C
Fluxo dos gases do cone	Nulo
Fluxo dos gases de dessolvatação	750 L/h
Capilar	3,00 KV
Cone	UDCA: 40,0 V UDCA D4: 40,0 V
Energia de colisão	UDCA: 30,0 V UDCA D4: 30,0 V
Pressão de Argônio	2,96e ⁻³ mbar

TUDCA e TUDCA D4**Parâmetros Cromatográficos**

As análises cromatográficas foram realizadas usando uma coluna analítica Phenomenex Luna (5 µ C18 – 100A 250 x 4,6 mm) à temperatura ambiente. O fluxo de LC foi programado para operar com 0,200 mL min⁻¹ um volume de injeção de 20 µL e o tempo total de corrida foi ajustado para 8,00 minutos. As análises foram realizadas com autoinjeter à temperatura ambiente. O tempo de retenção para o TUDCA foi de 3,19 minutos e do TUDCA D4 foi de 3,18 minutos.

Parâmetros de Detecção no Espectrômetro de Massas Sequencial

Na Tabela 8 são demonstrados os parâmetros do equipamento utilizados para a detecção do TUDCA e TUDCA D4.

TABELA 8. Condições de detecção TUDCA.

MRM	TUDCA: 498,00 > 79,63 TUDCA D4: 502,44 > 79,54
Ionização	ES -
Temperatura da fonte	105 °C
Temperatura de dessolvatação	450 °C
Fluxo dos gases do cone	Nulo
Fluxo dos gases de dessolvatação	600 L/h
Capilar	3,00 KV
Cone	TUDCA:65,0 V TUDCA D4: 65,0 V
Energia de colisão	TUDCA: 65,0 V TUDCA D4: 65,0 V
Pressão de Argônio	2,99e ⁻³ mbar

GUDCA e GUDCA D4**Parâmetros Cromatográficos**

As análises cromatográficas foram realizadas usando uma coluna analítica Phenomenex (5 μ C18 – 100A 250 x 4,6 mm) à temperatura ambiente. O fluxo no Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência foi programado para operar com 0,700 mL min⁻¹ um volume de injeção de 15 μ L e o tempo total de corrida foi ajustado para 5,00 minutos. As análises foram realizadas com autoinjeter à temperatura ambiente. O tempo de retenção para o GUDCA foi de 3,34 minutos e do GUDCA D4 foi de 3,34 minutos.

Parâmetros de Detecção no Espectrômetro de Massas Sequencial

Na Tabela 9 são demonstrados os parâmetros do equipamento utilizados para a detecção do GUDCA e GUDCA D4.

TABELA 9. Condições de detecção GUDCA.

MRM	GUDCA: 448,46 > 73,70 GUDCA D4: 451,92 > 73,70
Ionização	ES -
Temperatura da fonte	105 °C
Temperatura de dessolvatação	450 °C
Fluxo dos gases do cone	Nulo
Fluxo dos gases de dessolvatação	700 L/h
Capilar	3,00 KV
Cone	GUDCA: 25,0 V GUDCA D4: 25,0 V
Energia de colisão	GUDCA: 35,0 V GUDCA D4: 35,0 V
Pressão de Argônio	3,03 e ⁻³ mbar

3.2.8. Validação dos métodos bioanalíticos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado à espectrometria de massas sequencial

Para a realização destes testes foram utilizados padrões de referência com procedência identificável para o preparo das soluções.

3.2.8.1. Validação do método de análise do UDCA, GUDCA e TUDCA

Foram avaliados os mesmos parâmetros de validação de métodos bioanalíticos para os três analitos: UDCA, GUDCA e TUDCA.

3.2.8.2. Validação pré-estudo

Na realização destes testes foram utilizados padrões de referência com procedência rastreáveis para o preparo das soluções. Os padrões de referência utilizados nesta validação estavam todos dentro da vigência determinada pelo fabricante.

3.2.8.2.1. Seletividade

Para confirmar a seletividade do método, foram analisadas amostras branco de plasma humano obtidas de 6 indivíduos sendo 4 amostras normais, 1 lipêmica e 1 hemolisada.

3.2.8.2.2. Efeito Residual (*Carryover*)

Para avaliar se existe efeito residual (*carryover*), foram analisadas 3 injeções da mesma amostra branco, sendo 1 antes e 2 logo após a injeção de pelo menos uma amostra processada do limite superior de quantificação.

3.2.8.2.3. Efeito de Matriz

Para avaliar se existe efeito de matriz, foram analisadas amostras de 8 fontes distintas, sendo 4 normais, 2 lipêmicas e 2 hemolisadas, adicionando-se posteriormente analito e PI nas mesmas concentrações de CQB e CQA.

3.2.8.2.4. Curva de calibração

Para definir a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito, foi gerada para cada método uma curva de calibração com no mínimo 6 (seis) padrões contendo o fármaco e padrão interno. As concentrações dos padrões foram definidas em testes preliminares, incluindo a primeira quantificação de amostras, levando-se em consideração a sensibilidade do método e a faixa prevista das concentrações das amostras a serem determinadas.

3.2.8.2.4.1. Determinação do limite inferior de quantificação

O limite inferior de quantificação foi definido levando-se em consideração a sensibilidade, especificidade, precisão e exatidão do método analítico. Para avaliar a sensibilidade, precisão e exatidão do método, amostras de controle de qualidade do LIQ também foram incluídas no procedimento de validação.

3.2.8.2.4.2. Linearidade / Curva de calibração

A linearidade da curva de calibração foi avaliada dentro dos seguintes critérios:

- a) Desvio menor ou igual a 20% em relação a concentração nominal para o LIQ.

b) Desvio menor ou igual a $\pm 15\%$ em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração.

c) Desvio menor ou igual a 15% em relação a concentração nominal para o Limite Superior da Curva.

d) No mínimo 75% das concentrações da curva de calibração devem cumprir com os critérios acima descritos, incluindo o LIQ e o Limite Superior da Curva de calibração.

Os dados referentes as curvas de calibração do UDCA, TUDCA e GUDCA estão apresentados na Tabela 10.

TABELA 10. Dados referentes as curvas de calibração de cada analito.

Nível	Amostra	Concentração Nominal (ng mL ⁻¹)		
		Ác. Ursodesoxicólico	Ác. Glicoursodesoxicólico	Ác. Tauroursodesoxicólico
B	Branco	0	0	0
Z	Zero	0	0	0
1	Ponto da Curva	15	15	5
2	Ponto da Curva	50	50	10
3	Ponto da Curva	100	100	20
4	Ponto da Curva	1000	1000	50
5	Ponto da Curva	2000	2000	100
6	Ponto da Curva	4000	4000	200
7	Ponto da Curva	6000	6000	300
8	Ponto da Curva	10000	10000	500

3.2.8.2.5. Precisão e Exatidão

Para avaliar a precisão e exatidão do método, 5 concentrações distintas (LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD), na faixa esperada de concentrações foram analisadas, utilizando-se determinações por concentração. A precisão e exatidão foram determinadas em uma mesma corrida (intracorrída) e em corridas diferentes (intercorridas).

3.2.8.2.6. Determinação das concentrações dos controles de qualidade

Para a determinação das concentrações dos controles de qualidade usou-se as mesmas concentrações para o UDCA e GUDCA. As concentrações das amostras de controles de qualidade do UDCA e GUDCA e os critérios utilizados para a definição de tais concentrações estão apresentadas na Tabela 11.

TABELA 11. Definição dos controles de qualidade (CQ) de UDCA e GUDCA.

Tipo do CQ	Identificação do CQ	Definição de faixa	Valor definido (ng mL ⁻¹)
CQ LIQ	LIQ	Mesma concentração do LIQ	15
CQ Baixo	CQB	Menor ou igual 3 x LIQ	45
CQ Médio	CQM	Aproximadamente a média entre LIQ e LSC	5000
CQ Alto	CQA	75-85% do LSC	8000
CQ Diluição	CQD	LSC acrescido de 70% ($f_d=4$)	4250

As concentrações das amostras de controles de qualidade do TUDCA e os critérios utilizados para a definição de tais concentrações são apresentadas na Tabela 12.

TABELA 12. Definição dos controles de qualidade (CQ) de TUDCA.

Tipo do CQ	Identificação do CQ	Definição de faixa	Valor definido (ng mL ⁻¹)
CQ-LIQ	LIQ	Mesma concentração do LIQ	5
CQ Baixo	CQB	Menor ou igual 3 x LIQ	15
CQ Médio	CQM	Aproximadamente a média entre LIQ e LSC	250
CQ Alto	CQA	75-85% do LSC	400
CQ Diluição	CQD	LSC acrescido de 70% ($f_d=4$)	212,5

3.2.8.2.7. Validação intracorrida

A precisão e exatidão intracorrida foram determinadas utilizando-se um lote contendo as seguintes amostras:

- Uma curva de calibração contendo os padrões definidos anteriormente.

b) No mínimo 5 (cinco) réplicas de cada controle de qualidade definido acima.

Os seguintes critérios foram seguidos, para que a precisão e exatidão intracorrída fosse considerada aprovada:

a) Precisão: para os controles CQB, CQM, CQA e CQD o coeficiente de variação (CV %) não deveria exceder $\pm 15\%$ e para o LIQ não deve exceder $\pm 20\%$.

b) Exatidão: o valor da exatidão (expresso pelo Erro Padrão Relativo – EPR) para as amostras CQB, CQM, CQA e CQD deve estar dentro do desvio de $\pm 15\%$ do valor nominal e para o LIQ, admitiu-se valores dentro do desvio de $\pm 20\%$.

3.2.8.2.8. Validação intercorridas

Os seguintes critérios foram seguidos para considerar a precisão e exatidão intercorridas aprovadas:

a) Precisão: para os controles CQB, CQM, CQA e CQD o coeficiente de variação (CV) não deveria exceder $\pm 15\%$ e para o LIQ não deve exceder $\pm 20\%$.

b) Exatidão: o valor da exatidão (expresso pelo Erro Padrão Relativo – EPR) para as amostras CQB, CQM, CQA e CQD dentro do desvio de $\pm 15\%$ do valor nominal e para o LIQ, admitiu-se valores dentro do desvio de $\pm 20\%$.

3.2.8.2.9. Validação da reinjeção

Serão consideradas amostras reinjetadas, aquelas que forem quantificadas mais de uma vez.

A validação da reinjeção tem como objetivo avaliar a validade deste procedimento, quando necessário. A validação da reinjeção foi demonstrada através dos resultados obtidos de precisão e exatidão.

3.2.8.2.10. Validação de análise de fármacos de uso concomitante

Conforme a RDC 27/2012, em seu artigo sétimo, a interferência de metabólitos, fármacos de uso concomitante, produtos de degradação formados durante o preparo da amostra, nicotina,

cafeína e outros possíveis interferentes devem ser avaliados durante a validação de um estudo de biodisponibilidade relativa/bioequivalência.

A Nota técnica 04/2014, elaborada em agosto de 2014, relata quais ensaios devem ser realizados quando houver a administração de fármacos concomitantes (medicamentos eventuais e comedicação) durante estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência ou quando o voluntário do estudo fizer uso de substâncias possivelmente interferentes (tais como cafeína e nicotina).

A avaliação da interferência analítica deve ser feita no momento da validação do método analítico e deve contemplar os testes de seletividade e efeito matriz com e sem possíveis interferentes.

Os parâmetros avaliados na validação de análise de fármacos de uso concomitantes foram os mesmos para UDCA, tauroursodesoxicólico e glicoursodesoxicólico.

Os padrões de referência utilizados na validação dos fármacos de uso concomitante foram: Cloridrato 4-MAA, Dimenidrinato, Paracetamol, Cloridrato de Metoclopramida, Bromidrato de Escopolamina, Cloridrato de Piridoxina e Cafeína.

3.2.8.2.10.1. Seletividade na presença de fármacos de uso concomitante

A análise de seletividade na presença de fármacos de uso concomitante tem como objetivo avaliar a interferência dos fármacos concomitantes que podem ser usados durante a etapa clínica do estudo de UDCA. Para confirmar a seletividade do método, foram analisadas amostras branco de plasma humano obtidas de 6 (seis) indivíduos sendo 4 (quatro) amostras normais, 1 (uma) lipêmica e 1 (uma) hemolisada contaminados com os fármacos de uso concomitante.

3.2.8.2.10.2. Efeito de Matriz na presença de fármacos de uso concomitante

O uso de fármacos concomitantes durante a etapa clínica deve ser avaliada para investigar a interferência dos mesmos na metodologia analítica proposta. Com este objetivo avaliou-se a interferência dos fármacos concomitantes.

Para avaliar se existe efeito de matriz, foram analisadas amostras de 8 (oito) fontes distintas, sendo 4 (quatro) normais, 2 (duas) lipêmicas e 2 (duas) hemolisadas, adicionando-se

posteriormente soluções de analito e PI nas mesmas concentrações de CQB e CQA contaminados com os fármacos de uso concomitante.

3.2.8.2.10.3. Exatidão e Precisão na presença de fármacos de uso concomitante

Para avaliar a precisão e exatidão do método na presença de fármacos de uso concomitante, 9 (nove) réplicas distintas (CQB, CQM, CQA), foram analisadas após a adição dos fármacos concomitantes na faixa de concentração máxima esperada para cada um destes fármacos avaliados.

3.2.8.2.11. Estudo de estabilidade do fármaco no fluido biológico

Para gerar resultados confiáveis e reprodutíveis, as amostras, os padrões e reagentes usados devem ser estáveis por um período razoável.

3.2.8.2.11.1. Amostras recém preparadas

Foram avaliados os controles de qualidades (CQB e CQA) para as seis (6) amostras recém-preparadas utilizadas nos testes de estabilidade do fármaco em ciclos de congelamento e degelo, estabilidade de curta duração e estabilidade de longa duração.

Comparou-se os valores obtidos para os controles de qualidade CQB e CQA das amostras recém-preparadas e analisadas, com relação ao valor nominal. As concentrações nominais dos valores de controles de qualidade das amostras foram: UDCA CQB = 45 ng mL⁻¹ e CQA = 8000 ng mL⁻¹; TUDCA, CQB = 15 ng mL⁻¹ e CQA = 400 ng mL⁻¹; GUDCA, 45 ng mL⁻¹ e CQA = 8000 ng mL⁻¹.

3.2.8.2.11.2. Estabilidade de curta duração

Baseado no tempo em que as amostras do estudo serão mantidas à temperatura ambiente, foram analisadas 6 (seis) amostras de 2 (duas) diferentes concentrações (CQB e CQA).

Comparou-se os valores médios obtidos de seis (6) amostras para os controles de qualidade CQB e CQA mantidos em até 24 horas à temperatura ambiente com relação ao valor nominal. As concentrações nominais dos valores de controles de qualidade das amostras foram:

UDCA, CQB = 45 ng mL⁻¹ e CQA = 8000 ng mL⁻¹; TUDCA, CQB = 15 ng mL⁻¹ e CQA = 400 ng mL⁻¹; GUDCA, 45 ng mL⁻¹ e CQA = 8000 ng mL⁻¹.

3.2.8.2.11.3. Estabilidade do fármaco em ciclos de congelamento e degelo

Para avaliar a estabilidade de UDCA durante três ciclos de congelamento e degelo, foram analisadas 6 (seis) amostras de 2 (duas) diferentes concentrações (CQB e CQA), nas seguintes condições; amostras CQB e CQA (degelo 1): as amostras foram congeladas à -20 °C e mantidas nesta temperatura por no mínimo 12 horas. Após este tempo, as amostras foram submetidas ao degelo natural, à temperatura ambiente. Depois de completamente degeladas, as amostras foram novamente congeladas à -20 °C, mantidas nesta temperatura (por no mínimo 12 horas) e então submetidas ao degelo natural, (degelo 2). Para completar os degelos as amostras foram novamente congeladas à -20 °C, mantidas nesta temperatura (por no mínimo 12 horas) e então submetidas ao degelo natural, (degelo 3) e após este tempo, as amostras foram extraídas e quantificadas.

3.2.8.2.11.4. Estabilidade pós processamento

Para avaliar a estabilidade do fármaco no tempo e condições de análise, as amostras processadas foram mantidas dentro do autoinjeter, aproximadamente 22 °C, e cada amostra de controle de qualidade foi analisada em 6 (seis) réplicas nos tempos 00:00 e 24 horas.

3.2.8.2.11.5. Estabilidade de longa duração

Para avaliar a estabilidade do fármaco, em plasma, em condições de longa duração, o tempo de armazenamento deve exceder o intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra e a análise da última amostra dos voluntários.

Foram preparadas seis amostras de duas diferentes concentrações (CQB e CQA) no tempo inicial e estas amostras foram estocadas nas mesmas condições que as amostras de plasma dos voluntários analisados (-20°C). As amostras armazenadas foram analisadas após 133 dias para o UDCA, 154 dias para o GUDCA e 119 dias para o TUDCA em plasma humano.

Os valores para as variações entre as médias dos CQB e CQA para as amostras armazenadas durante o tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra em estudo e a análise da última com relação ao valor nominal devem ser comparados e os desvios devem ser inferiores a 15%.

3.2.8.2.11.6. Estudo de Estabilidade de soluções padrão

As avaliações da estabilidade das soluções foram realizadas com solução primária de maior concentração do analito e do PI e solução de trabalho de menor concentração do analito e do PI.

Comparou-se as variações das médias das respostas do analito e do padrão interno para as soluções analisadas após horas de preparo mantidas à temperatura ambiente e amostras analisadas após dias mantidas sob refrigeração, em relação às médias obtidas para as soluções recém preparadas, sendo que os desvios encontrados devem ser inferiores a 10%.

3.2.8.2.12. Cálculos das concentrações de amostras

Os cálculos foram baseados em função da curva de calibração construída para o fármaco analisado, no sistema de dados do MassLynx 4.1, utilizando os padrões de calibração. As funções de calibração foram calculadas através da razão entre as áreas dos picos do padrão e padrão interno. As concentrações do analito nas amostras foram calculadas a partir da equação de regressão linear ponderada ($1/x^2$), obtida com a curva de calibração (concentração do analito em função das razões das áreas). Tal modelo de regressão ($1/x^2$) foi utilizado devido a amplitude da curva de calibração, ácido urosdesoxicólico de 15,0 a 10 000,0 ng mL⁻¹, TUDCA de 5,0 a 500,0 ng mL⁻¹ e GUDCA de 15,0 a 10 000,0 ng mL⁻¹ e por apresentar o menor valor para a soma dos erros relativos dos valores nominais dos padrões de calibração *versus* seus valores obtidos pela equação da curva.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Pré-Desenvolvimento

No processo de desenvolvimento da metodologia analítica para quantificação do ácido ursodesoxicólico e seus metabólitos (Figura 9) em plasma humano, levou-se em consideração dois aspectos principais, primeiro as características estruturais de cada molécula, assim como, suas propriedades físico-químicas tais como solubilidade, polaridade, acidez / basicidade e segundo, a curva de concentração plasmática esperada com base em dados da literatura.

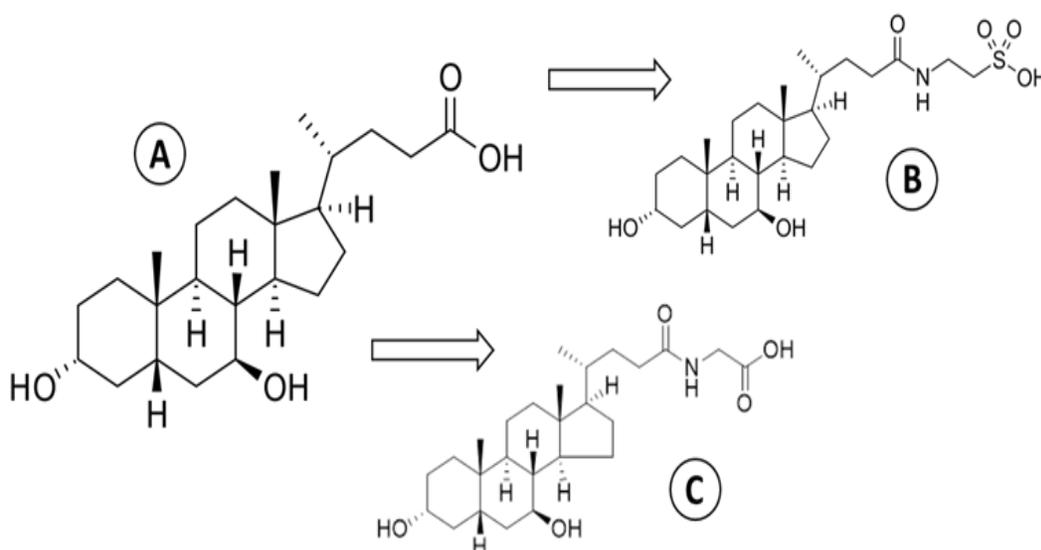


FIGURA 9. Estrutura química do UDCA (A) e seus principais metabólitos, TUDCA (B) e GUDCA (C).

A faixa linear esperada para os ativos são de 15 a 10 000 ng mL⁻¹ para o UDCA e GUDCA e de 5 a 500 ng mL⁻¹ para o TUDCA, portanto, para este último, foi necessário um processo de extração e pré-concentração maior do que para os demais.

Conforme mencionado previamente, o UDCA é um ácido carboxílico com característica molecular apolar, sendo solúvel em etanol e ácido acético glacial, ligeiramente solúvel em clorofórmio, pouco solúvel em éter e praticamente insolúvel em água, enquanto seu pKa é de 5,1.

O GUDCA apresenta estrutura molecular e solubilidade semelhante, distinguindo-se pela presença de um grupo amida e um pKa de 3,8, o que a torna uma molécula mais ácida. Já

o TUDCA se distingue pela presença de um grupo sufóxido e um pKa de aproximadamente -1,0, caracterizando-se como uma molécula mais ácida e mais polar do que as demais.

Usualmente, para o tratamento de compostos em estudos fazendo uso da técnica LC-MS/MS, os métodos de extração mais utilizados são: fase sólida, líquido-líquido e precipitação. O método por fase sólida, embora mais limpo e efetivo, não foi empregado devido ao seu alto custo e o intuito do trabalho foi desenvolver uma metodologia que seja viável para o âmbito de pesquisa.

Dessa forma, a técnica de extração líquido-líquido é mais indicada para compostos apolares pois no seu processo é feito uso de solventes e reagentes com essa mesma característica e no caso da precipitação, é mais indicada para moléculas com característica predominante polar.

4.2. Desenvolvimento da Metodologia Bioanalítica

4.2.1. Obtenção do Espectro de Massas (MS)

UDCA

Utilizando a solução de 5000 ng mL⁻¹ realizou-se os experimentos de MS e MS/MS para definição do canal MRM 391,30 > 373,5 para quantificação do analito, operando no modo negativo de ionização, conforme a Figura 10.

Ursodiol 5 ug/mL FM-FM MeCN/H₂O/NH₄OH 90/10/0.05

Desenvolvimento 14-01-2016_26.5 (0.227) Cm (4:5)

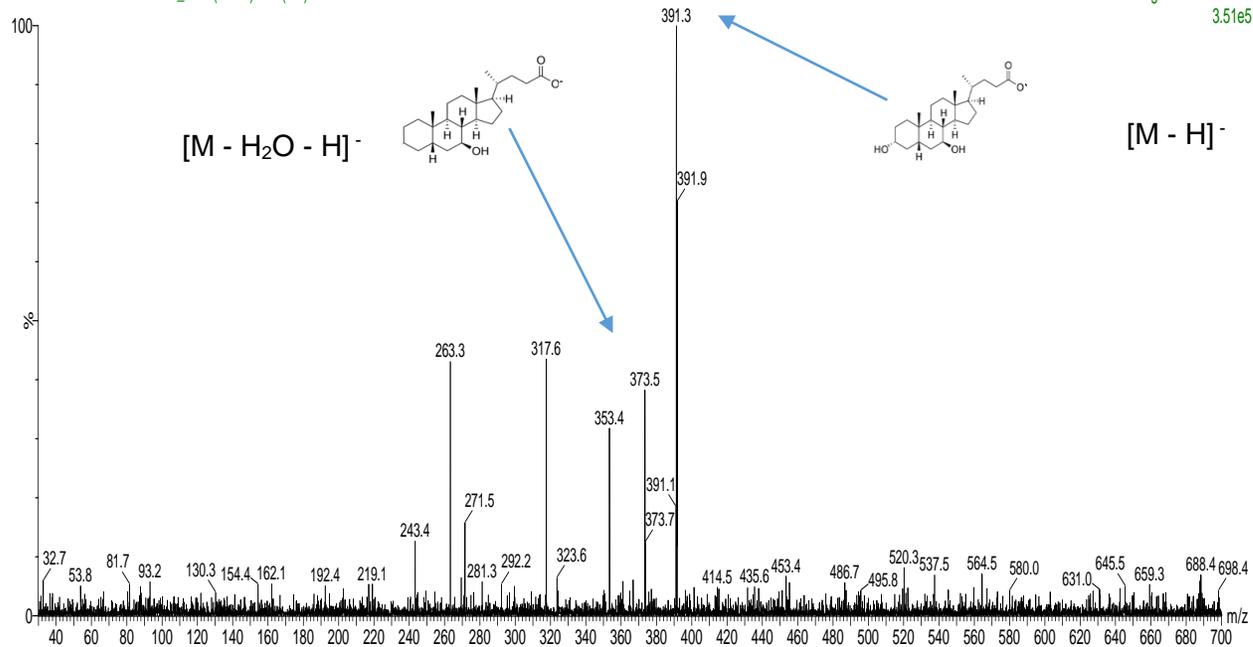


FIGURA 10. Espectro MS/MS Acido Ursodesoxicólico: Ion precursor m/z 391.3 Da e ion produto, utilizado para formação do canal de monitoramento, m/z 373.5 Da.

UDCA D4

Utilizando a solução de 3000 ng mL⁻¹ realizou-se os experimentos de MS e MS/MS para definição do canal MRM 395,3 > 377,1, para monitoramento do padrão interno, com função de correção de desvios do processo analítico, operando no modo negativo de ionização, conforme a Figura 11.

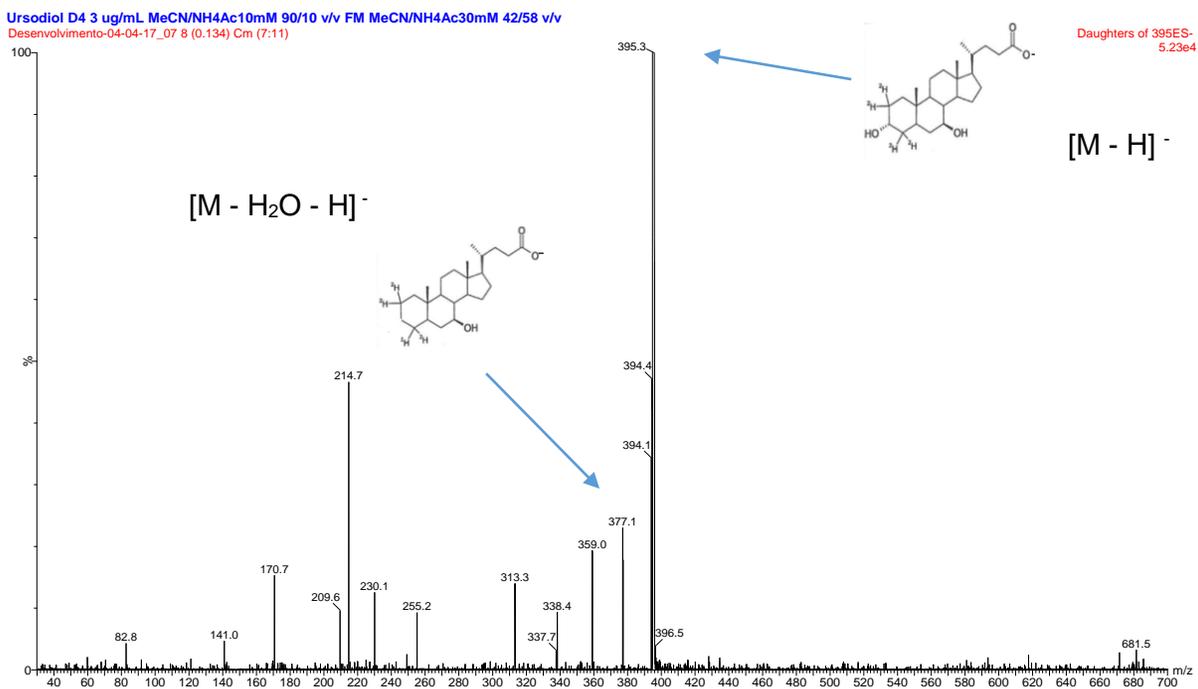


FIGURA 11. Espectro MS/MS Acido Ursodesoxicólico D4: Ion precursor m/z 395.3 Da e ion produto, utilizado para formação do canal de monitoramento, m/z 377.1 Da.

GUDCA

Utilizando a solução de 1000 ng mL^{-1} realizou-se os experimentos de MS e MS/MS para definição do canal MRM $448,5 > 73,7$ para quantificação do analito, operando no modo negativo de ionização, conforme a Figura 12.

Glico 1 ug/mL 80/20 MeCN/NH₄Ac 10mM FM MeCN/NH₄Ac 10 mM/ 80/20 col Phenomenex C18 100mm

Desenvolvimento-27-04-17

Daughters of 448ES-
2.49e5

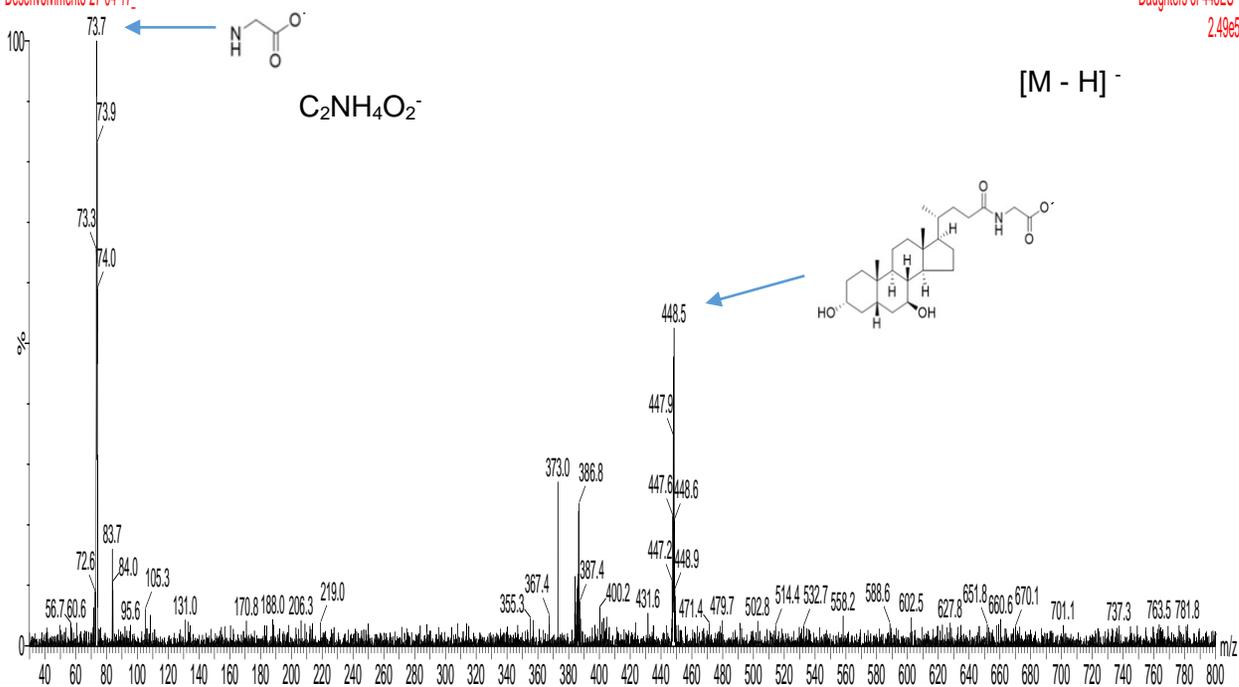


FIGURA 12. Espectro MS/MS Ácido Glicoursodesoxicólico: Ion precursor m/z 448.5 Da e ion produto, utilizado para formação do canal de monitoramento, m/z 73.7 Da.

GUDCA D4

Utilizando a solução de 1000 ng mL⁻¹ realizou-se os experimentos de MS e MS/MS para definição do canal MRM 451,9 > 73,7, para monitoramento do padrão interno, com função para correção de desvios no processo analítico, operando no modo negativo de ionização, conforme a Figura 13.

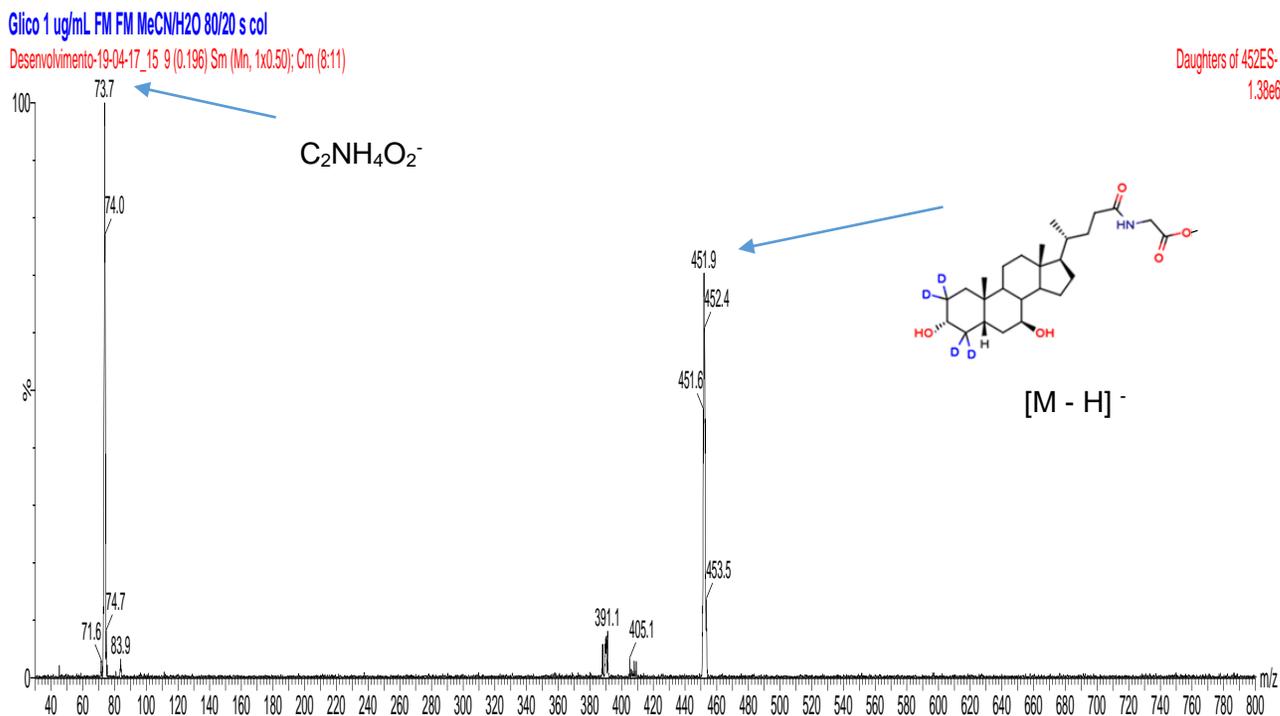


FIGURA 13. Espectro MS/MS Ácido Glicoursodesoxicólico D₄: Ion precursor m/z 451.9 Da e ion produto, utilizado para formação do canal de monitoramento, m/z 73.7 Da.

TUDCA

Utilizando a solução de 1000 ng mL⁻¹ realizou-se os experimentos de MS e MS/MS para definição do canal MRM 498,0 > 79,6 para monitoramento na quantificação do analito, operando no modo negativo de ionização, conforme a Figura 14.

Taurourso 1 ug/mL em FM FM MeCN/NH4Ac10mM 80/20 Col Luna C18 10cm
Desenvolvimento-02-05-2017_04 97 (2.278) Sm (Mn, 1x0.50); Cm (97)

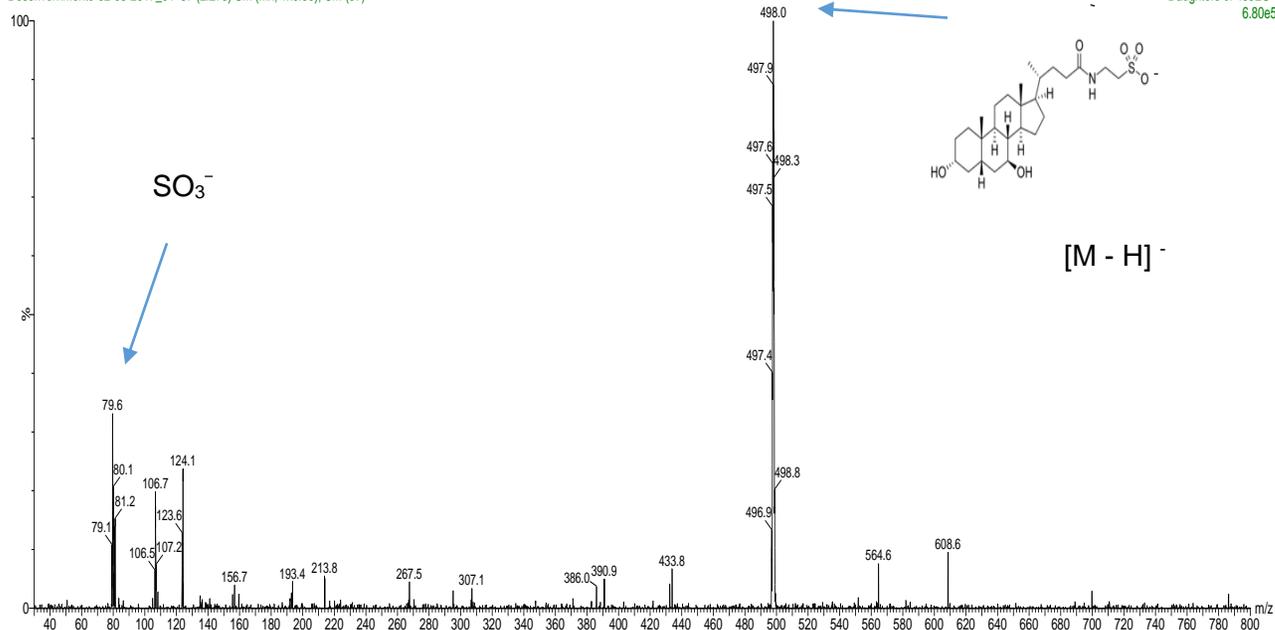


FIGURA 14. Espectro MS/MS Ácido Tauroursodesoxicólico: Ion precursor m/z 498.0 Da e ion produto, utilizado para formação do canal de monitoramento, m/z 79.6 Da.

TUDCA D4

Utilizando a solução de 1000 ng mL^{-1} realizou-se os experimentos de MS e MS/MS para definição do canal MRM $502,4 > 79,5$ para monitoramento o padrão interno, com função de correção de desvios do processo analítico, operando no modo negativo de ionização conforme a Figura 15.

Tauro 1 ug/mL FM FM MeCN/H₂O 80/20 s col

Desenvolvimento-19-04-17_13 8 (0.174) Cm (7:11)

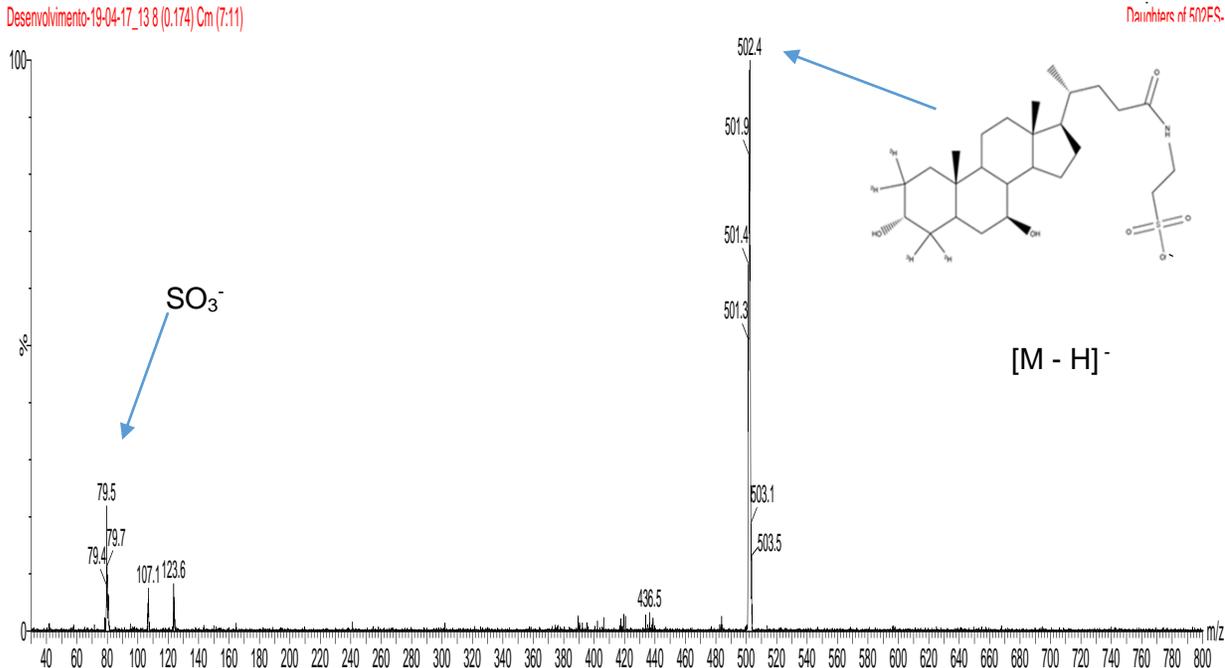


FIGURA 15. Espectro MS/MS Ácido Tauroursodesoxicólico D₄: Ion precursor m/z 502.4 Da e ion produto, utilizado para formação do canal de monitoramento, m/z 79.5 Da.

4.2.2. Otimização do Equipamento, Separação Cromatográfica e Processo de Extração Ácido ursodesoxicólico

As condições cromatográficas foram definidas a partir de diversos ensaios, buscando obter uma maior resposta de pico, com boa resolução, simetria e o menor tempo de corrida, utilizando os materiais disponíveis.

A fase móvel para quantificação de UDCA foi definida após diversos testes, primeiramente utilizou-se MeCN:H₂O:NH₄OH (90:10:0,05 e 20:80:0,05) e MeCN:H₂O (60:40 v/v), onde foi observado a existência de um pico no mesmo tempo de retenção do analito após realização de testes com plasma branco, que persistiu mesmo na ausência de modificadores orgânicos. O aumento de água (80mL) acarretou em uma leve separação destes picos quando comparou-se a amostras branco e amostras dopadas. Estes resultados mostraram que o pico observado nas amostras de plasma correspondia a um intenso interferente, de mesma transição, que eluiu juntamente com o ativo. Assim, foram realizados testes com fase móvel em diversos volumes de MecN:H₂O, MeCN:NH₄Ac 10 mM:NH₄OH, MeCN:H₂O:NH₄OH; MeCN:NH₄Ac 10 mM, MeCN:NH₄Ac 20 mM e MeCN:NH₄Ac 30 mM. Esta última solução apresentou uma excelente

separação e resolução cromatográfica na proporção 42:58 (v/v), sendo portanto, a escolhida para o método. Nestes testes observou-se que a adição de NH_4Ac na fase móvel favoreceu a diminuição do tempo de retenção dos picos enquanto também minimizou a variação e separação cromatográfica entre analito e interferentes. O NH_4OH havia sido adicionado como um modificador orgânico com características básicas, porém apesar de promover um aumento bastante significativo do sinal eletrônico, ocasionou uma menor separação e resolução cromatográfica. A água foi retirada pois seu aumento levou a uma diminuição do sinal eletrônico, dificultando a quantificação do LIQ.

Testou-se também as seguintes colunas para determinação de UDCA: Synergi Fusion 25 cm, Luna Phenyl Hexyl 25 cm e Ace PFP C18 15 cm e Luna 5 μm C18 100A 25 cm, sendo esta última a mais eficiente na separação do interferente que eluiu após o pico de interesse. Para estabilizar possíveis variações na temperatura da coluna que poderiam estar afetando sua estabilidade, acoplou-se um forno mantendo-a numa temperatura de 30 °C e paralelamente, aumentou-se o parâmetro de tempo de Dwell (velocidade scan) para minimizar a quantidade de scans por segundos, diminuindo variações no tempo de retenção.

A solução de ressuspensão de UDCA foi obtida a partir de diversos testes buscando melhorar o sinal eletrônico. Foram testadas diversas proporções de $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_2\text{O}_2$; $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$; $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}:\text{NH}_4\text{OH}$; $\text{MeCN}:\text{NH}_4\text{Ac}$ 10 mM; $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}:\text{NH}_4\text{OH}$, onde observou-se que apesar desta última opção apresentar um bom sinal eletrônico (90:10:0,05 v/v/v) a exclusão da base na solução de ressuspensão foi fundamental para estabilização do tempo de retenção, portanto a solução escolhida foi $\text{MeCN}:\text{NH}_4\text{Ac}$ (90:10 v/v).

A separação cromatográfica foi feita através de uma coluna 250x4.6 mm 5 μ C18 100A Phenomenex Luna (Torrence, USA) com uma fase móvel que consiste em $\text{MeCN}:\text{NH}_4\text{Ac}$ 30 mM (42:58, v/v) pH 7.0. Para análise de UDCA foi definido um fluxo de 0,450 mL min^{-1} a partir de testes, com gradiente, o que levou a diminuição considerável do tempo de cada análise. Os canais definidos foram MRM m/z 391,30 > m/z 373,5 para UDCA e canal MRM m/z 395,3 > m/z 377,1 para UDCA D4 operando em Eletronspray ion source (ESI) em modo negativo de ionização. O canal m/z 391,20 > m/z 355,04 foi testado para o analito, porém apresentou interferentes cromatográficos.

Não foi necessário o uso de splitter. Nestas condições, o UDCA eluiu no tempo de 3.47, minutos com um total de tempo de corrida de 6.50 minutos. O íon foi monitorado pelo espectrômetro de massas equipado com ESI, operando em modo negativo de ionização. A quantificação dos analitos em plasma humano foi baseado na razão da área dos picos dos

analitos pelo padrão interno. A determinação da concentração dos analitos em plasma humano foi determinada a partir de curvas de calibração que foram analisadas por regressão linear com método dos mínimos quadrados (coeficiente de correlação linear $1/x^2$).

Ácido Glicoursodesoxicólico e Ácido Tauroursodesoxicólico

A fase móvel utilizada para quantificação dos metabólitos inicialmente foi MeCN:H₂O:NH₄OH (80:20:0,05 v/v/v) pois ocasionou um ganho de sinal eletrônico para os dois ativos, porém ao longo dos testes foi observado desdobramentos nos picos de interesse, desta forma testou-se novas fases móveis, sem NH₄OH e com a adição de NH₄Ac em seu lugar. Além da junção dos dois modificadores, NH₄OH e NH₄Ac. A fase móvel com NH₄Ac 10 mM, somente, apresentou o melhor resultado principalmente para os testes de precipitação, assim utilizou-se a fase móvel (MeCN:NH₄Ac 10 mM (57:43 v/v) para TUDCA. Porém após testes de exatidão para GUDCA observou-se picos interferentes, sendo a fase móvel alterada para MeCN:NH₄Ac 10 mM 60:40, o que levou a separação dos picos, porém de forma insuficiente. Desta maneira foram testadas outras proporções: 80:20 – 50:50 – 40:60 v/v, sendo a proporção de 40:60 a apresentar melhores resultados. Além disso, adicionou-se modificadores orgânicos (NH₄OH) nesta fase móvel na expectativa de melhorar o sinal e separação cromatográfica. A nova fase móvel se demonstrou eficaz e ficou com a seguinte proporção MeCN:NH₄Ac 10mM:NH₄OH (40:60:0,5 v/v/v).

Para TUDCA e GUDCA foram testadas as colunas Luna 5 µm C18 100 x 4,6 mm, Phenomenex C18 100 x 4,6mm, Phenomenex de 15 cm C18, Phenyl – Hexyl 15cm e Luna Phenomenex C18 100A 25 cm, sendo esta última a apresentar melhor resultado na separação de picos interferentes que haviam sido encontrados para GUDCA, obtendo também resultado satisfatório para TUDCA.

Já o uso HCl 1M nas extrações de GUDCA apresentou melhores resultados de recuperação, além disso, foram realizados diversos testes para ressuspensão deste metabólito: MeCN:NH₄Ac 10mM:NH₄OH 40:60:0,5, 80:20:01 e 70:30:0,1 v/v/v, sendo esta última opção a escolhida pois auxiliou na eliminação de problemas de desdobramento de picos.

Durante realização dos testes de extração foi determinado o uso da técnica líquido-líquido, pois é a mais indicada para compostos predominantemente apolares, como o GUDCA, uma vez que no seu processo é feito uso de solventes e reagentes com essa mesma característica. Para TUDCA foi utilizada a técnica de precipitação, devido sua característica polar. O método por fase sólida, embora mais limpo e efetivo, não foi empregado devido ao seu alto custo.

Para os metabólitos observou-se sinais de suas respectivas massas somente em modo negativo de ionização (ESI⁻), utilizando um fluxo de 0,700 mL min⁻¹ para GUDCA e 0,200 mL⁻¹ para TUDCA, sendo também necessário utilizar gradiente. Os canais foram definidos como especificado em materiais e métodos.

A separação cromatográfica foi feita através de uma coluna 250x4.6 mm 5µ C18 100A Phenomenex Luna (Torrence, USA) para os ativos com uma fase móvel que consiste em MeCN:NH₄Ac 10mM:NH₄OH (40:60:0.5, v/v/v) e pH 9,0 para o GUDCA e MeCN:NH₄Ac 10mM (570:430, v/v) e pH 7.0 para o TUDCA. A fase móvel foi carregada através de um fluxo de 0.700 mL min⁻¹. (Com gradiente: 0,01 a 2,50 min. – 0,700 mL min⁻¹ – 85 Kgf; 2,51 a 4,75 min – 0,35 mL min⁻¹ – 44 Kgf; 4,76 min. – 0,700 mL min⁻¹ – 85 Kgf) para GUDCA e 0.200 mL min⁻¹ (com gradiente: 0,01 a 0,1 min./ 1,21 a 5,5 min. e 7,51 min.– 0,200 mL min⁻¹ – 20 Kgf; 0,11 a 1,2 min. e 5,51 a 7,5 min. – 1,5 mL min.⁻¹ – 130 Kgf) para TUDCA.

A quantificação dos analitos em plasma humano foi baseado na razão da área dos picos dos analitos pelo padrão interno. A determinação da concentração dos analitos em plasma humano foi determinada a partir de curvas de calibração que foram analisadas por regressão linear com método dos mínimos quadrados (coeficiente de correlação linear 1/x⁻²).

4.3. Validação da Metodologia Bioanalítica

Nas Tabelas 13, 14 e 15 estão apresentadas as datas de preparo das amostras de cada uma das análises da validação de UDCA, GUDCA e TUDCA, respectivamente.

Tabela 13. Datas de preparo das amostras de cada análise da validação do UDCA.

Descrição da Análise	Preparo das amostras	Análise
Seletividade	29/05/2017	29/05/2017
Efeito residual (<i>Carryover</i>)	31/05/2017	31/05/2017
Efeito de matriz	30/05/2017	30/05/2017
Linearidade (Lote 01)	31/05/2017	31/05/2017
Linearidade (Lote 02)	31/05/2017	31/05/2017
Linearidade (Lote 03)	31/05/2017	31/05/2017
Exatidão CQD (Lote 01)	01/06/2017	01/06/2017
Exatidão CQD (Lote 03)	05/06/2017	05/06/2017
Exatidão CQD (Lote 04)	06/06/2017	06/06/2017
LIQ 06	08/06/2017	08/06/2017
LIQ 07	09/06/2017	09/06/2017
LIQ 08	12/06/2017	12/06/2017
Validação da reinjeção	05/06/2017	05/06/2017
Seletividade na presença de fármacos de uso concomitante	29/05/2017	29/05/2017
Efeito de matriz na presença de fármacos de uso concomitante	30/05/2017	30/05/2017
Exatidão/Precisão na presença de fármacos de uso concomitante	20/06/2017	20/06/2017

Tabela 14. Datas de preparo das amostras de cada análise da validação do GUDCA.

Descrição da Análise	Preparo das amostras	Análise
Seletividade	26/05/2017	26/05/2017
Efeito residual (<i>Carryover</i>)	31/05/2017	31/05/2017
Efeito de matriz	29/05/2017	29/05/2017
Linearidade (Lote 01)	30/05/2017	30/05/2017
Linearidade (Lote 02)	30/05/2017	30/05/2017
Linearidade (Lote 03)	30/05/2017	30/05/2017
Exatidão CQD LIQ (Lote 01)	30/05/2017	30/05/2017
Exatidão CQD LIQ (Lote 02)	31/05/2017	31/05/2017
Exatidão CQD LIQ (Lote 03)	01/06/2017	01/06/2017
Validação da reinjeção	30/05/2017	31/05/2017
Seletividade na presença de fármacos de uso concomitante	26/05/2017	26/05/2017
Efeito de matriz na presença de fármacos de uso concomitante	29/05/2017	29/05/2017
Exatidão/Precisão na presença de fármacos de uso concomitante	02/06/2017	02/06/2017

Tabela 15. Datas de preparo das amostras de cada análise da validação do TUDCA.

Descrição da Análise	Preparo das amostras	Análise
Seletividade	12/06/2017	12/06/2017
Efeito residual (<i>Carryover</i>)	12/06/2017	12/06/2017
Efeito de matriz	13/06/2017	13/06/2017
Linearidade (Lote 01)	19/06/2017	19/06/2017
Linearidade (Lote 02)	19/06/2017	19/06/2017
Linearidade (Lote 03)	19/06/2017	19/06/2017
Exatidão CQD LIQ (Lote 02)	21/06/2017	21/06/2017
Exatidão CQD LIQ (Lote 03)	22/06/2017	22/06/2017
Exatidão CQD LIQ (Lote 04)	23/06/2017	23/06/2017
Validação da reinjeção	23/06/2017	23/06/2017
Seletividade na presença de fármacos de uso concomitante	12/06/2017	12/06/2017
Efeito de matriz na presença de fármacos de uso concomitante	13/06/2017	13/06/2017
Exatidão/Precisão na presença de fármacos de uso concomitante	03/07/2017	03/07/2017

4.3.1. Seletividade

As amostras foram testadas, utilizando o procedimento de extração e as condições cromatográficas desenvolvidas, para avaliar possíveis interferentes no tempo de retenção do fármaco e do padrão interno. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos com amostra processada do LIQ, Tabelas 16,17 e 18.

Tabela 16. Amostras branco de plasma do UDCA.

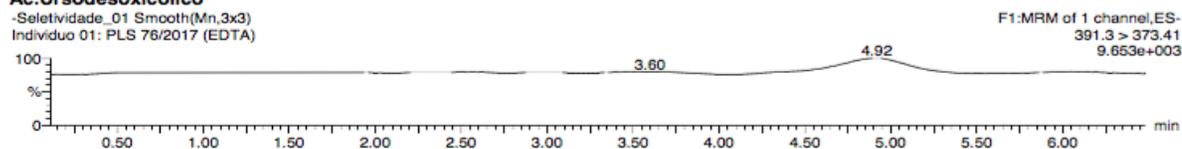
Indivíduo	Descrição	Origem	Lote	Área do fármaco	Área do padrão interno
01	Indivíduo 1: EDTA	UNIFAG	PLS 76/2017	-	-
02	Indivíduo 2: EDTA	UNIFAG	PLS 111/2017	-	-
03	Indivíduo 3: EDTA	UNIFAG	PLS 54/2017	-	-
04	Indivíduo 4: EDTA	UNIFAG	PLS 148/2017	-	-
05	Indivíduo 5: EDTA/Lipêmico	UNIFAG	PLS 464/2016	-	-
06	Indivíduo 6: EDTA/Hemolisado	UNIFAG	PLS 36/2017	-	-
07	LIQ 15 ng mL ⁻¹	UNIFAG	PLS 76/2017	1110	21489

Nas Figuras abaixo estão demonstrados os cromatogramas referentes ao plasma normal (Figuras 16, 17, 18 e 19), ao plasma lipêmico (Figura 20), ao plasma hemolisado (Figura 21) e ao da amostra processada do LIQ (Figura 22) para o UDCA.

Name: -Seletividade_01, Description: Individuo 01: PLS 76/2017 (EDTA), Date: 29-May-2017, Time: 16:38:12

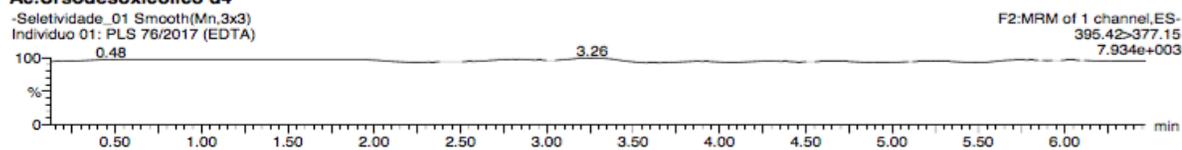
Ac.Ursodesoxicólico

-Seletividade_01 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 01: PLS 76/2017 (EDTA)



Ac.Ursodesoxicólico d4

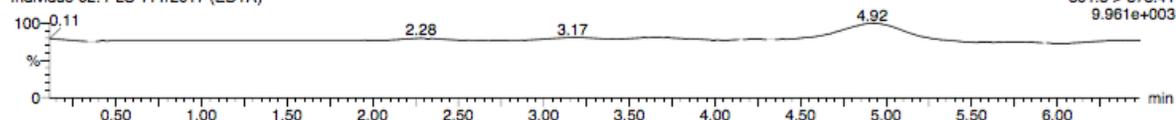
-Seletividade_01 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 01: PLS 76/2017 (EDTA)

**FIGURA 16.** Plasma branco normal lote PLS 76/2017 referente ao analito e PI.

Name: -Seletividade_02, Description: Individuo 02: PLS 111/2017 (EDTA), Date: 29-May-2017, Time: 16:45:34

Ac.Ursodesoxicolico

-Seletividade_02 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 02: PLS 111/2017 (EDTA)



Ac.Ursodesoxicolico d4

-Seletividade_02 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 02: PLS 111/2017 (EDTA)

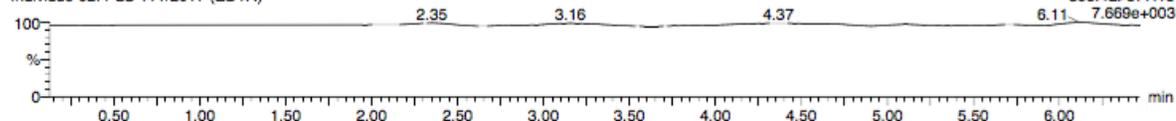
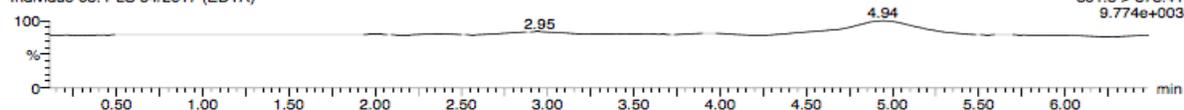


FIGURA 17. Plasma branco normal lote PLS 111/2017 referente ao analito e PI.

Name: -Seletividade_03, Description: Individuo 03: PLS 54/2017 (EDTA), Date: 29-May-2017, Time: 16:52:57

Ac.Ursodesoxicolico

-Seletividade_03 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 03: PLS 54/2017 (EDTA)



Ac.Ursodesoxicolico d4

-Seletividade_03 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 03: PLS 54/2017 (EDTA)

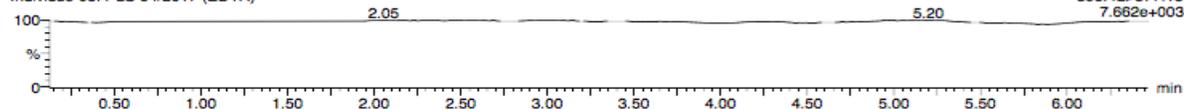
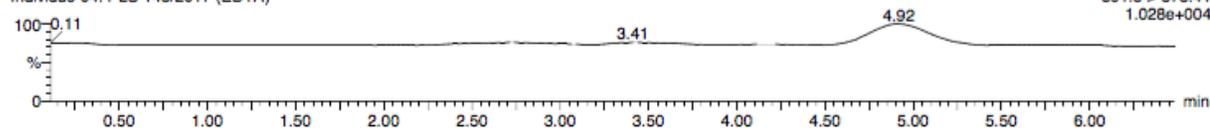


FIGURA 18. Plasma branco normal lote PLS 54/2017 referente ao analito e PI.

Name: -Seletividade_04, Description: Individuo 04: PLS 148/2017 (EDTA), Date: 29-May-2017, Time: 17:00:18

Ac.Ursodesoxicolico

-Seletividade_04 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 04: PLS 148/2017 (EDTA)



Ac.Ursodesoxicolico d4

-Seletividade_04 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 04: PLS 148/2017 (EDTA)

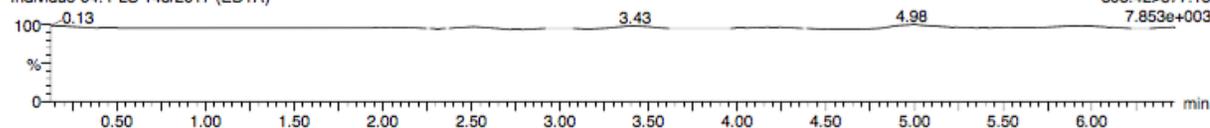


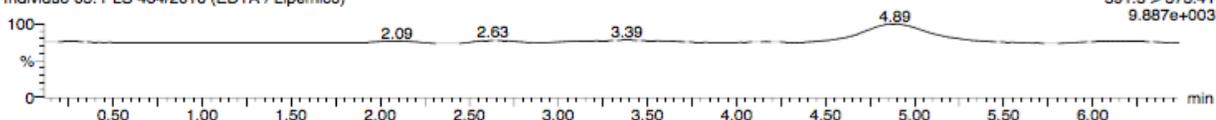
FIGURA 19. Plasma branco normal lote PLS 148/2017 referente ao analito e PI.

Name: -Seletividade_05, Description: Individuo 05: PLS 464/2016 (EDTA / Lipemico), Date: 29-May-2017, Time: 17:07:39

Ac.Ursodesoxicolico

-Seletividade_05 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 05: PLS 464/2016 (EDTA / Lipemico)

F1:MRM of 1 channel,ES-
391.3 > 373.41
9.887e+003



Ac.Ursodesoxicolico d4

-Seletividade_05 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 05: PLS 464/2016 (EDTA / Lipemico)

F2:MRM of 1 channel,ES-
395.42>377.15
7.749e+003

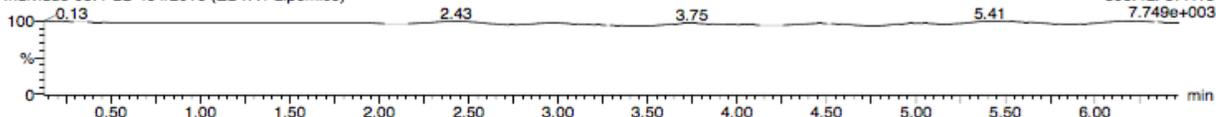


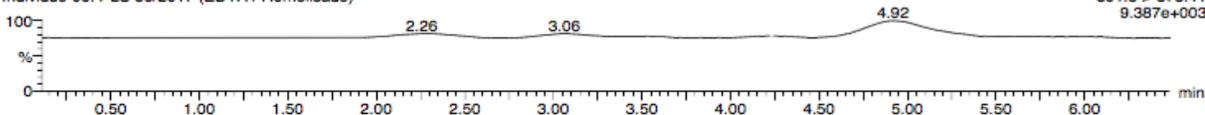
FIGURA 20. Plasma branco lipêmico lote PLS 464/2016 referente ao analito e PI.

Name: -Seletividade_06, Description: Individuo 06: PLS 36/2017 (EDTA / Hemolisado), Date: 29-May-2017, Time: 17:15:01

Ac.Ursodesoxicolico

-Seletividade_06 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 06: PLS 36/2017 (EDTA / Hemolisado)

F1:MRM of 1 channel,ES-
391.3 > 373.41
9.387e+003



Ac.Ursodesoxicolico d4

-Seletividade_06 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 06: PLS 36/2017 (EDTA / Hemolisado)

F2:MRM of 1 channel,ES-
395.42>377.15
7.788e+003

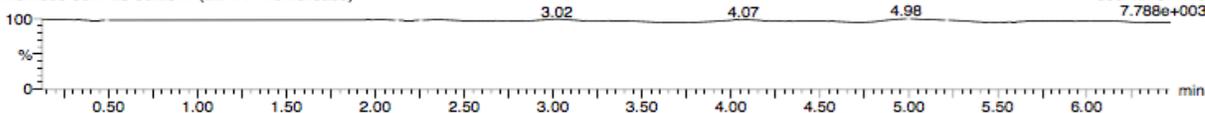


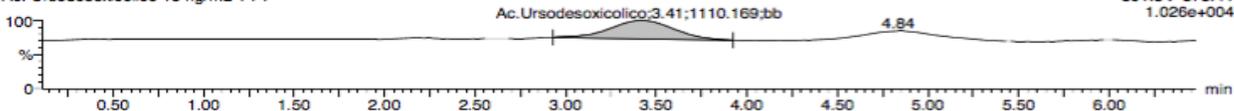
FIGURA 21. Plasma branco hemolisado lote PLS 36/2017 referente ao analito e PI.

Name: -Seletividade_09, Description: Ac. Ursodesoxicolico 15 ng/mL + PI, Date: 29-May-2017, Time: 17:37:06

Ac.Ursodesoxicolico

-Seletividade_09 Smooth(Mn,3x3)
Ac. Ursodesoxicolico 15 ng/mL + PI

F1:MRM of 1 channel,ES-
391.3 > 373.41
1.026e+004



Ac.Ursodesoxicolico d4

-Seletividade_09 Smooth(Mn,3x3)
Ac. Ursodesoxicolico 15 ng/mL + PI

F2:MRM of 1 channel,ES-
395.42>377.15
6.568e+004

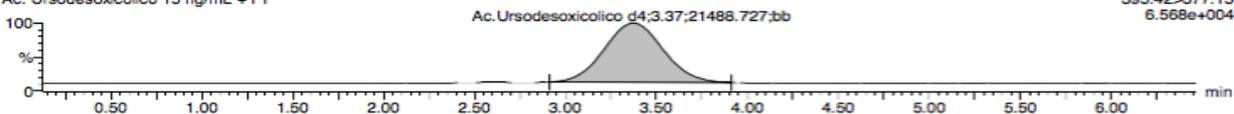


FIGURA 22. Plasma branco normal lote PLS 76/2017 referente ao analito e PI.

Tabela 17. Amostras branco de plasma do GUDCA.

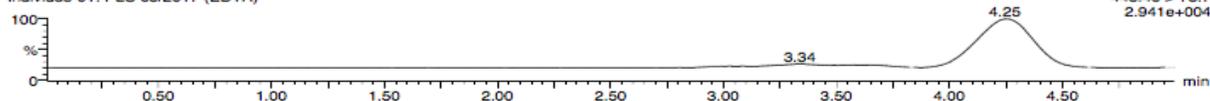
Indivíduo	Descrição	Origem	Lote	Área do fármaco / %	Área do padrão interno
01	Indivíduo 1: EDTA	UNIFAG	PLS 65/2017	-	-
02	Indivíduo 2: EDTA	UNIFAG	PLS 453/2016	-	-
03	Indivíduo 3: EDTA	UNIFAG	PLS 147/2017	-	-
04	Indivíduo 4: EDTA	UNIFAG	PLS 388/2016	197 / 16,32	-
05	Indivíduo 5: EDTA/Lipêmico	UNIFAG	PLS 464/2016	-	-
06	Indivíduo 6: EDTA/Hemolisado	UNIFAG	PLS 36/2017	197 / 16,32	-
07	LIQ 15 ng mL ⁻¹	UNIFAG	PLS 65/2017	1207	39237

Nas figuras abaixo estão demonstrados os cromatogramas referentes ao plasma normal (Figuras 23, 24, 25 e 26), ao plasma lipêmico (Figura 27), ao plasma hemolisado (Figura 28) e ao da amostra processada do LIQ (Figura 28) para o GUDCA.

Name: Seletividade-01, Description: Individuo 01: PLS 65/2017 (EDTA), Date: 26-May-2017, Time: 15:30:06

Ac. Glicoursodesoxicólico

Seletividade-01 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 01: PLS 65/2017 (EDTA)



Ac. Glicoursodesoxicólico D4

Seletividade-01 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 01: PLS 65/2017 (EDTA)

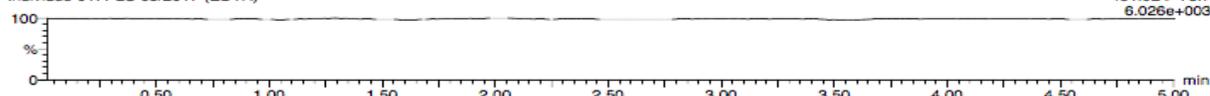
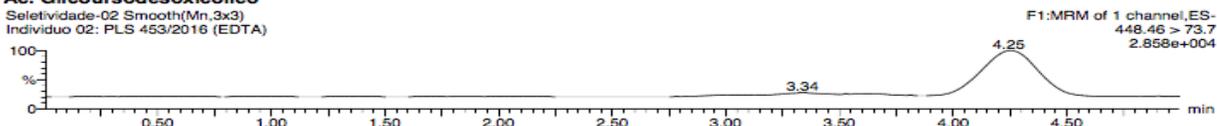


FIGURA 23. Plasma branco normal lote PLS 65/2017 referente ao analito e PI.

Name: Seletividade-02, Description: Individuo 02: PLS 453/2016 (EDTA), Date: 26-May-2017, Time: 15:35:55

Ac. Glicoursodesoxicolicico
Seletividade-02 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 02: PLS 453/2016 (EDTA)



Ac. Glicoursodesoxicolicico D4
Seletividade-02 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 02: PLS 453/2016 (EDTA)

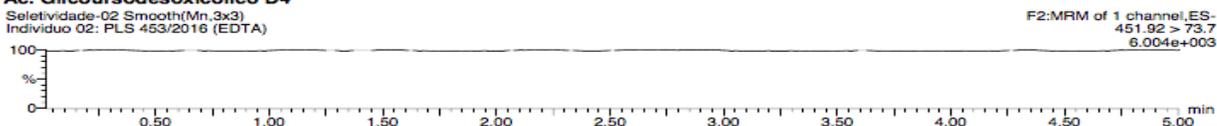
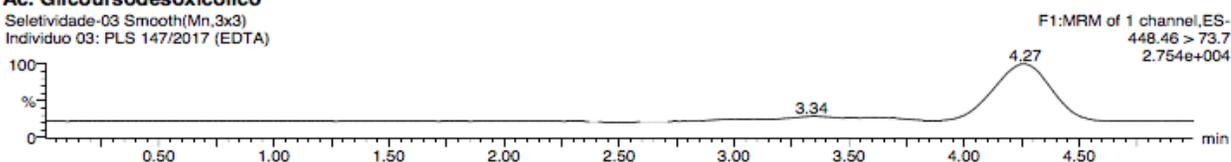


FIGURA 24. Plasma branco normal lote PLS 453/2016 referente ao analito e PI.

Name: Seletividade-03, Description: Individuo 03: PLS 147/2017 (EDTA), Date: 26-May-2017, Time: 15:41:43

Ac. Glicoursodesoxicolicico
Seletividade-03 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 03: PLS 147/2017 (EDTA)



Ac. Glicoursodesoxicolicico D4
Seletividade-03 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 03: PLS 147/2017 (EDTA)

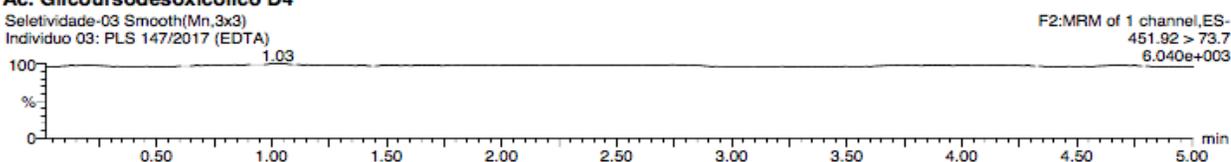
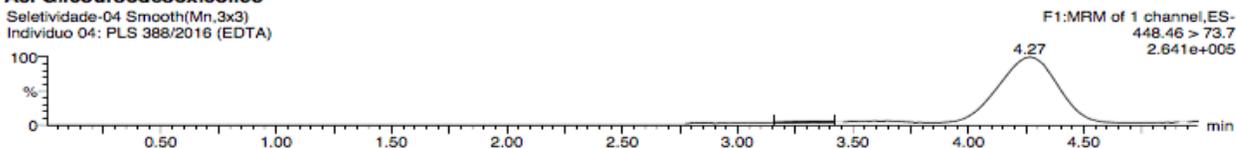


FIGURA 25. Plasma branco normal lote PLS 147/2017 referente ao analito e PI.

Name: Seletividade-04, Description: Individuo 04: PLS 388/2016 (EDTA), Date: 26-May-2017, Time: 15:47:31

Ac. Glicoursodesoxicolicico
Seletividade-04 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 04: PLS 388/2016 (EDTA)



Ac. Glicoursodesoxicolicico D4
Seletividade-04 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 04: PLS 388/2016 (EDTA)

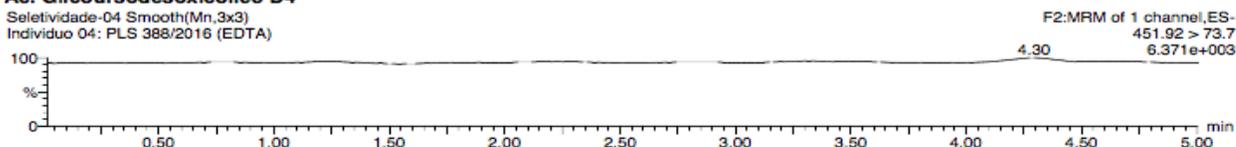
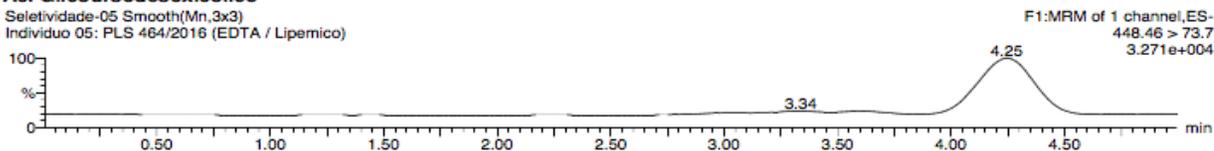


FIGURA 26. Plasma branco normal lote PLS 388/2016 referente ao analito e PI.

Name: Seletividade-05, Description: Individuo 05: PLS 464/2016 (EDTA / Lipemico), Date: 26-May-2017, Time: 15:53:21

Ac. Glicoursodesoxicolicico

Seletividade-05 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 05: PLS 464/2016 (EDTA / Lipemico)



Ac. Glicoursodesoxicolicico D4

Seletividade-05 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 05: PLS 464/2016 (EDTA / Lipemico)

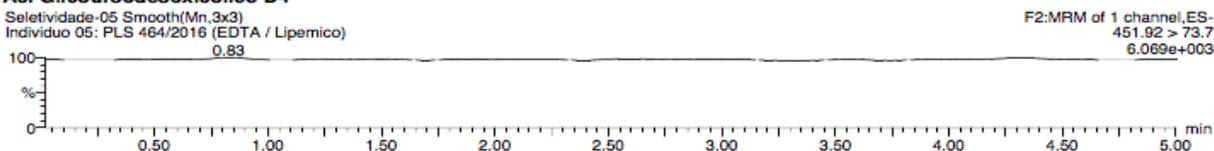
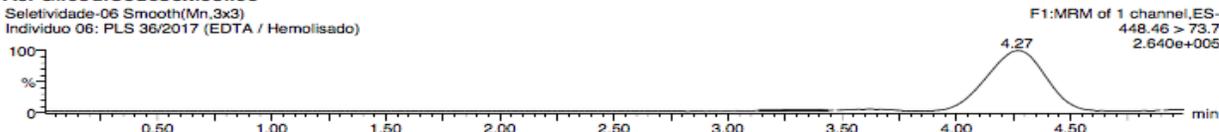


FIGURA 27. Plasma branco lipêmico lote PLS 464/2016 referente ao analito e PI.

Name: Seletividade-06, Description: Individuo 06: PLS 36/2017 (EDTA / Hemolisado), Date: 26-May-2017, Time: 15:59:09

Ac. Glicoursodesoxicolicico

Seletividade-06 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 06: PLS 36/2017 (EDTA / Hemolisado)



Ac. Glicoursodesoxicolicico D4

Seletividade-06 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 06: PLS 36/2017 (EDTA / Hemolisado)

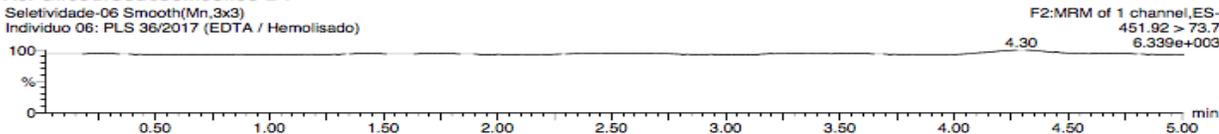
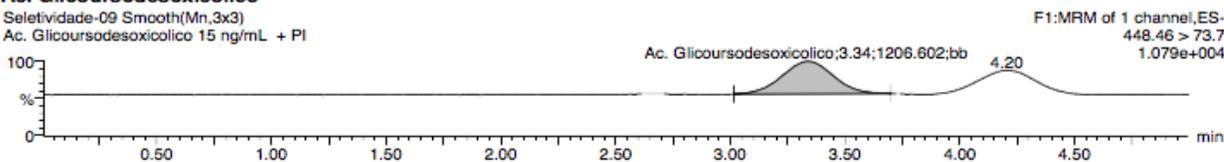


FIGURA 28. Plasma branco hemolisado lote PLS 36/2017 referente ao analito e PI.

Name: Seletividade-09, Description: Ac. Glicoursodesoxicolicico 15 ng/mL + PI, Date: 26-May-2017, Time: 16:16:35

Ac. Glicoursodesoxicolicico

Seletividade-09 Smooth(Mn,3x3)
Ac. Glicoursodesoxicolicico 15 ng/mL + PI



Ac. Glicoursodesoxicolicico D4

Seletividade-09 Smooth(Mn,3x3)
Ac. Glicoursodesoxicolicico 15 ng/mL + PI

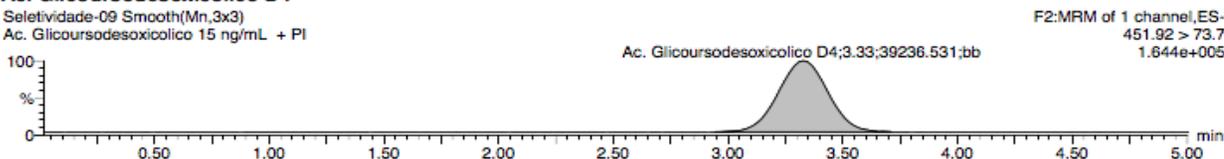


FIGURA 29. Plasma branco normal lote PLS 65/2017 referente ao analito e PI.

Tabela 18. Amostras branco de plasma do TUDCA.

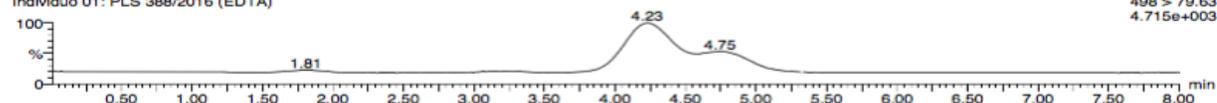
Indivíduo	Descrição	Origem	Lote	Área do fármaco / %	Área do padrão interno
01	Indivíduo 1: EDTA	UNIFAG	PLS 388/2016	-	-
02	Indivíduo 2: EDTA	UNIFAG	PLS 50/2017	-	-
03	Indivíduo 3: EDTA	UNIFAG	PLS 127/2017	-	-
04	Indivíduo 4: EDTA	UNIFAG	PLS 39/2017	-	-
05	Indivíduo 5: EDTA/Lipêmico	UNIFAG	PLS 34/2017	-	-
06	Indivíduo 6: EDTA/Hemolisado	UNIFAG	PLS 139/2017	-	-
07	LIQ 5 ng mL ⁻¹	UNIFAG	PLS 388/2016	200	7311

Nas figuras abaixo estão demonstrados os cromatogramas referentes ao plasma normal (Figuras 30, 31, 32 e 33), ao plasma lipêmico (Figura 33), ao plasma hemolisado (Figura 34) e ao da amostra processada do LIQ (Figura 35) para o TUDCA.

Name: Seletividade_01, Description: Individuo 01: PLS 388/2016 (EDTA), Date: 12-Jun-2017, Time: 13:21:16

Ac.Tauroursodesoxicólico

Seletividade_01 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 01: PLS 388/2016 (EDTA)



Ac.Tauroursodesoxicólico D4

Seletividade_01 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 01: PLS 388/2016 (EDTA)

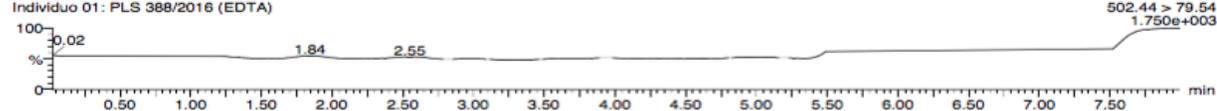
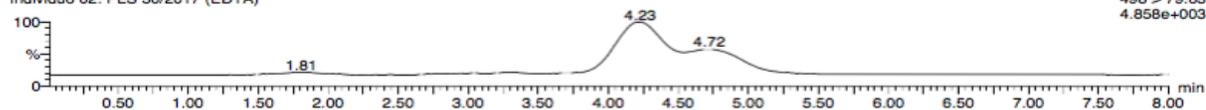


FIGURA 30. Plasma branco normal lote PLS 388/2016 referente ao analito e PI.

Name: Seletividade_02, Description: Individuo 02: PLS 50/2017 (EDTA), Date: 12-Jun-2017, Time: 13:30:16

Ac.Tauroursodesoxicólico

Seletividade_02 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 02: PLS 50/2017 (EDTA)



Ac.Tauroursodesoxicólico D4

Seletividade_02 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 02: PLS 50/2017 (EDTA)

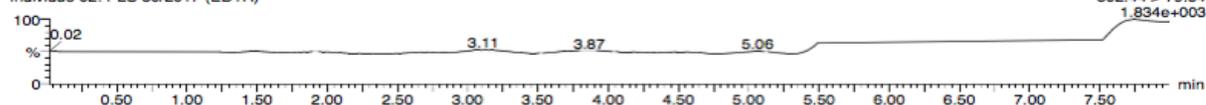
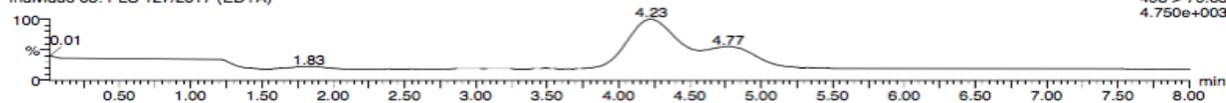


FIGURA 31. Plasma branco normal lote PLS 50/2017 referente ao analito e PI.

Name: Seletividade_03, Description: Individuo 03: PLS 127/2017 (EDTA), Date: 12-Jun-2017, Time: 13:39:17

Ac.Tauroursodesoxicólico

Seletividade_03 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 03: PLS 127/2017 (EDTA)



Ac.Tauroursodesoxicólico D4

Seletividade_03 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 03: PLS 127/2017 (EDTA)

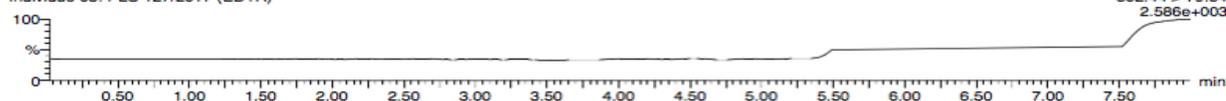
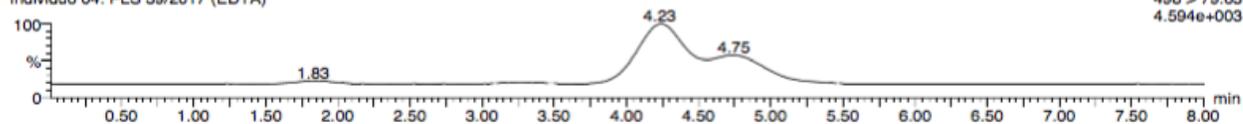


FIGURA 32. Plasma branco normal lote PLS 127/2017 referente ao analito e PI.

Name: Seletividade_04, Description: Individuo 04: PLS 39/2017 (EDTA), Date: 12-Jun-2017, Time: 13:48:17

Ac.Tauroursodesoxicólico

Seletividade_04 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 04: PLS 39/2017 (EDTA)



Ac.Tauroursodesoxicólico D4

Seletividade_04 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 04: PLS 39/2017 (EDTA)

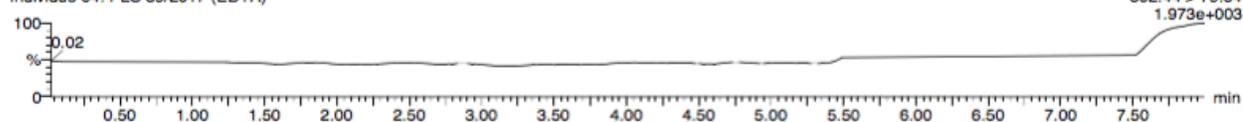


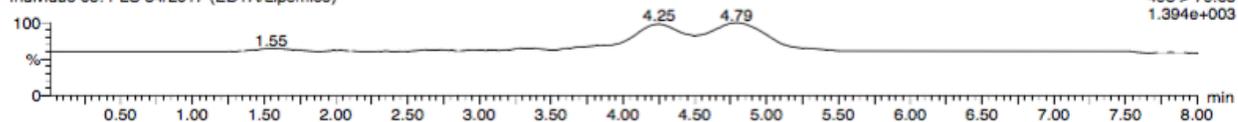
FIGURA 33. Plasma branco normal lote PLS 39/2017 referente ao analito e PI.

Name: Seletividade_05, Description: Individuo 05: PLS 34/2017 (EDTA/Lipemico), Date: 12-Jun-2017, Time: 13:57:16

Ac.Tauroursodesoxicolicico

Seletividade_05 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 05: PLS 34/2017 (EDTA/Lipemico)

F1:MRM of 1 channel,ES-
498 > 79.63
1.394e+003



Ac.Tauroursodesoxicolicico D4

Seletividade_05 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 05: PLS 34/2017 (EDTA/Lipemico)

F2:MRM of 1 channel,ES-
502.44 > 79.54
1.894e+003

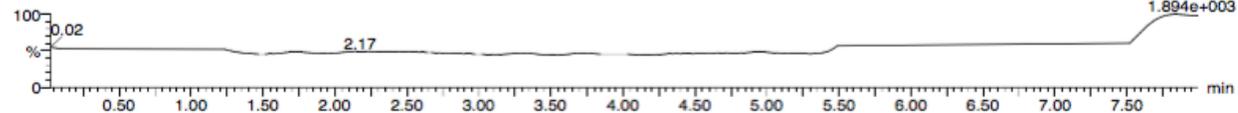


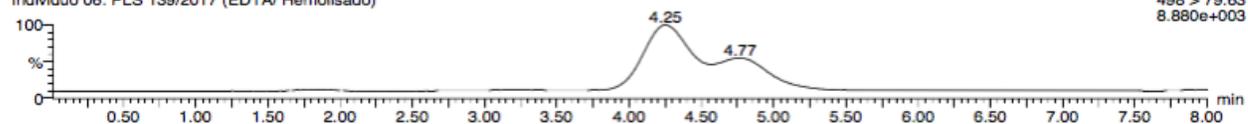
FIGURA 34. Plasma blanco lipemico lote PLS 34/2017 referente ao analito e PI.

Name: Seletividade_06, Description: Individuo 06: PLS 139/2017 (EDTA/ Hemolisado), Date: 12-Jun-2017, Time: 14:06:15

Ac.Tauroursodesoxicolicico

Seletividade_06 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 06: PLS 139/2017 (EDTA/ Hemolisado)

F1:MRM of 1 channel,ES-
498 > 79.63
8.880e+003



Ac.Tauroursodesoxicolicico D4

Seletividade_06 Smooth(Mn,3x3)
Individuo 06: PLS 139/2017 (EDTA/ Hemolisado)

F2:MRM of 1 channel,ES-
502.44 > 79.54
4.439e+003

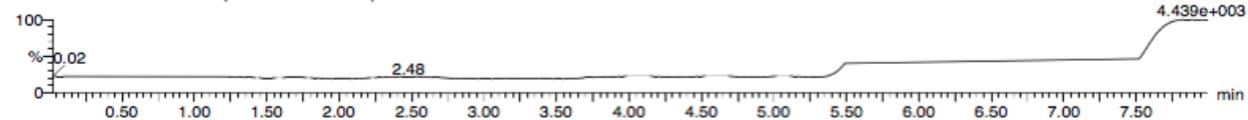


FIGURA 35. Plasma blanco hemolisado lote PLS 139/2017 referente ao analito e PI.

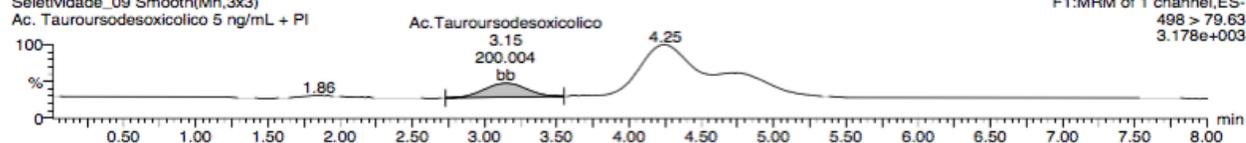
Name: Seletividade_09, Description: Ac. Tauroursodesoxicólico 5 ng/mL + PI, Date: 12-Jun-2017, Time: 14:33:17

Ac.Tauroursodesoxicólico

Seletividade_09 Smooth(Mn,3x3)

Ac. Tauroursodesoxicólico 5 ng/mL + PI

F1:MRM of 1 channel,ES-
498 > 79.63
3.178e+003



Ac.Tauroursodesoxicólico D4

Seletividade_09 Smooth(Mn,3x3)

Ac. Tauroursodesoxicólico 5 ng/mL + PI

F2:MRM of 1 channel,ES-
502.44 > 79.54
2.194e+004

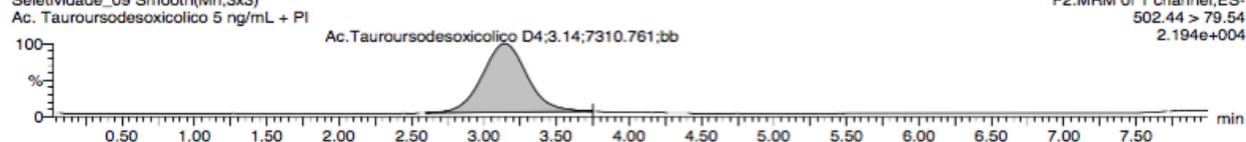


FIGURA 36. Plasma branco normal lote PLS 388/2016 referente ao analito e PI.

4.3.2. Efeito Residual (Carryover)

Para avaliar se existe efeito residual (carryover), foram analisadas 3 (três) injeções da mesma amostra branco, sendo 1 (uma) antes e 2 (duas) logo após a injeção de pelo menos uma amostra processada do LSC. Após a injeção de cada amostra para o ensaio de efeito residual foi realizado a lavagem da agulha com MeOH:H₂O (80:20, v/v), MeOH:H₂O (50:50, v/v) e MeOH:H₂O (50:50, v/v) para o UDCA, GUDCA e TUDCA, respectivamente.

Os resultados foram comparados com aqueles obtidos na amostra processada do LIQ e estão apresentados na Tabela 19, 20 e 21 para os três ativos, respectivamente.

Tabela 19. Efeito Residual (Carryover) do UDCA.

Amostra	Área do fármaco	Área do padrão interno
Ácido ursodesoxicólico 15 ng mL ⁻¹ (LIQ)	1325	30372
Branco	-	-
Ácido ursodesoxicólico 10000 ng mL ⁻¹ (LSC)	239288	26587
Branco	-	-
Branco	-	-

Tabela 20. Efeito Residual (Carryover) do GUDCA.

Amostra	Área do fármaco	Área do padrão interno
Ácido glicoursodesoxicólico 15 ng mL ⁻¹ (LIQ)	961	28342
Branco	-	-
Ácido glicoursodesoxicólico 10000 ng mL ⁻¹ (LSC)	417958	25094
Branco	-	-
Branco	-	-

Tabela 21. Efeito Residual (Carryover) do TUDCA.

Amostra	Área do fármaco	Área do padrão interno
Ácido tauroursodesoxicólico 5 ng mL ⁻¹ (LIQ)	182	7239
Branco	-	-
Ácido tauroursodesoxicólico 500 ng mL ⁻¹ (LSC)	15194	7083
Branco	-	-
Branco	-	-

4.3.3. Efeito de Matriz

Para avaliar se existe efeito de matriz, foram analisadas amostras de 8 (oito) fontes distintas, sendo 4 normais, 2 lipêmicas e 2 hemolisadas, adicionando-se posteriormente analito e PI nas mesmas concentrações de CQB e CQA.

Os resultados foram avaliados a partir do cálculo do fator de matriz normalizado (FMN), e estão apresentados na Tabela 22, 23 e 24 para os três ativos, respectivamente.

Tabela 22. Efeito de matriz do UDCA.

Amostra	Resposta Analito/ Resposta PI na Matriz		Resposta Analito/ Resposta PI na Solução		FMN*	
	CQB	CQA	CQB	CQA	CQB	CQA
PLS 148/2017	0,069	10,808	0,072	10,884	1,004	1,013
PLS 112/2017	0,082	10,410	0,067	10,677	1,193	0,976
PLS 87/2017	0,079	10,720	0,067	10,674	1,149	1,005
PLS 24/2017	0,073	10,687	0,068	10,587	1,062	1,002
PLS 467/2016 (Lipêmico)	0,074	10,619	0,067	10,614	1,076	0,995
PLS 33/2017 (Lipêmico)	0,070	10,742	0,065	10,500	1,018	1,007
PLS 25/2017 (Hemolisado)	0,073	10,744	0,069	10,654	1,062	1,007
PLS 463/2016 (Hemolisado)	0,077	10,922	0,075	10,773	1,120	1,024
Média			0,069	10,670	1,085	1,003
DP					0,065	0,014
CV (%)					5,947	1,392
Média FMN de todos Controles (n=16)					1,044	
DP (n=16)					0,062	
CV (%)					5,927	

DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e FMN= Fator de Matriz Normalizado.

*Este parâmetro (FMN) foi obtido utilizando Resposta em Matriz Individual / Média da Resposta em Solução.

Tabela 23. Efeito de matriz do GUDCA.

Amostra	Resposta Analito/ Resposta PI na Matriz		Resposta Analito/ Resposta PI na Solução		FMN*	
	CQB	CQA	CQB	CQA	CQB	CQA
PLS 65/2017	0,092	12,804	0,088	13,445	1,050	0,969
PLS 453/2016	0,069	12,848	0,088	13,093	0,787	0,972
PLS 147/2017	0,095	13,024	0,092	13,094	1,084	0,985
PLS 128/2017	0,091	12,870	0,086	13,280	1,039	0,974
PLS 464/2016 (Lipêmico)	0,095	12,819	0,087	13,113	1,084	0,970
PLS 34/2017 (Lipêmico)	0,095	12,924	0,085	13,171	1,084	0,978
PLS 36/2017 (Hemolisado)	0,096	13,185	0,090	13,345	1,096	0,998
PLS 139/2017 (Hemolisado)	0,094	12,825	0,085	13,199	1,073	0,970
Média			0,088	13,218	1,037	0,977
DP					0,103	0,010
CV (%)					9,903	1,018
Média FMN de todos Controles (n=16)					1,007	
DP (n=16)					0,077	
CV (%)					7,650	

DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e FMN= Fator de Matriz Normalizado.

*Este parâmetro (FMN) foi obtido utilizando Resposta em Matriz Individual / Média da Resposta em Solução.

Tabela 24. Efeito de matriz do TUDCA.

Amostra	Resposta Analito / Resposta PI na Matriz		Resposta Analito / Resposta PI na Solução		FMN*	
	CQB	CQA	CQB	CQA	CQB	CQA
PLS 388/2016	0,064	1,816	0,066	1,821	0,968	1,012
PLS 50/2017	0,065	1,794	0,066	1,780	0,983	1,000
PLS 127/2017	0,065	1,789	0,066	1,776	0,983	0,997
PLS 39/2017	0,066	1,805	0,064	1,782	0,998	1,006
PLS 34/2017 (Lipêmico)	0,070	1,776	0,066	1,772	1,059	0,990
PLS 464/2016 (Lipêmico)	0,068	1,726	0,066	1,784	1,028	0,962
PLS 36/2017 (Hemolisado)	0,067	1,803	0,071	1,810	1,013	1,005
PLS 139/2017 (Hemolisado)	0,067	1,755	0,064	1,829	1,013	0,978
Média			0,066	1,794	1,006	0,994
DP					0,029	0,017
CV (%)					2,898	1,671
Média FMN de todos Controles (n=16)					1,000	
DP (n=16)					0,024	
CV (%)					2,374	

DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e FMN= Fator de Matriz Normalizado.

*Este parâmetro (FMN) foi obtido utilizando Resposta em Matriz Individual / Média da Resposta em Solução.

4.3.4. Curva de Calibração

A linearidade da curva de calibração foi avaliada dentro dos seguintes critérios:

- Desvio menor ou igual a 20% em relação a concentração nominal para o LIQ.
- Desvio menor ou igual a $\pm 15\%$ em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração.
- Desvio menor ou igual a 15% em relação a concentração nominal para o Limite Superior da Curva.
- No mínimo 75% das concentrações da curva de calibração devem cumprir com os critérios acima descritos, incluindo o LIQ e o Limite Superior da Curva de calibração.

Os dados referentes às 3 (três) curvas de calibração estão apresentados nas Tabelas 25, 26 e 27, assim como, os gráficos correspondentes nas Figuras 37, 38 e 39.

Tabela 25. Dados das curvas de calibração de UDCA.

Conc. nominal (ng mL ⁻¹)	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
	Conc. Experimental (ng mL ⁻¹)	Desvio (%)	Conc. Experimental (ng mL ⁻¹)	Desvio (%)	Conc. Experimental (ng mL ⁻¹)	Desvio (%)
15	14,446	-3,69	14,635	-2,44	15,282	1,88
50	55,624	11,25	54,570	9,14	37,511	-24,98*
100	102,702	2,70	97,945	-2,05	86,926	-13,07
1000	957,397	-4,26	1018,494	1,85	1009,823	0,98
2000	1967,726	-1,61	1966,279	-1,69	2139,443	6,97
4000	3991,371	-0,22	3893,776	-2,66	4109,517	2,74
6000	5791,528	-3,47	5968,888	-0,52	6120,767	2,01
10000	9930,706	-0,69	9836,070	-1,64	9848,776	-1,51
Equação	y = 0,00139156x + 0,0191452		y = 0,00134053x + 0,0230972		y = 0,00130278x + 0,0385574	

* Desvios acima do limite permitido de 15%, este valor não foi incluído no cálculo da equação da curva.

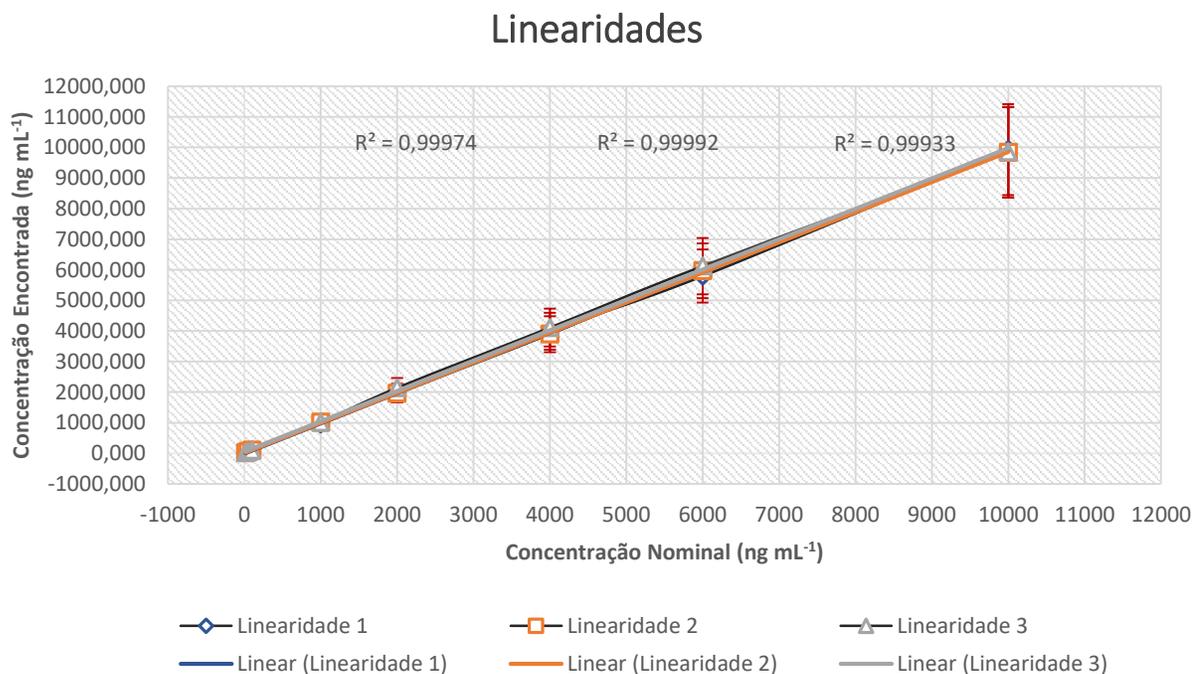


FIGURA 37. Representação gráfica das linearidades UDCA.

Tabela 26. Dados das curvas de calibração de GUDCA.

Conc. nominal (ng mL ⁻¹)	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
	Conc. Experimental (ng mL ⁻¹)	Desvio (%)	Conc. Experimental (ng mL ⁻¹)	Desvio (%)	Conc. Experimental (ng mL ⁻¹)	Desvio (%)
15	14,906	-0,63	14,932	-0,45	15,131	0,87
50	50,538	1,08	50,543	1,09	48,650	-2,70
100	102,042	2,04	100,792	0,79	99,197	-0,80
1000	991,528	-0,85	1010,979	1,10	1036,006	3,60
2000	2037,794	1,89	1988,106	-0,59	2017,091	0,85
4000	4036,213	0,91	3938,251	-1,54	4044,814	1,12
6000	5974,005	-0,43	6082,838	1,38	5968,408	-0,53
10000	9599,408	-4,01	9823,318	-1,77	9758,223	-2,42
Equação	y = 0,0019909x + 0,00610845		y = 0,00199617x + 0,00795389		y = 0,00196984x + 0,00750074	

Linearidades

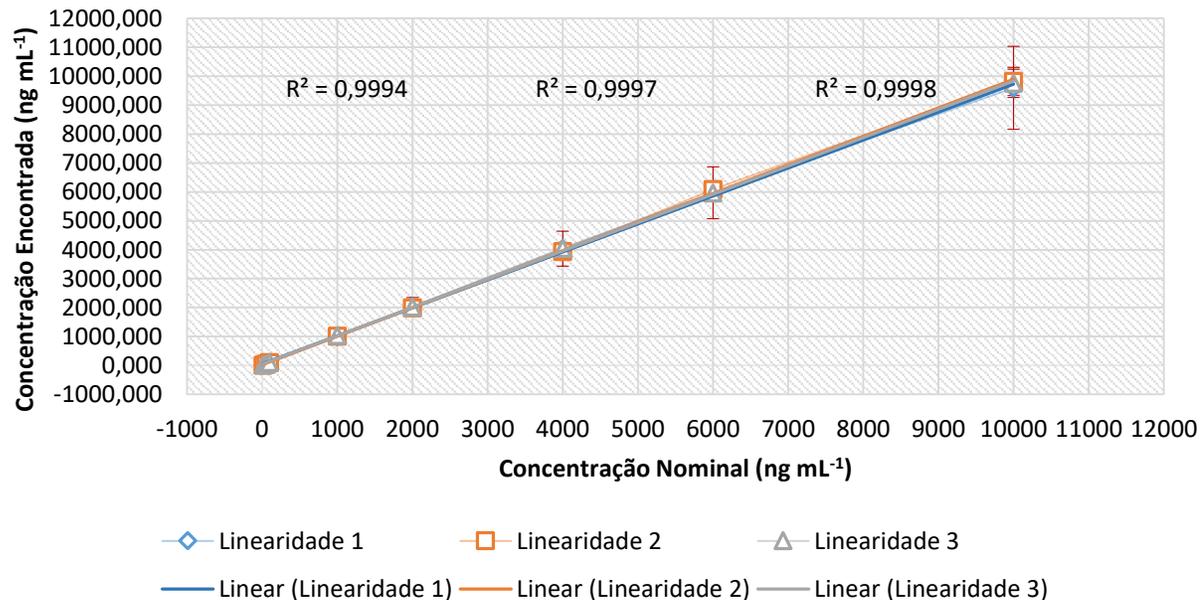


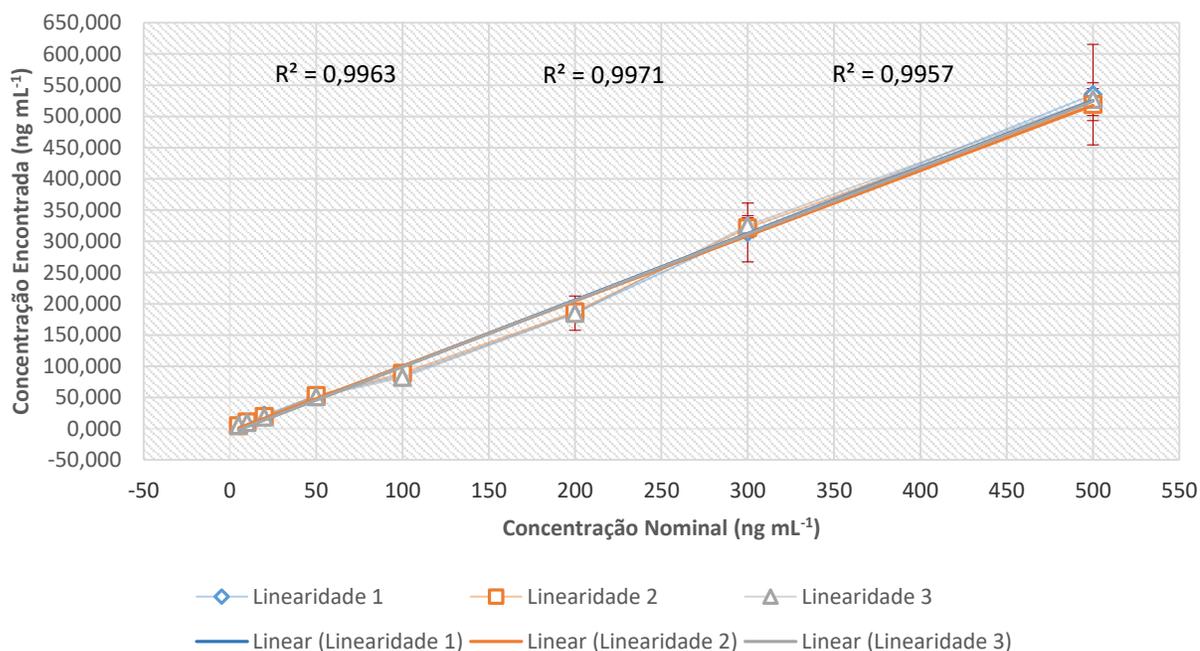
FIGURA 38. Representação gráfica das linearidades do GUDCA.

Tabela 27. Dados das curvas de calibração de TUDCA.

Conc. nominal (ng mL ⁻¹)	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
	Conc. Experimental (ng mL ⁻¹)	Desvio (%)	Conc. Experimental (ng mL ⁻¹)	Desvio (%)	Conc. Experimental (ng mL ⁻¹)	Desvio (%)
5	4,932	-1,37	4,871	-2,58	5,162	3,24
10	9,956	-0,44	10,692	6,92	9,750	-2,50
20	21,486	7,43	19,238	-3,81	18,245	-8,77
50	52,590	5,18	53,262	6,52	51,009	2,02
100	85,046	-14,95	88,543	-11,46	81,921	-18,08*
200	184,987	-7,51	186,820	-6,59	184,426	-7,79
300	313,981	4,66	321,609	7,20	324,854	8,28
500	534,977	7,00	518,950	3,79	527,573	5,51
Equação	y = 0,00403375x + 0,0125843		y = 0,00412367x + 0,0123351		y = 0,00427581x + 0,010892	

* Desvios acima do limite permitido de 15%, este valor não foi incluído no cálculo da equação da curva.

Linearidades

**FIGURA 39.** Representação gráfica das linearidades do TUDCA.

4.3.5. Precisão e Exatidão: Validação intracorrida

A precisão e exatidão intracorrida foram determinadas utilizando-se lotes contendo as concentrações de CQB, CQM, CQA, CQD e LIQ.

Os resultados das análises intracorrida estão apresentados nas Tabelas 28, 29 e 30 e nas Figuras 40, 41 e 42 para o UDCA.

Tabela 28. Análise intracorrida dos controles de qualidade CQB, CQM e CQA de UDCA.

Réplicas	CQB (lote 1)	CQB (lote 3)	CQB (lote 4)	CQM (lote 1)	CQM (lote 3)	CQM (lote 4)	CQA (lote 1)	CQA (lote 3)	CQA (lote 4)
1	42,937	48,232	43,368	5059,116	4938,003	5034,173	7800,461	8064,551	8100,458
2	46,268	49,659	38,383	4890,471	4983,678	5176,529	7772,815	8094,350	7898,155
3	35,871	43,679	48,232	4945,182	5007,768	5094,032	7764,136	8116,010	8023,432
4	40,883	43,896	45,705	4910,271	4832,111	5117,485	7894,919	7863,502	7955,561
5	42,733	46,134	43,200	4838,019	4969,694	5041,345	7798,731	8189,372	8302,712
6	40,511	45,217	34,501	5033,431	5032,610	4896,208	8065,449	8062,161	7914,531
7	51,355	47,444	41,767	5160,019	4895,598	5021,632	7817,152	7790,191	8065,026
8	41,764	54,042	54,531	4978,620	5138,064	4938,226	7914,393	8030,848	8199,134
9	45,883	45,080	52,383	4911,008	5102,559	4910,553	7745,523	7971,592	7958,597
Média	43,134	47,043	44,674	4969,571	4988,898	5025,576	7841,509	8020,286	8046,401
DP	4,355	3,291	6,381	99,720	95,988	96,083	101,452	125,976	136,082
CV (%)	10,097	6,995	14,283	2,007	1,924	1,912	1,294	1,571	1,691
EPR (%)	-4,147	4,539	-0,723	-0,609	-0,222	0,512	-1,981	0,254	0,580

Concentração Nominal: CQB = 45 ng mL⁻¹, CQM = 5000 ng mL⁻¹ e CQA = 8000 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

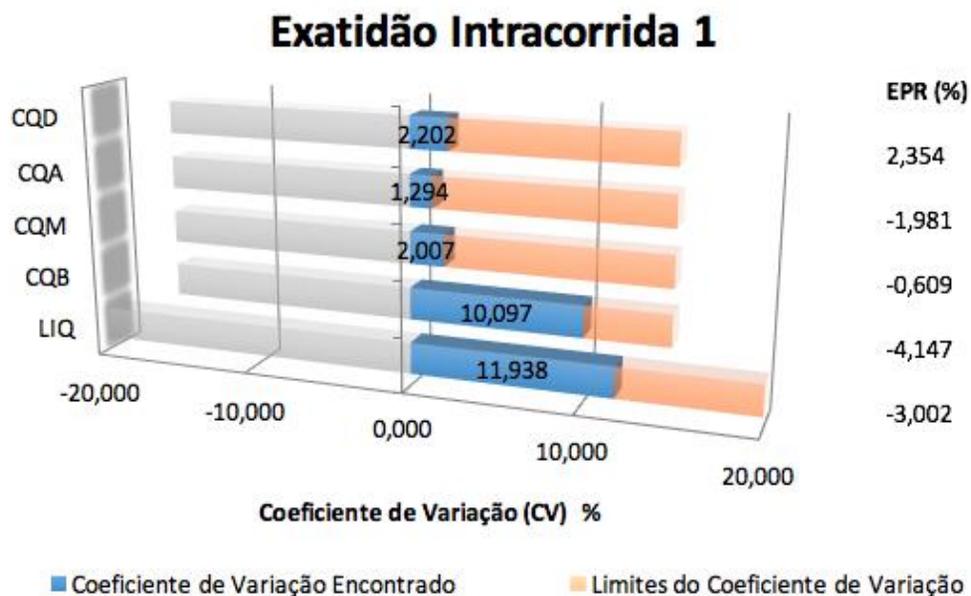


FIGURA 40. Resultados obtidos das análises intra-lote (lote 1) dos controles de qualidade e do LQ para matriz (plasma) normal de UDCA.

TABELA 29. Análise intracorrida do controle de qualidade CQD (diluído com plasma branco, usando uma diluição de 1:3) para UDCA.

Replicatas	CQD (lote 1)	CQD (lote 3)	CQD (lote 4)
1	4319,418	4344,419	4407,700
2	4350,232	4364,708	4408,992
3	4478,437	4233,289	4243,121
4	4322,103	4439,703	4302,394
5	4188,107	4268,515	4375,605
6	4505,645	4237,319	4392,097
7	4355,921	4175,361	4210,778
8	4349,207	4305,616	4247,717
9	4281,145	4332,987	4466,890
Média	4350,024	4300,213	4339,477
DP	95,800	80,391	90,442
CV (%)	2,202	1,869	2,084
EPR (%)	2,354	1,181	2,105

Concentração Nominal Diluída: CQD = 4250 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

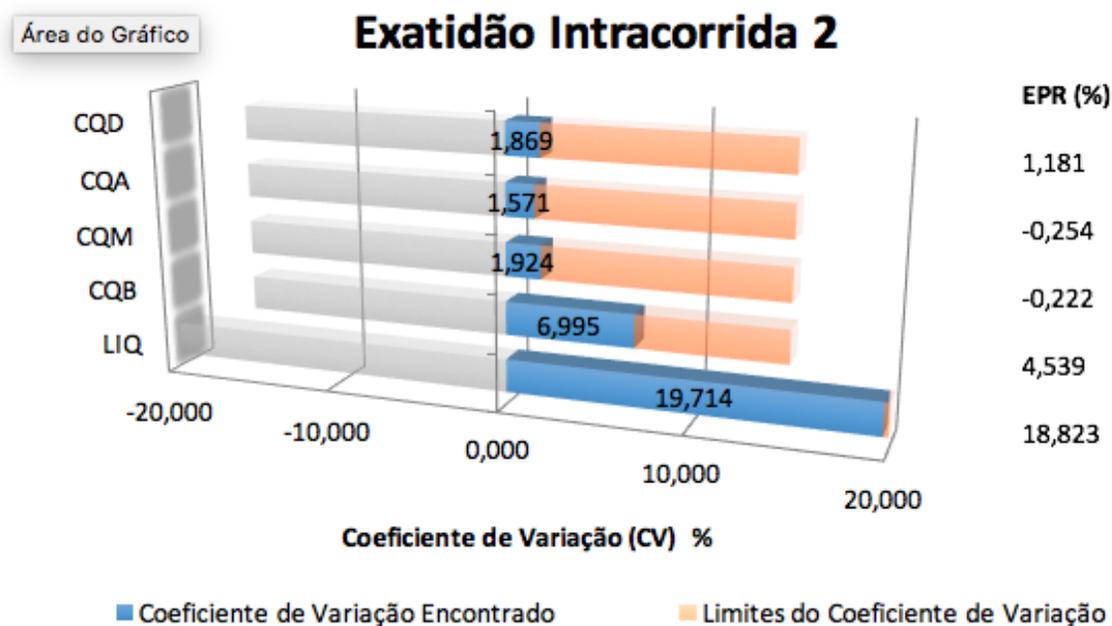


FIGURA 41. Resultados obtidos das análises intra-lote (lote 2) dos controles de qualidade e do LIQ para matriz (plasma) normal de UDCA.

TABELA 30. Análise intracorrida do controle de qualidade LIQ de UDCA.

Replicatas	LIQ (lote 6)	LIQ (lote 7)	LIQ (lote 8)
1	15,556	17,576	12,876
2	15,073	26,553	15,242
3	15,486	16,889	16,865
4	15,723	16,862	17,346
5	11,539	15,606	11,991
6	11,856	14,844	15,099
7	13,917	19,077	12,066
8	15,555	15,540	17,586
9	16,242	17,464	13,886
Média	14,550	17,823	14,773
DP	1,737	3,514	2,199
CV (%)	11,938	19,714	14,886
EPR (%)	-3,002	18,823	-1,513

Concentração Nominal: LIQ = 15 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

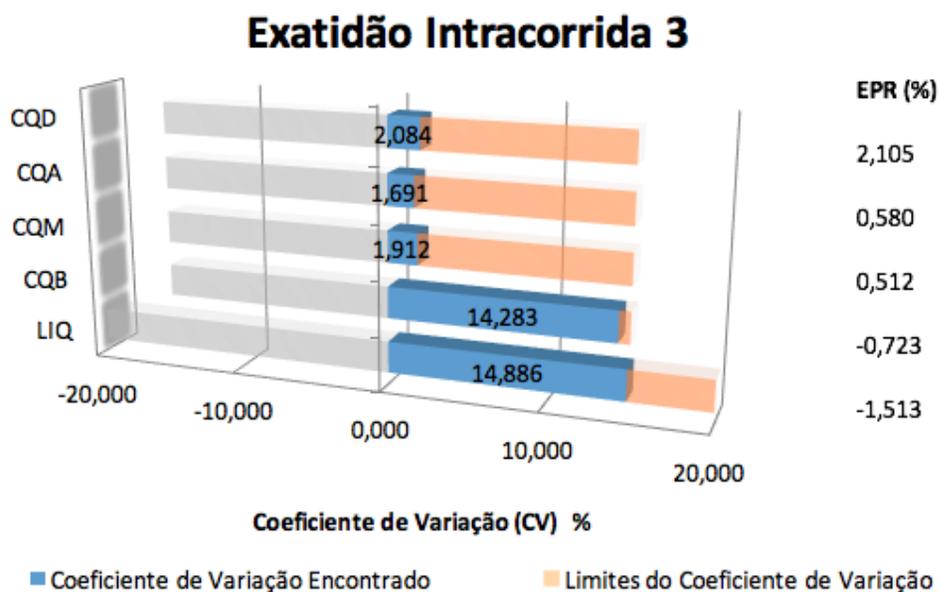


FIGURA 42. Resultados obtidos das análises intra-lote (lote 3) dos controles de qualidade e do LIQ para matriz (plasma) normal do UDCA.

Os resultados das análises intracorrída estão apresentados nas Tabelas 31, 32 e 33 e nas Figuras 43, 44 e 45 para o GUDCA.

TABELA 31. Análise intracorrida dos controles de qualidade CQB, CQM e CQA de GUDCA.

Réplicas	CQB (lote 1)	CQB (lote 2)	CQB (lote 3)	CQM (lote 1)	CQM (lote 2)	CQM (lote 3)	CQA (lote 1)	CQA (lote 2)	CQA (lote 3)
1	52,991	44,028	42,885	4737,555	5118,198	4769,366	8046,023	8053,081	7745,047
2	49,265	50,997	46,802	5087,259	5134,282	5051,911	8014,004	8226,989	7940,033
3	49,583	49,577	43,873	4989,421	5085,059	5030,231	8040,710	7953,166	7948,807
4	48,545	47,215	45,917	4984,061	5179,974	5072,581	7996,381	8028,415	8042,292
5	49,321	48,256	47,442	5013,309	5165,256	5007,383	8000,062	7793,443	7879,569
6	48,023	51,623	45,645	4960,306	5106,975	5132,615	7981,114	7835,735	7913,276
7	51,574	49,145	43,983	5136,551	5087,524	4950,345	7933,994	7894,688	7962,699
8	49,996	48,351	47,598	4996,648	5242,800	4937,802	7736,357	7749,960	7941,035
9	47,049	51,291	45,377	5171,884	5109,504	4968,142	8162,365	7887,982	7981,175
Média	49,594	48,943	45,502	5008,555	5136,619	4991,153	7990,112	7935,940	7928,215
DP	1,798	2,380	1,653	125,575	51,237	103,896	113,847	148,415	82,064
CV (%)	3,625	4,863	3,633	2,507	0,997	2,082	1,425	1,870	1,035
EPR (%)	10,209	8,761	1,117	0,171	2,732	-0,177	-0,124	-0,801	-0,897

Concentração Nominal: CQB = 45 ng mL⁻¹, CQM = 5000 ng mL⁻¹ e CQA = 8000 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

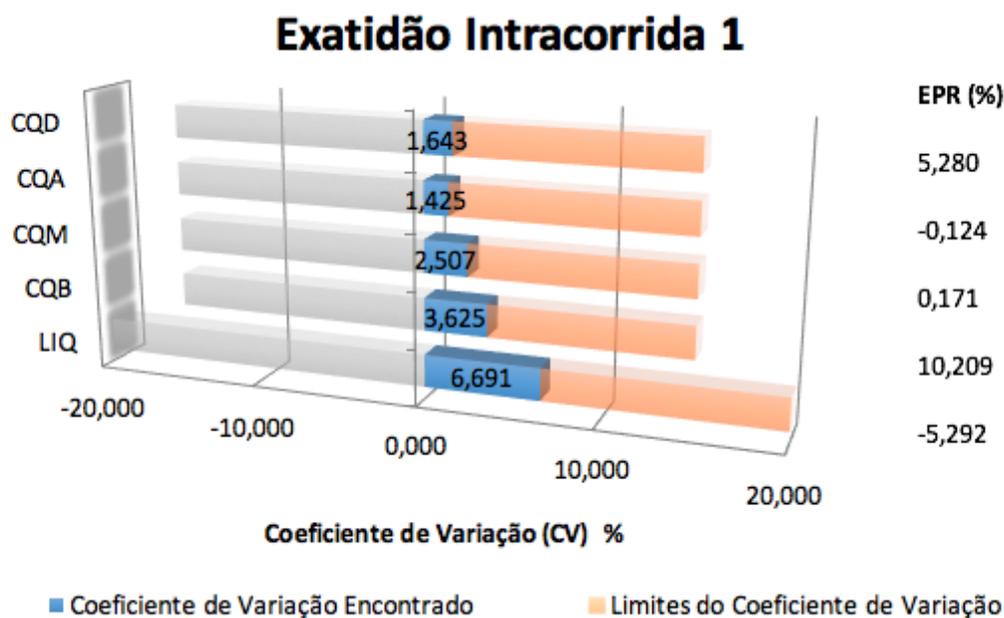


FIGURA 43. Resultados obtidos das análises intra-lote (lote 1) dos controles de qualidade e do LIQ para matriz (plasma) normal de GUDCA.

TABELA 32. Análise intracorrida do controle de qualidade CQD (diluído com plasma branco, usando uma diluição de 1:3) para GUDCA.

Replicatas	CQD (lote 1)	CQD (lote 2)	CQD (lote 3)
1	4392,020	4383,650	4190,198
2	4524,253	4415,823	4610,887
3	4414,651	4309,285	4414,068
4	4387,503	4405,789	4447,256
5	4487,126	4331,870	4379,782
6	4472,789	4352,902	4364,732
7	4528,563	4350,610	4429,616
8	4612,784	4322,452	4371,347
9	4449,821	4340,127	4382,674
Média	4474,390	4356,945	4398,951
DP	73,523	37,072	108,721
CV (%)	1,643	0,851	2,472
EPR (%)	5,280	2,516	3,505

Concentração Nominal Diluída: CQD = 4250 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

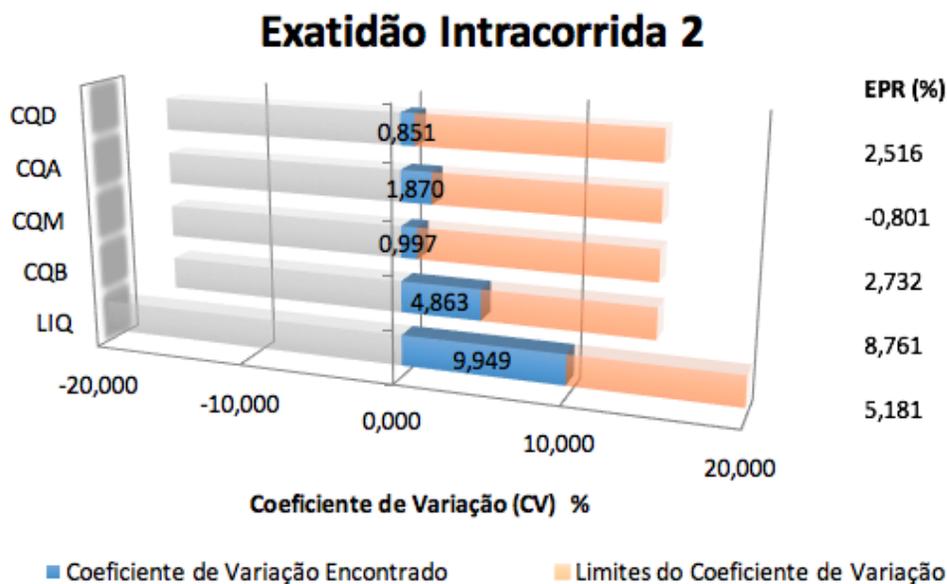
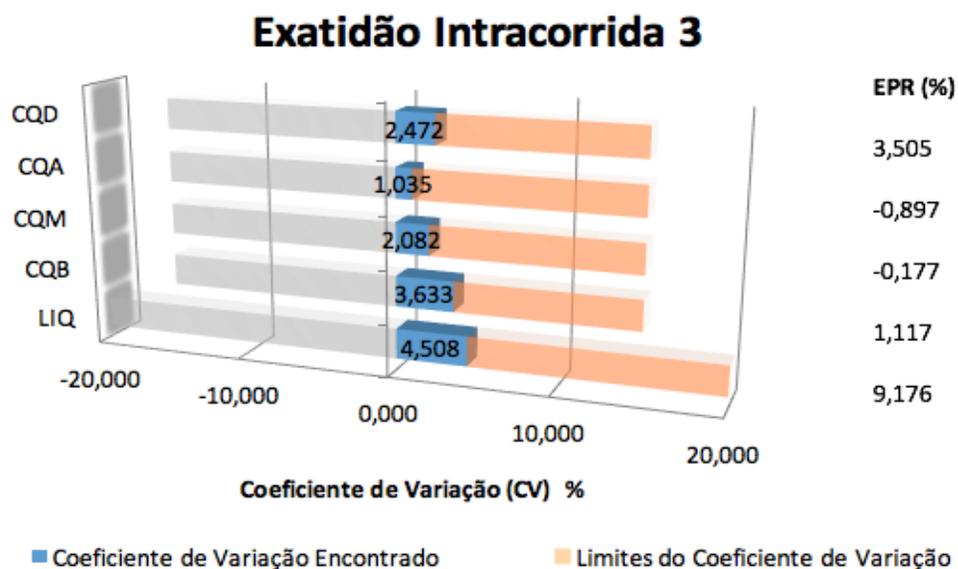


FIGURA 44. Resultados obtidos das análises intra-lote (lote 2) dos controles de qualidade e do LIQ para matriz (plasma) normal de GUDCA.

TABELA 33. Análise intracorrida do controle de qualidade LIQ de GUDCA.

Replicatas	LIQ (lote 1)	LIQ (lote 2)	LIQ (lote 3)
1	14,680	14,628	15,330
2	14,744	17,114	16,514
3	14,187	14,287	16,275
4	14,139	17,878	16,436
5	14,638	14,355	17,553
6	12,292	15,823	16,191
7	13,086	15,680	17,448
8	15,359	14,152	15,666
9	14,731	18,078	15,975
Média	14,206	15,777	16,376
DP	0,951	1,570	0,738
CV (%)	6,691	9,949	4,508
EPR (%)	-5,292	5,181	9,176

Concentração Nominal: LIQ = 15 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

**FIGURA 45.** Resultados obtidos das análises intra-lote (lote 3) dos controles de qualidade e do LIQ para matriz (plasma) normal de GUDCA.

Os resultados das análises intracorrída estão apresentados nas Tabelas 34, 35 e 36 e nas Figuras 46, 47 e 48 para o TUDCA.

TABELA 34. Análise intracorrída dos controles de qualidade CQB, CQM e CQA de TUDCA.

Réplicas	CQB (lote 2)	CQB (lote 3)	CQB (lote 4)	CQM (lote 2)	CQM (lote 3)	CQM (lote 4)	CQA (lote 2)	CQA (lote 3)	CQA (lote 4)
1	14,921	15,095	13,918	242,750	274,462	249,977	378,692	410,344	388,441
2	14,028	15,769	14,469	242,625	258,308	247,716	389,617	409,043	383,525
3	14,745	13,767	15,070	248,511	257,457	238,979	385,260	415,893	384,224
4	14,967	14,698	15,552	238,208	262,063	240,431	374,190	416,787	387,881
5	15,122	15,263	14,906	242,102	239,820	236,259	380,243	412,562	400,144
6	15,572	14,069	15,724	238,759	257,869	233,571	384,140	409,581	392,492
7	15,497	15,294	14,990	242,978	250,122	249,425	394,347	403,607	383,327
8	15,281	14,430	14,741	245,080	263,750	240,386	389,088	402,457	398,730
9	13,451	15,898	14,958	236,330	254,909	241,035	384,261	424,968	402,042
Média	14,843	14,920	14,925	241,927	257,640	241,975	384,426	411,694	391,201
DP	0,695	0,734	0,538	3,721	9,500	5,816	6,155	6,933	7,451
CV (%)	4,681	4,919	3,603	1,538	3,687	2,403	1,601	1,684	1,905
EPR (%)	-1,049	-0,531	-0,498	-3,229	3,056	-3,210	-3,893	2,923	-2,200

Concentração Nominal: CQB = 15 ng mL⁻¹, CQM = 250 ng mL⁻¹ e CQA = 400 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

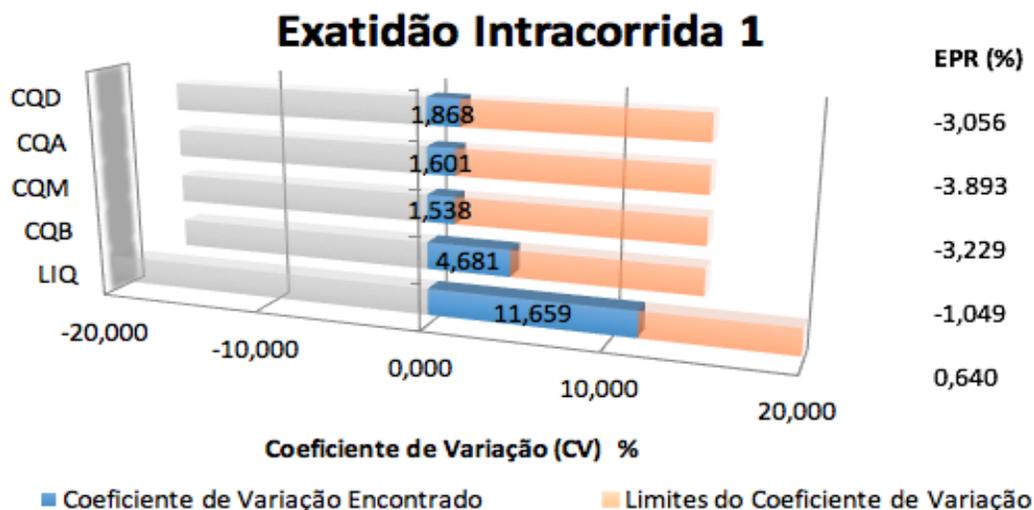


FIGURA 46. Resultados obtidos das análises intra-lote (lote 1) dos controles de qualidade e do LQ para matriz (plasma) normal de TUDCA.

TABELA 35. Análise intracorrida do controle de qualidade CQD (diluído com plasma branco, usando uma diluição de 1:3) para TUDCA.

Replicatas	CQD (lote 2)	CQD (lote 3)	CQD (lote 4)
1	206,416	221,936	218,113
2	205,070	222,931	221,912
3	209,863	222,821	209,038
4	203,266	218,480	213,565
5	210,344	222,199	217,294
6	199,512	217,905	222,474
7	205,031	219,267	220,032
8	211,142	216,932	216,879
9	203,405	226,952	193,700
Média	206,005	221,047	214,779
DP	3,849	3,167	8,932
CV (%)	1,868	1,433	4,159
EPR (%)	-3,056	4,022	1,072

Concentração Nominal Diluída: CQD = 212,5 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

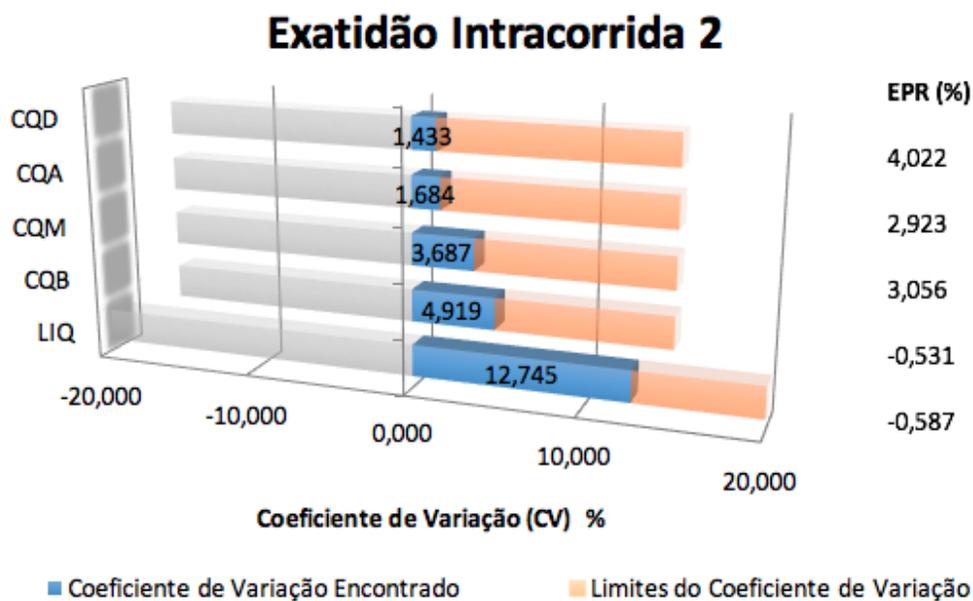
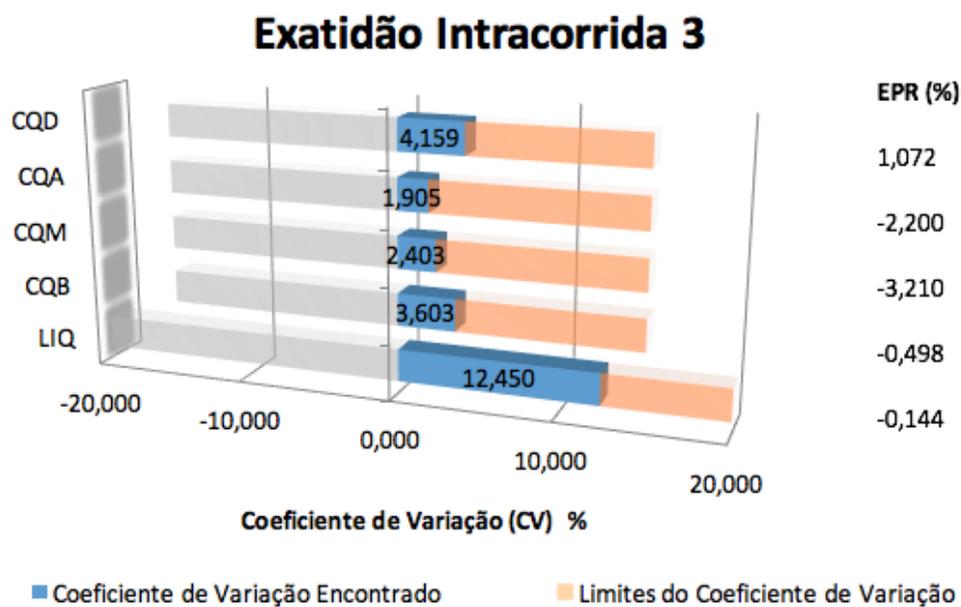


FIGURA 47. Resultados obtidos das análises intra-lote (lote 2) dos controles de qualidade e do LIQ para matriz (plasma) normal de TUDCA.

TABELA 36. Análise intracorrida do controle de qualidade LIQ de TUDCA.

Replicatas	LIQ (lote 2)	LIQ (lote 3)	LIQ (lote 4)
1	4,677	4,897	5,775
2	4,585	5,650	4,118
3	5,407	4,899	5,574
4	4,681	4,706	5,491
5	4,502	4,171	4,448
6	5,589	5,226	5,082
7	4,654	5,397	4,263
8	4,967	5,836	4,724
9	6,226	3,954	5,460
Média	5,032	4,971	4,993
DP	0,587	0,634	0,622
CV (%)	11,659	12,745	12,450
EPR (%)	0,640	-0,587	-0,144

Concentração Nominal: LIQ = 5 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

**FIGURA 48.** Resultados obtidos das análises intra-lote (lote 3) dos controles de qualidade e do LQ para matriz (plasma) normal de TUDCA.

4.3.6. Precisão e exatidão: Validação intercorridas

Os seguintes critérios foram seguidos para considerar a precisão e exatidão intercorridas aprovadas:

- Precisão: para os controles CQB, CQM, CQA e CQD o coeficiente de variação (CV) não deveria exceder $\pm 15\%$ e para o LIQ não deveria exceder $\pm 20\%$.
- Exatidão: o valor da exatidão (expresso pelo Erro Padrão Relativo – EPR) para as amostras CQB, CQM, CQA e CQD dentro do desvio de $\pm 15\%$ do valor nominal e para o LIQ, admitiu-se valores dentro do desvio de $\pm 20\%$.

Nas Tabelas 37, 38 e 39 e na Figura 49, estão apresentados os resultados obtidos na avaliação da precisão e exatidão intercorridas utilizando-se todos os valores obtidos de concentração dos controles de qualidade (LIQ, CQB, CQM, CQA, CQD) para o UDCA.

TABELA 37. Análise intercorridas dos controles de qualidade CQB, CQM e CQA de UDCA.

	CQB	CQM	CQA
Média	44,950	4994,682	7969,399
DP	4,938	96,413	149,527
CV (%)	10,984	1,930	1,876
EPR (%)	-0,110	-0,106	-0,383

Concentração Nominal: CQB = 45 ng mL⁻¹, CQM = 5000 ng mL⁻¹ e CQA = 8000 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

TABELA 38. Análise intercorridas do controle de qualidade CQD (diluído com plasma branco, usando uma diluição de 1:3) de UDCA.

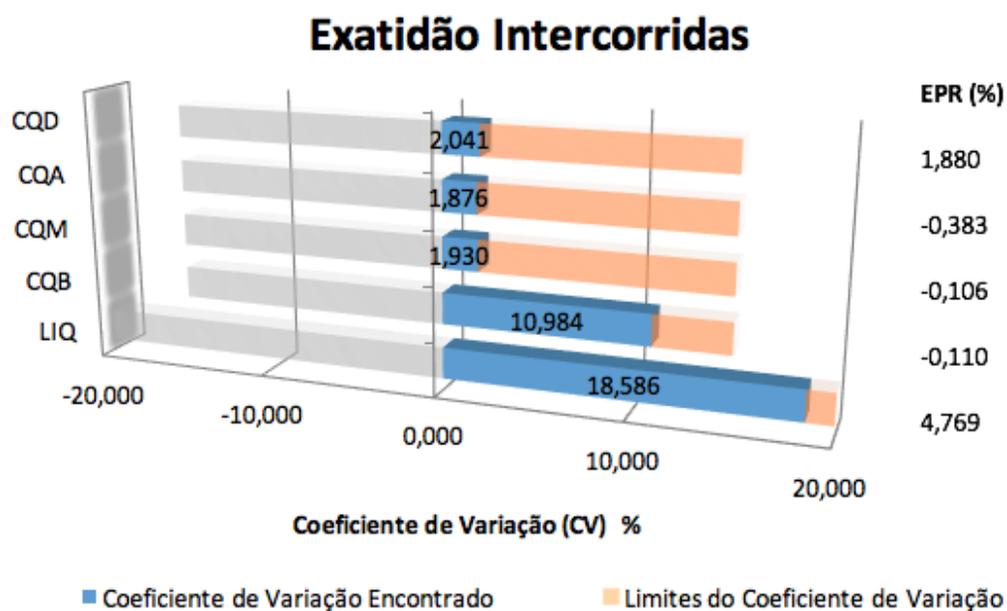
	CQD
Média	4329,905
DP	88,353
CV (%)	2,041
EPR (%)	1,880

Concentração Nominal Diluída: CQD = 4250 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

TABELA 39. Análise intercorridas do controle de qualidade LIQ de UDCA.

	LIQ
Média	15,715
DP	2,921
CV (%)	18,586
EPR (%)	4,769

Concentração Nominal: LIQ = 15 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

**FIGURA 49.** Resultados obtidos das análises interlote dos controles de qualidade e do LIQ para matriz (plasma) normal de UDCA.

Nas Tabelas 40, 41 e 42 e na Figura 50, estão apresentados os resultados obtidos na avaliação da precisão e exatidão intercorridas utilizando-se todos os valores obtidos de concentração dos controles de qualidade (LIQ, CQB, CQM, CQA, CQD) para o GUDCA.

TABELA 40. Análise intercorridas dos controles de qualidade CQB, CQM e CQA de GUDCA.

	CQB	CQM	CQA
Média	48,013	5045,442	7951,422
DP	2,631	115,542	116,727
CV (%)	5,481	2,290	1,468
EPR (%)	6,696	0,909	-0,607

Concentração Nominal: CQB = 45 ng mL⁻¹, CQM = 5000 ng mL⁻¹ e CQA = 8000 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

TABELA 41. Análise intercorridas do controle de qualidade CQD (diluído com plasma branco, usando uma diluição de 1:3) de GUDCA.

	CQD
Média	4410,095
DP	90,415
CV (%)	2,050
EPR (%)	3,767

Concentração Nominal Diluída: CQD = 4250 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

TABELA 42. Análise intercorridas do controle de qualidade LIQ de GUDCA.

	LIQ
Média	15,453
DP	1,440
CV (%)	9,318
EPR (%)	3,022

Concentração Nominal: LIQ = 15 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

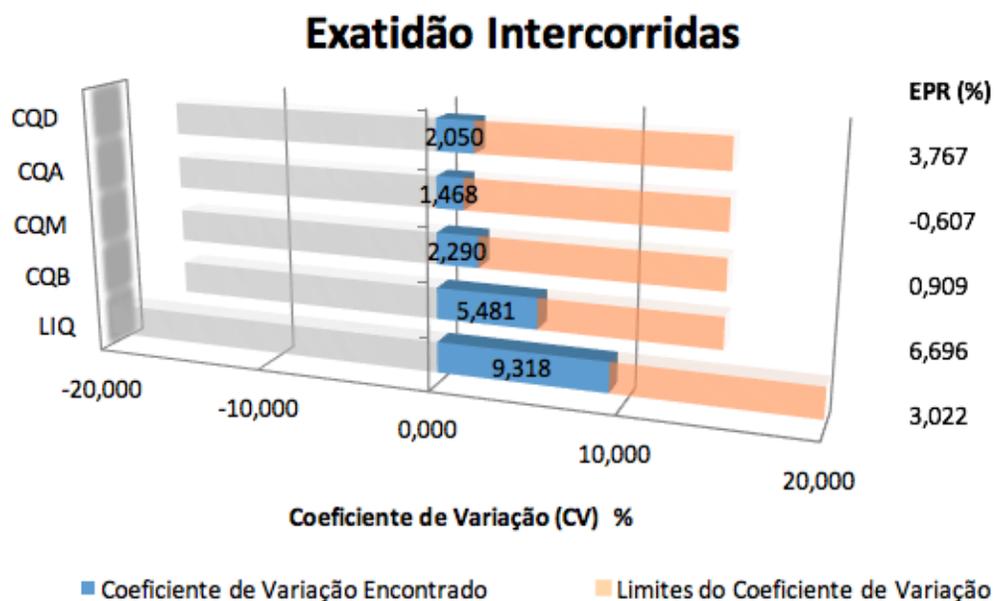


FIGURA 50. Resultados obtidos das análises interlote dos controles de qualidade e do LIQ para matriz (plasma) normal de GUDCA.

Nas Tabelas 43, 44 e 45 e na Figura 51, estão apresentados os resultados obtidos na avaliação da precisão e exatidão intercarradas utilizando-se todos os valores obtidos de concentração dos controles de qualidade (LIQ, CQB, CQM, CQA, CQD) para o TUDCA.

TABELA 43. Análise intercarradas dos controles de qualidade CQB, CQM e CQA de TUDCA.

	CQB	CQM	CQA
Média	14,896	247,181	395,774
DP	0,636	9,962	13,530
CV (%)	4,271	4,030	3,419
EPR (%)	-0,693	-1,128	-1,057

Concentração Nominal: CQB = 15 ng mL⁻¹, CQM = 250 ng mL⁻¹ e CQA = 400 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

TABELA 44. Análise intercorridas do controle de qualidade CQD (diluído com plasma branco, usando uma diluição de 1:3) de TUDCA.

CQD	
Média	213,944
DP	8,468
CV (%)	3,958
EPR (%)	0,679

Concentração Nominal Diluída: CQD = 212,5 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

TABELA 45. Análise intercorridas do controle de qualidade LIQ de TUDCA.

LIQ	
Média	4,998
DP	0,591
CV (%)	11,818
EPR (%)	-0,030

Concentração Nominal: LIQ = 5 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

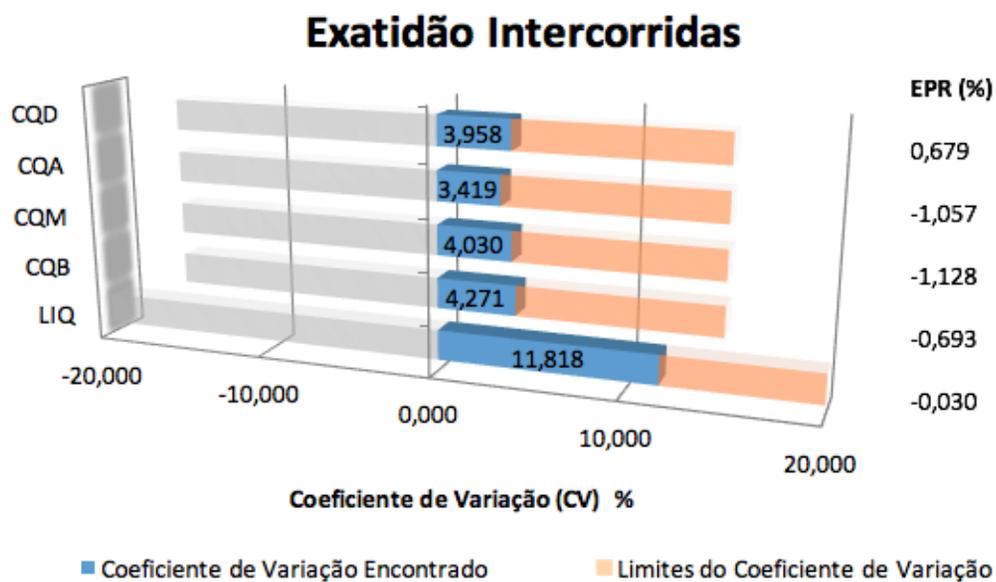


FIGURA 51. Resultados obtidos das análises interlote dos controles de qualidade e do LQ para matriz (plasma) normal de TUDCA.

4.3.7. Validação da reinjeção

Serão consideradas amostras reinjetadas, aquelas que forem quantificadas mais de uma vez.

Os resultados da 1ª injeção e a reinjeção estão apresentados na Tabela 46, 47 e 48 para os três ativos, respectivamente.

TABELA 46. Análise intracorrida dos controles de qualidade CQB, CQM e CQA de UDCA.

Réplicas	1ª Injeção*			Reinjeção		
	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
1	48,232	4938,003	8064,551	42,051	5031,777	7937,010
2	49,659	4983,678	8094,350	53,106	5067,315	8040,472
3	43,679	5007,768	8116,010	54,492	5078,884	7642,573
4	43,896	4832,111	7863,502	52,636	4990,151	7793,507
5	46,134	4969,694	8189,372	38,330	4954,846	7829,552
6	45,217	5032,610	8062,161	45,639	4990,345	8052,590
7	47,444	4895,598	7790,191	41,907	4850,404	7913,160
8	54,042	5138,064	8030,848	44,871	5035,636	7616,454
9	45,080	5102,559	7971,592	42,145	4874,468	7866,150
Média	47,043	4988,898	8020,286	46,131	4985,981	7854,608
DP	3,291	95,988	125,976	5,852	80,336	154,164
CV (%)	6,995	1,924	1,571	12,685	1,611	1,963
EPR (%)	4,539	-0,222	0,254	2,513	-0,280	-1,817

Concentração Nominal: CQB = 45 ng mL⁻¹, CQM = 5000 ng mL⁻¹ e CQA = 8000 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo. *Referente a Exatidão 03.

TABELA 47. Análise intracorrida dos controles de qualidade CQB, CQM e CQA de GUDCA.

Réplicas	1ª Injeção*			Reinjeção		
	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
1	52,991	4737,555	8046,023	47,667	4751,503	7804,548
2	49,265	5087,259	8014,004	45,249	5004,817	7719,556
3	49,583	4989,421	8040,710	51,030	4920,569	7798,172
4	48,545	4984,061	7996,381	47,813	5000,957	7821,405
5	49,321	5013,309	8000,062	48,555	4816,676	7749,459
6	48,023	4960,306	7981,114	50,380	4895,294	7723,519
7	51,574	5136,551	7933,994	46,741	4934,476	7714,763
8	49,996	4996,648	7736,357	47,683	4913,392	7787,453
9	47,049	5171,884	8162,365	48,980	5041,338	7921,625
Média	49,594	5008,555	7990,112	48,233	4919,891	7782,278
DP	1,798	125,575	113,847	1,769	92,467	65,903
CV (%)	3,625	2,507	1,425	3,667	1,879	0,847
EPR (%)	10,209	0,171	-0,124	7,185	-1,602	-2,722

Concentração Nominal: CQB = 45 ng mL⁻¹, CQM = 5000 ng mL⁻¹ e CQA = 8000 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo. *Referente a Exatidão 01.

TABELA 48. Análise intracorrida dos controles de qualidade CQB, CQM e CQA de TUDCA.

Réplicas	1ª Injeção*			Reinjeção		
	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
1	13,918	249,977	388,441	13,790	248,934	382,277
2	14,469	247,716	383,525	13,350	249,801	401,864
3	15,070	238,979	384,224	12,395	242,413	382,306
4	15,552	240,431	387,881	15,046	251,437	405,560
5	14,906	236,259	400,144	16,461	242,499	399,582
6	15,724	233,571	392,492	14,757	241,276	380,501
7	14,990	249,425	383,327	13,533	249,506	401,955
8	14,741	240,386	398,730	13,756	250,399	398,590
9	14,958	241,035	402,042	12,882	253,625	410,631
Média	14,925	241,975	391,201	13,997	247,766	395,918
DP	0,538	5,816	7,451	1,240	4,497	11,241
CV (%)	3,603	2,403	1,905	8,857	1,815	2,839
EPR (%)	-0,498	-3,210	-2,200	-6,689	-0,894	-1,020

Concentração Nominal: CQB = 15 ng mL⁻¹, CQM = 250 ng mL⁻¹ e CQA = 400 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo. *Referente a Exatidão 04.

Nas Tabelas 49, 50 e 51 são apresentadas as variações das médias para cada controle de qualidade (CQB, CQM e CQA) da reinjeção em relação às médias obtidas para as amostras da primeira injeção para os três ativos, respectivamente.

TABELA 49. Variação das médias dos controles de qualidade para UDCA na reinjeção em relação às médias obtidas para as amostras da primeira injeção.

	Reinjeção		
	CQB	CQM	CQA
Variação (%)	-1,938	-0,058	-2,066

TABELA 50. Variação das médias dos controles de qualidade para GUDCA na reinjeção em relação às médias obtidas para as amostras da primeira injeção.

	Reinjeção		
	CQB	CQM	CQA
Variação (%)	-2,744	-1,770	-2,601

TABELA 51. Variação das médias dos controles de qualidade para TUDCA na reinjeção em relação às médias obtidas para as amostras da primeira injeção.

	Reinjeção		
	CQB	CQM	CQA
Variação (%)	-6,222	2,393	1,206

4.3.8. Validação de Fármacos de Uso Concomitante

Na Tabela 52, estão descritos os padrões de referência do analito ursodiol (UDCA), do padrão interno (UDCA D4) e dos fármacos de uso concomitante utilizados na metodologia.

TABELA 52. Padrões de referência utilizados na validação.

Padrão	Finalidade	Fabricante/Endereço	Lote	Validade
Ursodiol (ácido ursodesoxicólico)	Analito	U.S.Pharmacopeia 12601 Twinbrook Parkway Rockville, MD 20852	H0H204	Vigente
Ácido ursodesoxicólico D4	Padrão interno	IsoSciences 1017 W 9th Ave King of Prussia, PA 19406 USA	KC3-2013- 200A1	12/09/2017
Cloridrato de 4-MAA	Fármaco concomitante	Purity Grade Standards (PGS) 1750 Montgomery Street3rd Floor Waterfront PlazaSan Francisco, CA 94111 USA	1757- 057A2	29/09/2017
Dimenidrinato	Fármaco concomitante	U.S.Pharmacopeia 12601 Twinbrook Parkway Rockville, MD 20852	J1H302	30/06/2017
Paracetamol	Fármaco concomitante	Fundação Oswaldo Cruz Av. Brasil, 4365 - Rio de Janeiro. CEP 21045-900 - Brasil	2009	Vigente
Cloridrato de metoclopramida	Fármaco concomitante	Fundação Oswaldo Cruz Av. Brasil, 4365 - Rio de Janeiro. CEP 21045-900 - Brasil	1008	Vigente
Bromidrato de escopolamina	Fármaco concomitante	U.S.Pharmacopeia 12601 Twinbrook Parkway Rockville, MD 20852	L0M054	31/03/2018
Cloridrato de piridoxina	Fármaco concomitante	U.S.Pharmacopeia 12601 Twinbrook Parkway Rockville, MD 20852	R031S0	Vigente
Cafeína	Fármaco concomitante	U.S.Pharmacopeia 12601 Twinbrook Parkway Rockville, MD 20852	K0K210	30/09/2017

Na Tabela 53, estão descritos os padrões de referência do analito (GUDCA), do padrão interno (GUDCA D4) e dos fármacos de uso concomitante utilizados na metodologia.

TABELA 53. Padrões de referência utilizados na validação.

Padrão	Finalidade	Fabricante/Endereço	Lote	Validade
Ácido glicoursodesoxicólico	Analito	Purity Grade Standards (PGS) 1750 Montgomery Street3rd Floor Waterfront Plaza San Francisco, CA 94111 USA	H0486	05/04/2019
Ácido glicoursodesoxicólico D4	Padrão interno	IsoSciences 1017 W 9th Ave King of Prussia, PA 19406 USA	SJ5-2017- 206A1	13/02/2020
Cloridrato de 4-MAA	Fármaco concomitante	Purity Grade Standards (PGS) 1750 Montgomery Street3rd Floor Waterfront Plaza San Francisco, CA 94111 USA	1757-057A2	29/09/2017
Dimenidrinato	Fármaco concomitante	U.S.Pharmacopeia, 12601 Twinbrook Parkway Rockville, MD 20852	J1H302	30/06/2017
Paracetamol	Fármaco concomitante	Fundação Oswaldo Cruz Av. Brasil, 4365 - Rio de Janeiro. CEP 21045-900 - Brasil	2009	Vigente
Cloridrato de metoclopramida	Fármaco concomitante	Fundação Oswaldo Cruz Av. Brasil, 4365 - Rio de Janeiro. CEP 21045-900 - Brasil	1008	Vigente
Bromidrato de escopolamina	Fármaco concomitante	U.S.Pharmacopeia, 12601 Twinbrook Parkway Rockville, MD 20852	L0M054	31/03/2018
Cloridrato de piridoxina	Fármaco concomitante	U.S.Pharmacopeia, 12601 Twinbrook Parkway Rockville, MD 20852	R031S0	Vigente
Cafeína	Fármaco concomitante	U.S.Pharmacopeia, 12601 Twinbrook Parkway Rockville, MD 20852	K0K210	30/09/2017

Na Tabela 54 estão descritos os padrões de referência do analito (TUDCA), do padrão interno (TUDCA D4) e dos fármacos de uso concomitante utilizados na metodologia.

TABELA 54. Padrões de referência utilizados na validação.

Padrão	Finalidade	Fabricante/Endereço	Lote	Validade
Ácido tauroursodesoxicólico	Analito	Purity Grade Standards (PGS) 1750 Montgomery Street3rd Floor Waterfront Plaza San Francisco, CA 94111 USA	H0369	31/03/19
Ácido tauroursodesoxicólico D4 sódico	Padrão interno	IsoSciences 1017 W 9th Ave King of Prussia, PA 19406 USA	SJ5-2016- 167A1	21/04/19
Cloridrato de 4-MAA	Fármaco concomitante	Purity Grade Standards (PGS) 1750 Montgomery Street3rd Floor Waterfront Plaza San Francisco, CA 94111 USA	1757-057A2	29/09/2017
Dimenidrinato	Fármaco concomitante	U.S.Pharmacopeia 12601 Twinbrook Parkway Rockville, MD 20852	J1H302	30/06/2017
Dimenidrinato	Fármaco concomitante	U.S.Pharmacopeia 12601 Twinbrook Parkway Rockville, MD 20852	R041E0	Vigente
Paracetamol	Fármaco concomitante	Fundação Oswaldo Cruz Av. Brasil, 4365 - Rio de Janeiro. CEP 21045-900 - Brasil	2009	Vigente
Cloridrato de metoclopramida	Fármaco concomitante	Fundação Oswaldo Cruz Av. Brasil, 4365 - Rio de Janeiro. CEP 21045-900 - Brasil	1008	Vigente
Bromidrato de escopolamina	Fármaco concomitante	U.S.Pharmacopeia 12601 Twinbrook Parkway Rockville, MD 20852	LOM054	31/03/2018
Cloridrato de piridoxina	Fármaco concomitante	U.S.Pharmacopeia 12601 Twinbrook Parkway Rockville, MD 20852	R031S0	Vigente
Cafeína	Fármaco concomitante	U.S.Pharmacopeia 12601 Twinbrook Parkway Rockville, MD 20852	K0K210	30/09/2017

4.3.9. Seletividade na presença de fármacos de uso concomitante

Para confirmar a seletividade do método, foram analisadas amostras branco de plasma humano obtidas de 6 (seis) indivíduos sendo 4 (quatro) amostras normais, 1 (uma) lipêmica e 1 (uma) hemolisada contaminados com os fármacos de uso concomitante.

Nas Tabelas 55, 56 e 57 estão apresentados os resultados das análises em áreas da seletividade na presença de fármacos de uso concomitante para os três ativos, respectivamente.

TABELA 55. Seletividade do analito e do padrão interno na presença de fármacos de uso concomitante para UDCA.

Indivíduo	Descrição	Origem	Lote	Área do fármaco / (%)	Área do padrão interno
01	Indivíduo 1: EDTA	UNIFAG	PLS 76/2017	-	-
02	Indivíduo 2: EDTA	UNIFAG	PLS 111/2017	-	-
03	Indivíduo 3: EDTA	UNIFAG	PLS 54/2017	-	-
04	Indivíduo 4: EDTA	UNIFAG	PLS 148/2017	-	-
05	Indivíduo 5: EDTA/Lipêmico	UNIFAG	PLS 464/2016	-	-
06	Indivíduo 6: EDTA/Hemolisado	UNIFAG	PLS 36/2017	-	-
07	LIQ 15 ng mL ⁻¹	UNIFAG	PLS 76/2017	1023	20643

TABELA 56. Seletividade do analito e do padrão interno na presença de fármacos de uso concomitante para GUDCA.

Indivíduo	Descrição	Origem	Lote	Área do fármaco / (%)	Área do padrão interno
01	Indivíduo 1: EDTA	UNIFAG	PLS 65/2017	-	-
02	Indivíduo 2: EDTA	UNIFAG	PLS 453/2016	77 / (6,1)	-
03	Indivíduo 3: EDTA	UNIFAG	PLS 147/2017	-	-
04	Indivíduo 4: EDTA	UNIFAG	PLS 388/2016	134 / (10,6)	-
05	Indivíduo 5: EDTA/Lipêmico	UNIFAG	PLS 464/2016	151 / (11,9)	-
06	Indivíduo 6: EDTA/Hemolisado	UNIFAG	PLS 36/2017	-	-
07	LIQ 15 ng mL ⁻¹	UNIFAG	PLS 65/2017	1261	40173

TABELA 57. Seletividade do analito e do padrão interno na presença de fármacos de uso concomitante para TUDCA.

Indivíduo	Descrição	Origem	Lote	Área do fármaco / (%)	Área do padrão interno
01	Indivíduo 1: EDTA	UNIFAG	PLS 388/2016	-	-
02	Indivíduo 2: EDTA	UNIFAG	PLS 50/2017	-	-
03	Indivíduo 3: EDTA	UNIFAG	PLS 127/2017	-	-
04	Indivíduo 4: EDTA	UNIFAG	PLS 39/2017	-	-
05	Indivíduo 5: EDTA /Lipêmico	UNIFAG	PLS 34/2017	-	-
06	Indivíduo 6: EDTA /Hemolisado	UNIFAG	PLS 139/2017	-	-
07	LIQ 5 ng mL ⁻¹	UNIFAG	PLS 388/2016	199	7237

4.3.10. Efeito de Matriz na presença de fármacos de uso concomitante

O uso de fármacos concomitantes durante a etapa clínica deve ser avaliada para investigar a interferência dos mesmos na metodologia analítica proposta. Com este objetivo avaliou-se a interferência dos fármacos apresentados anteriormente, respectivamente para os três ativos.

Para avaliar se existe efeito de matriz, foram analisadas amostras de 8 (oito) fontes distintas, sendo 4 (quatro) normais, 2 (duas) lipêmicas e 2 (duas) hemolisadas, adicionando-se posteriormente soluções de analito e PI nas mesmas concentrações de CQB e CQA contaminados com os fármacos de uso concomitante.

Os resultados foram avaliados a partir do cálculo do fator de matriz normalizado (FMN), e estão apresentados nas Tabelas 58, 59 e 60 para os três ativos, respectivamente.

TABELA 58. Efeito de matriz para UDCA na presença de fármacos de uso concomitante.

Amostra	Resposta Analito/ Resposta PI na Matriz		Resposta Analito/ Resposta PI na Solução		FMN*	
	CQB	CQA	CQB	CQA	CQB	CQA
PLS 148/2017	0,079	10,576	0,072	10,884	1,149	0,991
PLS 112/2017	0,073	10,317	0,067	10,677	1,062	0,967
PLS 87/2017	0,084	10,466	0,067	10,674	1,222	0,981
PLS 24/2017	0,076	10,139	0,068	10,587	1,105	0,950
PLS 467/2016 (Lipêmico)	0,077	10,249	0,067	10,614	1,120	0,961
PLS 33/2017 (Lipêmico)	0,079	10,199	0,065	10,500	1,149	0,956
PLS 25/2017 (Hemolisado)	0,071	10,362	0,069	10,654	1,033	0,971
PLS 463/2016 (Hemolisado)	0,080	10,339	0,075	10,773	1,164	0,969
Média			0,069	10,670	1,125	0,968
DP					0,060	0,013
CV (%)					5,303	1,371
Média FMN de todos Controles (n=16)					1,047	
DP (n=16)					0,091	
CV (%)					8,724	

DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e FMN= Fator de Matriz Normalizado.

*Este parâmetro (FMN) foi obtido utilizando Resposta em Matriz Individual / Média da Resposta em Solução.

TABELA 59. Efeito de matriz para GUDCA na presença de fármacos de uso concomitante.

Amostra	Resposta Analito/ Resposta PI na Matriz		Resposta Analito/ Resposta PI na Solução		FMN*	
	CQB	CQA	CQB	CQA	CQB	CQA
PLS 65/2017	0,092	13,222	0,088	13,445	1,050	1,000
PLS 453/2016	0,071	13,199	0,088	13,093	0,810	0,999
PLS 147/2017	0,099	13,230	0,092	13,094	1,130	1,001
PLS 128/2017	0,097	13,263	0,086	13,280	1,107	1,003
PLS 464/2016 (Lipêmico)	0,098	12,964	0,087	13,113	1,118	0,981
PLS 34/2017 (Lipêmico)	0,093	13,183	0,085	13,171	1,061	0,997
PLS 36/2017 (Hemolisado)	0,097	13,006	0,090	13,345	1,107	0,984
PLS 139/2017 (Hemolisado)	0,094	12,891	0,085	13,199	1,073	0,975
	Média		0,088	13,218	1,057	0,993
	DP				0,104	0,011
	CV (%)				9,809	1,089
	Média FMN de todos Controles (n=16)				1,025	
	DP (n=16)				0,079	
	CV (%)				7,671	

DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e FMN= Fator de Matriz Normalizado.

*Este parâmetro (FMN) foi obtido utilizando Resposta em Matriz Individual / Média da Resposta em Solução.

TABELA 60. Efeito de matriz para TUDCA na presença de fármacos de uso concomitante.

Amostra	Resposta Analito/ Resposta PI na Matriz		Resposta Analito/ Resposta PI na Solução		FMN*	
	CQB	CQA	CQB	CQA	CQB	CQA
PLS 388/2016	0,069	1,813	0,066	1,821	1,043	1,010
PLS 50/2017	0,072	1,788	0,066	1,780	1,089	0,997
PLS 127/2017	0,069	1,776	0,066	1,776	1,043	0,990
PLS 39/2017	0,066	1,816	0,064	1,782	0,998	1,012
PLS 34/2017 (Lipêmico)	0,070	1,823	0,066	1,772	1,059	1,016
PLS 464/2016 (Lipêmico)	0,070	1,768	0,066	1,784	1,059	0,985
PLS 36/2017 (Hemolisado)	0,068	1,828	0,071	1,810	1,028	1,019
PLS 139/2017 (Hemolisado)	0,067	1,797	0,064	1,829	1,013	1,002
Média			0,066	1,794	1,042	1,004
DP					0,029	0,012
CV (%)					2,737	1,238
Média FMN de todos Controles (n=16)					1,023	
DP (n=16)					0,029	
CV (%)					2,820	

DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e FMN= Fator de Matriz Normalizado.

*Este parâmetro (FMN) foi obtido utilizando Resposta em Matriz Individual / Média da Resposta em Solução.

4.3.11. Exatidão e Precisão na presença de fármacos de uso concomitante

Para avaliar a Exatidão e Precisão do método na presença de fármacos de uso concomitante, 9 (nove) réplicas distintas (CQB, CQM, CQA), foram analisadas após a adição dos fármacos apresentados anteriormente para cada ativo, respectivamente, na faixa de concentração máxima esperada para cada um destes fármacos avaliados.

Nas Tabelas 61, 62 e 63 estão apresentados os resultados da avaliação da precisão e exatidão expressa pelo coeficiente de variação (CV) e pelo erro padrão relativo (EPR), para os ativos em avaliação, respectivamente.

TABELA 61. Exatidão e Precisão na presença de fármacos de uso concomitante para UDCA.

Replicatas	CQB	CQM	CQA
1	48,796	5019,362	7916,329
2	46,145	5068,558	8026,255
3	50,793	4977,002	8047,385
4	42,317	4992,940	8248,785
5	38,665	5082,548	8076,674
6	44,580	5010,013	8208,197
7	43,187	5084,444	8054,671
8	50,944	5130,878	8094,839
9	46,470	5028,436	7997,350
Média	45,766	5043,798	8074,498
DP	4,066	50,463	101,916
CV (%)	8,885	1,001	1,262
EPR (%)	1,703	0,876	0,931

Concentração Nominal: CQB = 45 ng mL⁻¹, CQM = 5000 ng mL⁻¹ e CQA = 8000 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

TABELA 62. Exatidão e Precisão na presença de fármacos de uso concomitante para GUDCA.

Replicatas	CQB	CQM	CQA
1	45,116	4942,520	7822,216
2	44,562	4820,318	7841,616
3	43,282	4919,977	7889,272
4	43,414	4908,667	7585,878
5	46,710	4876,262	7812,521
6	46,184	4962,316	7640,385
7	45,184	4959,839	7713,905
8	41,149	4885,137	7740,527
9	45,500	4897,279	7851,086
Média	44,567	4908,035	7766,378
DP	1,711	45,147	103,115
CV (%)	3,839	0,920	1,328
EPR (%)	-0,963	-1,839	-2,920

Concentração Nominal: CQB = 45 ng mL⁻¹, CQM = 5000 ng mL⁻¹ e CQA = 8000 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

TABELA 63. Exatidão e Precisão na presença de fármacos de uso concomitante para TUDCA.

Replicatas	CQB	CQM	CQA
1	16,218	270,782	429,554
2	14,072	267,236	429,165
3	15,314	264,062	420,518
4	16,276	265,312	427,394
5	14,617	269,609	415,613
6	14,301	263,321	419,460
7	15,815	269,154	431,364
8	15,165	264,753	429,342
9	12,849	265,839	427,136
Média	14,959	266,674	425,505
DP	1,119	2,652	5,526
CV (%)	7,478	0,994	1,299
EPR (%)	-0,276	6,670	6,376

Concentração Nominal: CQB = 15 ng mL⁻¹, CQM = 250 ng mL⁻¹ e CQA = 400 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

4.3.12. Estudo de estabilidade do fármaco em fluido biológico

Nas Tabelas 64, 65 e 66 estão apresentadas as datas de preparo das amostras de cada uma das análises do estudo de estabilidade para cada ativo, respectivamente.

TABELA 64. Datas de preparo das amostras de cada análise do estudo de estabilidade do UDCA e UDCA D4.

Descrição da Análise	Preparo das amostras	Análise
Recém-preparada (Valor-inicial)	13/06/2017	13/06/2017
Estabilidade de curta duração (20:50h na bancada)	13/06/2017	14/06/2017
Estabilidade pós processamento (22:00h no autoinjeter)	13/06/2017	13/06/2017
Degelo 03	13/06/2017	19/06/2017
Estabilidade de solução recém-preparada para ácido ursodesoxicólico e ácido ursodesoxicólico D4	23/05/2017	23/05/2017
Estabilidade de solução 25:40 horas de bancada para ácido ursodesoxicólico e ácido ursodesoxicólico D4	23/05/2017	24/05/2017
Estabilidade de solução 29 dias de preparo para ácido ursodesoxicólico e ácido ursodesoxicólico D4	23/05/2017	21/06/2017
Estabilidade de longa duração	13/06/2017	24/10/2017

TABELA 65. Datas de preparo das amostras de cada análise do estudo de estabilidade do GUDCA e GUDCA D4.

Descrição da Análise	Preparo das amostras	Análise
Recém-preparada (Valor-inicial)	05/06/2017	05/06/2017
Estabilidade de curta duração (22:15h na bancada)	05/06/2017	06/06/2017
Estabilidade pós processamento (22:00h no autoinjeter)	06/06/2017	06/06/2017
Degelo 03	05/06/2017	07/06/2017
Estabilidade de solução recém-preparada para ácido glicoursodesoxicólico e ácido glicoursodesoxicólico D4	25/05/2017	25/05/2017
Estabilidade de solução 24:40 horas de bancada para ácido glicoursodesoxicólico e 27:00 horas para ácido glicoursodesoxicólico D4	25/05/2017	26/05/2017
Estabilidade de solução 18 dias de preparo para ácido glicoursodesoxicólico e ácido glicoursodesoxicólico D4	25/05/2017	12/06/2017
Estabilidade de longa duração	05/06/2017	06/11/2017

TABELA 66. Datas de preparo das amostras de cada análise do estudo de estabilidade TUDCA E TUDCA D4.

Descrição da Análise	Preparo das amostras	Análise
Recém-preparada (Valor-inicial)	27/06/2017	27/06/2017
Estabilidade de curta duração (23:20h na bancada)	27/06/2017	28/06/2017
Estabilidade pós processamento (24:00h no autoinjeter)	28/06/2017	28/06/2017
Degelo 03	27/06/2017	29/06/2017
Estabilidade de solução recém-preparada para ácido tauroursodesoxicólico	08/06/2017	08/06/2017
Estabilidade de solução recém-preparada para ácido tauroursodesoxicólico D4	09/06/2017	09/06/2017
Estabilidade de solução 22:00 horas de bancada para ácido tauroursodesoxicólico	08/06/2017	09/06/2017
Estabilidade de solução 07:00 horas de bancada para ácido tauroursodesoxicólico D4	09/06/2017	09/06/2017
Estabilidade de solução 26 dias de preparo para ácido tauroursodesoxicólico	08/06/2017	04/07/2017
Estabilidade de solução 25 dias de preparo para ácido tauroursodesoxicólico D4	09/06/2017	04/07/2017
Estabilidade de longa duração	27/06/2017	24/10/2017

4.3.13. Estabilidade Pós Processamento

Para avaliar a estabilidade do fármaco no tempo e condições de análise, as amostras processadas foram mantidas dentro do autoinjeter, aproximadamente 22 °C e cada amostra de controle de qualidade foi analisada em 6 (seis) réplicas nos tempos 00:00 e 22:00 horas. Os resultados apresentados nas Tabelas 67, 68 e 69 mostram que as variações se encontram dentro da faixa permitida $\pm 15\%$ até o tempo de 22:00 horas em relação ao valor nominal.

TABELA 67. Estabilidade pós-processamento (autoinjeter) de UDCA.

Réplicas	t (0:00 h)		t (22:00 h)	
	CQB	CQA	CQB	CQA
1	43,889	7965,247	39,742	8034,233
2	48,298	8262,878	53,702	8103,984
3	50,389	8193,744	45,540	8132,168
4	44,728	7842,480	38,986	7999,187
5	56,372	7971,218	47,053	7910,536
6	48,212	8073,456	54,819	7863,433
Média	48,648	8051,504	46,640	8007,257
DP	4,495	156,825	6,698	105,633
CV (%)	9,240	1,948	14,361	1,319
EPR (%)	8,107	0,644	3,645	0,091

Concentração Nominal: CQB = 45 ng mL⁻¹ e CQA = 8000 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

Comparando-se as variações entre as médias dos CQB e CQA para amostras de t (0:00h) com relação ao valor nominal e as médias dos CQB e CQA para amostras de t (22:00h) com relação ao valor nominal, conclui-se que o UDCA analisado no plasma humano foi estável por 22:00 horas, uma vez que os desvios encontrados foram inferiores a 15%.

TABELA 68. Estabilidade pós-processamento (autoinjeter) de GUDCA.

Réplicas	t (0:00 h)		t (22:00 h)	
	CQB	CQA	CQB	CQA
1	46,604	7985,593	46,601	8119,425
2	46,352	8013,929	47,026	8199,318
3	46,196	7932,023	49,636	8121,676
4	46,823	8087,024	47,565	8209,524
5	47,023	8102,828	47,454	8081,375
6	43,559	8053,344	46,944	8167,453
Média	46,093	8029,124	47,538	8149,795
DP	1,277	64,693	1,086	50,450
CV (%)	2,771	0,806	2,286	0,619
EPR (%)	2,429	0,364	5,639	1,872

Concentração Nominal: CQB = 45 ng mL⁻¹ e CQA = 8000 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

Comparando-se as variações entre as médias dos CQB e CQA para amostras de t (0:00h) com relação ao valor nominal e as médias dos CQB e CQA para amostras de t (22:00h) com relação ao valor nominal, conclui-se que o GUDCA analisado no plasma humano foi estável por 22:00 horas, uma vez que os desvios encontrados foram inferiores a 15%.

TABELA 69. Estabilidade pós-processamento (autoinjeter) de TUDCA.

Réplicas	t (0:00 h)		t (24:00 h)	
	CQB	CQA	CQB	CQA
1	14,911	409,472	16,653	416,634
2	15,076	415,218	18,202	415,181
3	15,077	414,096	15,786	423,811
4	16,638	409,417	18,200	402,460
5	13,592	407,304	15,481	404,668
6	14,723	406,104	17,210	405,931
Média	15,003	410,269	16,922	411,448
DP	0,976	3,651	1,166	8,377
CV (%)	6,505	0,890	6,889	2,036
EPR (%)	0,019	2,567	12,813	2,862

Concentração Nominal: CQB = 15 ng mL⁻¹ e CQA = 400 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

Comparando-se as variações entre as médias dos CQB e CQA para amostras de t (0:00h) com relação ao valor nominal e as médias dos CQB e CQA para amostras de t (24:00h) com relação ao valor nominal, conclui-se que o TUDCA analisado no plasma humano foi estável por 24:00 horas, uma vez que os desvios encontrados foram inferiores a 15%.

4.3.14. Amostras recém-preparadas utilizadas nos estudos de estabilidade do fármaco

As Tabelas 70, 71 e 72 apresentam os resultados obtidos para os controles de qualidades (CQB e CQA) para as amostras recém-preparadas utilizadas nos testes de estabilidade do fármaco em ciclos de congelamento e degelo, estabilidade de curta duração e estabilidade de longa duração para cada um dos ativos, respectivamente.

TABELA 70. Amostras recém-preparadas utilizadas no estudo de estabilidade de UDCA.

Amostras Recém-Preparadas		
Réplicas	CQB	CQA
1	49,790	8432,287
2	44,764	8231,418
3	44,289	8042,307
4	40,231	8134,280
5	40,474	8205,827
6	51,691	8134,982
Média	45,207	8196,850
DP	4,717	132,915
CV (%)	10,434	1,622
EPR (%)	0,459	2,461

Concentração Nominal: CQB = 45 ng mL⁻¹ e CQA = 8000 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

Comparando-se os valores obtidos para os controles de qualidade CQB e CQA das amostras recém-preparadas e analisadas, com relação ao valor nominal, concluiu-se que as amostras podem ser utilizadas nos estudos de estabilidade, uma vez que os desvios encontrados foram inferiores a 15%.

TABELA 71. Amostras recém-preparadas utilizadas no estudo de estabilidade de GUDCA.

Amostras Recém-Preparadas		
Réplicas	CQB	CQA
1	49,699	8293,425
2	48,103	8227,970
3	51,717	8385,134
4	47,579	8389,715
5	47,126	8272,299
6	47,999	8173,246
Média	48,704	8290,298
DP	1,714	85,787
CV (%)	3,518	1,035
EPR (%)	8,231	3,629

Concentração Nominal: CQB = 45 ng mL⁻¹ e CQA = 8000 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

Comparando-se os valores obtidos para os controles de qualidade CQB e CQA das amostras recém-preparadas e analisadas, com relação ao valor nominal, concluiu-se que as amostras podem ser utilizadas nos estudos de estabilidade, uma vez que os desvios encontrados foram inferiores a 15%.

TABELA 72. Amostras recém-preparadas utilizadas no estudo de estabilidade de TUDCA.

Amostras Recém-Preparadas		
Réplicas	CQB	CQA
1	17,086	415,347
2	14,968	413,446
3	16,809	408,085
4	16,734	410,433
5	16,894	410,879
6	17,077	414,205
Média	16,595	412,066
DP	0,809	2,726
CV (%)	4,877	0,662
EPR (%)	10,631	3,016

Concentração Nominal: CQB = 15 ng mL⁻¹ e CQA = 400 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

Comparando-se os valores obtidos para os controles de qualidade CQB e CQA das amostras recém-preparadas e analisadas, com relação ao valor nominal, concluiu-se que as amostras podem ser utilizadas nos estudos de estabilidade, uma vez que os desvios encontrados foram inferiores a 15%.

4.3.15. Estabilidade do fármaco em ciclos de congelamento e degelo

Para avaliar a estabilidade de UDCA durante três ciclos de congelamento e degelo, foram analisadas 6 (seis) amostras de 2 (duas) diferentes concentrações (CQB e CQA), nas seguintes condições; amostras CQB e CQA (degelo 1): as amostras foram congeladas à -20 °C e mantidas nesta temperatura por no mínimo 12 horas. Após este tempo, as amostras foram submetidas ao degelo natural, à temperatura ambiente. Depois de completamente degeladas, as amostras foram novamente congeladas à -20 °C, mantidas nesta temperatura (por no mínimo 12 horas) e então submetidas ao degelo natural, (degelo 2). Para completar os degelos as amostras foram novamente congeladas à -20 °C, mantidas nesta temperatura (por no mínimo 12 horas) e então submetidas ao degelo natural, (degelo 3) e após este tempo, as amostras foram extraídas e quantificadas.

As Tabelas 73, 74 e 75 apresenta os resultados obtidos para cada controle de qualidade (CQB e CQA) após o terceiro ciclo de congelamento e degelo.

TABELA 73. Estabilidade de UDCA submetido a três ciclos de congelamento e degelo.

Degelo 03		
Réplicas	CQB	CQA
1	43,554	7513,218
2	43,462	7173,763
3	45,998	7317,686
4	48,855	7530,418
5	39,141	7264,370
6	43,117	6967,987
Média	44,021	7294,574
DP	3,238	212,663
CV (%)	7,357	2,915
EPR (%)	-2,175	-8,818

Concentração Nominal: CQB = 45 ng mL⁻¹ e CQA = 8000 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

TABELA 74. Estabilidade de GUDCA submetido a três ciclos de congelamento e degelo.

Degelo 03		
Réplicas	CQB	CQA
1	47,643	8646,997
2	50,546	8687,143
3	48,784	8563,595
4	49,482	8423,570
5	51,697	8685,930
6	48,214	8509,248
Média	49,394	8586,081
DP	1,515	106,502
CV (%)	3,066	1,240
EPR (%)	9,765	7,326

Concentração Nominal: CQB = 45 ng mL⁻¹ e CQA = 8000 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

TABELA 75. Estabilidade de TUDCA submetido a três ciclos de congelamento e degelo.

Degelo 03		
Réplicas	CQB	CQA
1	16,995	439,917
2	17,499	428,456
3	17,625	428,550
4	16,022	430,868
5	15,429	429,419
6	16,481	434,763
Média	16,675	431,996
DP	0,860	4,533
CV (%)	5,159	1,049
EPR (%)	11,168	7,999

Concentração Nominal: CQB = 15 ng mL⁻¹ e CQA = 400 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

Comparando-se as variações entre as médias dos CQB e CQA do terceiro ciclo de congelamento e degelo com relação ao valor nominal, conclui-se que os três ativos analisados no plasma humano foram estáveis nos três ciclos de congelamento e degelo quando armazenada à -20 °C, uma vez que os desvios encontrados foram inferiores a 15%.

4.3.16. Estabilidade de curta duração

Baseado no tempo em que as amostras do estudo serão mantidas à temperatura ambiente, foram analisadas 6 (seis) amostras de 2 (duas) diferentes concentrações (CQB e CQA) para os três ativos, respectivamente.

A Tabela 76 apresenta os resultados obtidos para cada controle de qualidade (CQB e CQA) para as amostras que se mantiveram estáveis até 20:50 horas à temperatura ambiente em relação ao valor nominal.

TABELA 76. Estabilidade de curta duração de UDCA.

Amostras analisadas após 20:50 horas à temperatura ambiente		
Réplicas	CQB	CQA
1	47,781	7768,232
2	45,849	7800,765
3	50,105	7583,344
4	43,031	7811,038
5	38,562	7711,829
6	44,652	7477,682
Média	44,997	7692,148
DP	3,999	134,121
CV (%)	8,887	1,744
EPR (%)	-0,007	-3,848

Concentração Nominal: CQB = 45 ng mL⁻¹ e CQA = 8000 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

Comparando-se os valores médios obtidos para os controles de qualidade CQB e CQA mantidos durante 20:50 horas à temperatura ambiente com relação ao valor nominal, conclui-se que o UDCA analisado no plasma humano foi estável no tempo em que permaneceu na bancada, uma vez que os desvios encontrados foram inferiores a 15%.

A Tabela 77 apresenta os resultados obtidos para cada controle de qualidade (CQB e CQA) para as amostras que se mantiveram estáveis até 22:15 horas à temperatura ambiente em relação ao valor nominal.

TABELA 77. Estabilidade de curta duração de GUDCA.

Amostras analisadas após 22:15 horas à temperatura ambiente		
Réplicas	CQB	CQA
1	44,710	8455,812
2	47,898	8301,112
3	51,160	8237,308
4	47,442	8388,273
5	48,011	8614,779
6	47,630	8634,072
Média	47,809	8438,559
DP	2,052	162,172
CV (%)	4,292	1,922
EPR (%)	6,241	5,482

Concentração Nominal: CQB = 45 ng mL⁻¹ e CQA = 8000 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

Comparando-se os valores médios obtidos para os controles de qualidade CQB e CQA mantidos durante 22:15 horas à temperatura ambiente com relação ao valor nominal, conclui-se que o GUDCA analisado no plasma humano foi estável no tempo em que permaneceu na bancada, uma vez que os desvios encontrados foram inferiores a 15%.

A Tabela 78 apresenta os resultados obtidos para cada controle de qualidade (CQB e CQA) para as amostras que se mantiveram estáveis até 23:20 horas à temperatura ambiente em relação ao valor nominal.

TABELA 78. Estabilidade de curta duração de TUDCA.

Amostras analisadas após 23:20 horas à temperatura ambiente		
Réplicas	CQB	CQA
1	15,139	432,518
2	15,751	426,345
3	15,393	430,666
4	15,155	427,083
5	15,363	430,636
6	16,807	434,063
Média	15,601	430,219
DP	0,631	3,009
CV (%)	4,043	0,699
EPR (%)	4,009	7,555

Concentração Nominal: CQB = 15 ng mL⁻¹ e CQA = 400 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

Comparando-se os valores médios obtidos para os controles de qualidade CQB e CQA mantidos durante 23:20 horas à temperatura ambiente com relação ao valor nominal, conclui-se que o TUDCA analisado no plasma humano foi estável no tempo em que permaneceu na bancada, uma vez que os desvios encontrados foram inferiores a 15%.

4.3.17. Estabilidade de soluções padrão

Nas Tabelas 79 e 80 estão apresentados os resultados das análises realizadas com solução primária de maior concentração de UDCA (30 µg/mL) e UDCA D4 (9 µg/mL) e solução de trabalho de menor concentração de UDCA (15 µg/mL) e UDCA D4 (3 µg/mL). Os resultados estão apresentados comparando as áreas individuais do analito (UDCA) e as áreas individuais do padrão interno (UDCA D4).

TABELA 79. Estabilidade das soluções padrão de UDCA.

Réplicas	Recém Preparada		Amostras analisadas após 25:40 horas de preparo à temperatura ambiente		Amostras analisadas após 29 dias de armazenamento em refrigeração	
	Trabalho	Primária	Trabalho	Primária	Trabalho	Primária
1	182978	384786	193269	336300	192898	355983
2	180766	383204	184234	404299	194703	358548
3	183941	383611	173878	351931	190239	367419
Média	182562	383867	183794	364177	192613	360650
DP	1627,930	821,482	9702,996	35615,071	2245,573	6000,777
CV (%)	0,892	0,214	5,279	9,780	1,166	1,664
	Variação (%)		0,675	-5,129	5,506	-6,048

DP = Desvio Padrão e CV = Coeficiente de Variação.

TABELA 80. Estabilidade das soluções padrão de UDCA D4.

Réplicas	Recém Preparada		Amostras analisadas após 25:40 horas de preparo à temperatura ambiente		Amostras analisadas após 29 dias de armazenamento em refrigeração	
	Trabalho	Primária	Trabalho	Primária	Trabalho	Primária
1	33763	102309	34433	98553	36355	99823
2	33470	98751	34284	100132	36797	98644
3	32818	100504	34182	105582	35986	98314
Média	33350	100521	34300	101422	36379	98927
DP	483,732	1779,063	126,231	3687,876	406,047	793,308
CV (%)	1,450	1,770	0,368	3,636	1,116	0,802
	Variação (%)		2,847	0,896	9,082	-1,586

DP = Desvio Padrão e CV = Coeficiente de Variação.

Comparando-se as variações das médias das respostas do analito e do padrão interno para as soluções analisadas após 25:40 horas de preparo para UDCA e para UDCA D4 mantidas à temperatura ambiente e amostras analisadas após 29 dias mantidas sob refrigeração, em relação às médias obtidas para as soluções recém preparadas, pode-se concluir que as soluções de UDCA e UDCA D4 foram estáveis, uma vez que os desvios encontrados foram inferiores a 10%.

Nas Tabelas 81 e 82 estão apresentados os resultados das análises realizadas com solução primária de maior concentração de GUDCA (20000 ng mL⁻¹) e GUDCA D4 (3000 ng mL⁻¹) e

solução de trabalho de menor concentração de GUDCA (10000 ng mL⁻¹) e GUDCA D4 (1000 ng mL⁻¹). Os resultados estão apresentados comparando as áreas individuais do analito (GUDCA) e as áreas individuais do padrão interno (GUDCA D4).

TABELA 81. Estabilidade das soluções padrão de GUDCA.

Réplicas	Recém Preparada		Amostras analisadas após 24:40 horas de preparo à temperatura ambiente		Amostras analisadas após 18 dias de armazenamento em refrigeração	
	Trabalho	Primária	Trabalho	Primária	Trabalho	Primária
1	429493	639685	428672	698741	413885	655808
2	429143	654024	432215	664791	413614	655150
3	418083	653417	425081	668410	422403	669841
Média	425573	649042	428656	677314	416634	660266
DP	6488,891	8109,081	3567,027	18644,343	4997,938	8298,429
CV (%)	1,525	1,249	0,832	2,753	1,200	1,257
Varição (%)			0,724	4,356	-2,100	1,729

DP = Desvio Padrão e CV = Coeficiente de Variação.

TABELA 82. Estabilidade das soluções padrão de GUDCA D4.

Réplicas	Recém Preparada		Amostras analisadas após 27:00 horas de preparo à temperatura ambiente		Amostras analisadas após 18 dias de armazenamento em refrigeração	
	Trabalho	Primária	Trabalho	Primária	Trabalho	Primária
1	77439	198466	68518	197789	64639	188113
2	69996	197141	64958	202385	66781	189708
3	67792	193401	68141	202679	67832	187805
Média	71742	196336	67206	200951	66417	188542
DP	5055,038	2626,704	1955,642	2742,315	1627,268	1021,461
CV (%)	7,046	1,338	2,910	1,365	2,450	0,542
Varição (%)			-6,324	2,351	-7,422	-3,970

DP = Desvio Padrão e CV = Coeficiente de Variação.

Comparando-se as variações das médias das respostas do analito e do padrão interno para as soluções analisadas após 24:40 horas de preparo para GUDCA e 27:00 horas para GUDCA D4 mantidas à temperatura ambiente e amostras analisadas após 18 dias mantidas sob

refrigeração, em relação às médias obtidas para as soluções recém preparadas, pode-se concluir que as soluções de GUDCA e GUDCA D4 foram estáveis, uma vez que os desvios encontrados foram inferiores a 10%.

Nas Tabelas 83 e 84 estão apresentados os resultados das análises realizadas com solução primária de maior concentração de TUDCA (500 ng mL^{-1}) e TUDCA D4 (500 ng mL^{-1}) e solução de trabalho de menor concentração de TUDCA ($73,3 \text{ ng mL}^{-1}$) e TUDCA D4 ($73,3 \text{ ng mL}^{-1}$). Os resultados estão apresentados comparando as áreas individuais do analito (TUDCA) e as áreas individuais do padrão interno (TUDCA D4).

TABELA 83: Estabilidade das soluções padrão de TUDCA.

Réplicas	Recém Preparada		Amostras analisadas após 22:00 horas de preparo à temperatura ambiente		Amostras analisadas após 26 dias de armazenamento em refrigeração	
	Trabalho	Primária	Trabalho	Primária	Trabalho	Primária
1	19511	116508	19245	105835	20025	111763
2	19568	122125	17663	115830	19991	109840
3	19819	118627	17853	123196	19420	118782
Média	19633	119087	18254	114954	19812	113462
DP	163,867	2836,572	863,760	8713,613	339,907	4706,797
CV (%)	0,835	2,382	4,732	7,580	1,716	4,148
Varição (%)			-7,024	-3,471	0,913	-4,723

DP = Desvio Padrão e CV = Coeficiente de Variação.

TABELA 84. Estabilidade das soluções padrão de TUDCA D4.

Réplicas	Recém Preparada		Amostras analisadas após 07:00 horas de preparo à temperatura ambiente		Amostras analisadas após 25 dias de armazenamento em refrigeração	
	Trabalho	Primária	Trabalho	Primária	Trabalho	Primária
1	21126	109167	22498	114018	21730	104814
2	20647	111063	21862	113568	21845	104504
3	20866	111354	21996	113938	21597	105537
Média	20880	110528	22119	113841	21724	104952
DP	239,792	1187,607	335,275	240,069	124,109	530,081
CV (%)	1,148	1,074	1,516	0,211	0,571	0,505
Variação (%)			5,934	2,998	4,044	-5,045

DP = Desvio Padrão e CV = Coeficiente de Variação.

Comparando-se as variações das médias das respostas do analito e do padrão interno para as soluções analisadas após 22:00 horas de preparo para TUDCA e 07:00 horas para TUDCA D4 mantidas à temperatura ambiente e amostras analisadas após 26 dias para TUDCA e 25 dias para TUDCA D4 mantidas sob refrigeração, em relação às médias obtidas para as soluções recém preparadas, pode-se concluir que as soluções de TUDCA e TUDCA D4 foram estáveis, uma vez que os desvios encontrados foram inferiores a 10%.

4.3.18. Estabilidade de longa duração

Para avaliar a estabilidade do fármaco, em plasma, em condições de longa duração, o tempo de armazenamento deve exceder o intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra e a análise da última amostra dos voluntários.

Para o UDCA, foram preparadas seis amostras de duas diferentes concentrações (CQB e CQA) no tempo inicial (13/06/2017) estas amostras foram estocadas nas mesmas condições que as amostras de plasma dos voluntários analisados (-20°C). As amostras armazenadas foram analisadas após 133 dias (24/10/2017) em plasma humano conforme os resultados apresentados na Tabela 85.

TABELA 85. Estabilidade de longa duração de UDCA.

Estabilidade de longa duração (24/10/2017)		
Réplicas	CQB	CQA
1	39,976	7765,838
2	39,622	7750,520
3	42,631	7920,686
4	43,279	8445,906
5	49,081	7895,684
6	46,770	7770,860
Média	43,560	7924,916
DP	3,744	265,238
CV (%)	8,595	3,347
EPR (%)	-3,200	-0,939

Concentração Nominal: CQB = 45 ng mL⁻¹ e CQA = 8000 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

Comparando-se as variações entre as médias dos CQB e CQA para as amostras armazenadas durante 133 dias com relação ao valor nominal, conclui-se que o UDCA analisado no plasma humano (armazenadas nas mesmas condições dos controles analisados), permaneceu estável durante o período em que ficou armazenada (120 dias), uma vez que os desvios encontrados foram inferiores a 15%.

Para o GUDCA, foram preparadas seis amostras de duas diferentes concentrações (CQB e CQA) no tempo inicial (05/06/2017) estas amostras foram estocadas nas mesmas condições que as amostras de plasma dos voluntários analisados (-20°C). As amostras armazenadas foram analisadas após 154 dias (06/11/2017) em plasma humano conforme os resultados apresentados na Tabela 86.

TABELA 86. Estabilidade de longa duração de GUDCA.

Estabilidade de longa duração (06/11/2017)		
Réplicas	CQB	CQA
1	50,878	7927,227
2	47,210	7998,193
3	46,761	7901,441
4	45,869	7835,178
5	46,685	7839,618
6	49,703	8031,187
Média	47,851	7922,141
DP	1,974	80,625
CV (%)	4,125	1,018
EPR (%)	6,336	-0,973

Concentração Nominal: CQB = 45 ng mL⁻¹ e CQA = 8000 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

Para o TUDCA, foram preparadas seis amostras de duas diferentes concentrações (CQB e CQA) no tempo inicial (27/06/2017) estas amostras foram estocadas nas mesmas condições que as amostras de plasma dos voluntários analisados (-20°C). As amostras armazenadas foram analisadas após 119 dias (24/10/2017) em plasma humano conforme os resultados apresentados na Tabela 87.

TABELA 87. Estabilidade de longa duração de TUDCA.

Estabilidade de longa duração (24/10/2017)		
Réplicas	CQB	CQA
1	14,299	396,788
2	14,710	380,859
3	13,975	393,059
4	19,416	376,150
5	17,733	390,372
6	17,193	396,211
Média	16,221	388,907
DP	2,212	8,513
CV (%)	13,636	2,189
EPR (%)	8,140	-2,773

Concentração Nominal: CQB = 15 ng mL⁻¹ e CQA = 400 ng mL⁻¹, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

Comparando-se as variações entre as médias dos CQB e CQA para as amostras armazenadas durante 119 dias com relação ao valor nominal, conclui-se que o TUDCA analisado no plasma humano (armazenadas nas mesmas condições dos controles analisados), permaneceu estável durante o período em que ficou armazenada (115 dias), uma vez que os desvios encontrados foram inferiores a 15%.

5. CONCLUSÕES

Concluiu-se que os métodos analíticos foram desenvolvidos e validados com sucesso, uma vez que cumpriram todos os critérios estabelecidos para validação de métodos bioanalíticos. Os métodos desenvolvidos não apresentaram efeito de matriz e efeito residual, demonstrando ser seletivo para as moléculas em estudo, com adequada exatidão e precisão. Além disso os métodos se apresentaram sensíveis obtendo CV menor que 20% para o LIQ de cada composto. Desta forma, o método pode ser aplicado em estudos de bioequivalência para determinação do Ursodiol e seus metabólitos de maneira reprodutível, simples e eficaz.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**. v. 42., p. 198-207, 2003.

ALMEIDA, C.; ROSÁRIO, P.; SERÔDIO, P.; NOGUEIRA, J. Novas Perspectivas na Preparação de Amostras para Análise Cromatográfica. **Química**, v. 95, p. 69-77, 2004.

ALNOUTI, Y.; CSANAKY, I. L.; KLAASSEN, C. D. Quantitative-profiling of bile acids and their conjugates in mouse liver, bile, plasma, and urine using LC-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 873, n. 2, p. 209-217, 2008.

ALNOUTI, Y. Bile acid sulfation: a pathway of bile acid elimination and detoxification. **Toxicological Sciences**, v. 108, p. 225– 246, 2009.

ALVES, J. O. **Espectrometria de massas com ionização electrospray (ESI-MS) e métodos quimiométricos: caracterização de azeites de oliva (extra virgem e puro) e outros óleos vegetais e quantificação de óleos adulterantes em azeite de oliva extra virgem**. Universidade Federal de Minas Gerais Instituto de Ciências Exatas Departamento de Química, 2014.

ALVISI, V.; GASPARETTO, A.; DENTALE, A.; HERAS, H. FELLETTI-SPADAZZI A AND D'AMBROSI A, **Drugs under experimental and clinical research** , v. 22, n. 1, p. 29-33, 1996.

ARAB, J. P.; KARPEN, S. J.; DAWSON, P. A.; ARRESE, M.; TRAUNER, M. Bile Acids and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Molecular Insights and Therapeutic Perspectives. **Hepatology**, v. 65, p. 350-362, 2017.

ASGARSHIRAZI, M.; SHARIAT, M.; HOSEIN DALILI, H.; KEIHANIDOOST, Z. Ursodeoxycholic Acid Can Improve Liver Transaminase Quantities in Children with Anticonvulsant Drugs Hepatotoxicity: a Pilot Study. **Acta Medica Iranica**, v. 53, p. 351-355, 2015.

BACHRACH, W.H.; HOFMANN, A.F. Ursodeoxycholic acid in the treatment of cholesterol cholelithiasis. Part I. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 27, p. 737–761, 1982.

BATLOUNI, M. Diuréticos. **Revista Brasileira de hipertensao**, v. 16, n. 4, p. 211 – 214, 2009.

BATTA, A. K.; SALEN, G. Gas chromatography of bile acids. **Journal of Chromatography B**, v. 723, n. 1-2, p. 1- 16, 1999.

BENTAYEB, K. et al. Determination of bile acids in human serum by on-line restricted access material–ultra high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 869, n. 1-2, p. 1-8, 2008.

BIRK, J.J.; DIPPOLD, M.; WIESENBERG, G. L.; GLASER, B. Combined quantification of faecal sterols, stanols, stanones and bile acids in soils and terrestrial sediments by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1242, p. 1-10, 2012.

BOATRRIGHT, J. H.; NICKERSON, J. M.; MORING, A. G.; PARDUE, M. T. Bile acids in treatment of ocular disease. **Journal of Ocular Biology, Diseases, and Informatics**, v.2, p.149-159, 2009.

BONFRATE, L.; TACK, J.; GRATAGLIANO, I.; CUOMO, R.; PORTINCASA, P. Microbiota in health and irritable bowel syndrome: current knowledge, perspectives and therapeutic options. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 48, p. 995-1009, 2013.

BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. 1 ed. – Rio de Janeiro: LTC, 2015.

BOSCOLO, O.; FLOR, S.; DOBRECKY, C.; MARTINEFSKI, M. TRIPODI, V.; LUCANGIOLI, S. LC-MS/MS Method Applied to the Detection and Quantification of Ursodeoxycholic Acid Related Substances in Raw Material and Pharmaceutical Formulation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 6, p.448-455, 2018.

BOULANGER, B.; DEWÉ, W.; GILBERT, A.; GOVAERTS, B.; MAUMY, M. R. Management for analytical methods based on the total error concept: Conciliating the objectives of the pre-study and instudy validation phases. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.86, p. 198-207, 2005.

BRASIL. Ministério da saúde: Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos Departamento de Gestão e Incorporação de Tecnologias em Saúde e Coordenação de Avaliação e Monitoramento de Tecnologias. **Portaria nº 47, de 16 de outubro de 2018**. Disponível em: http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2018/Relatorio_Acidoursodesoxicolicico_ColagiteBiliar.pdf. Acesso em 06/03/2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 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 República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 22 de maio de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde: Consultoria Jurídica/Advocacia Geral da União. Nota técnica, n. 2, 2012. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/31/--ciclo-ursodesoxic--lico--atualizada-em-27-11-2013-.pdf>. Acesso em: 02/04/2018.

BRASIL. 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.

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.

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.

BRASIL. Lei n. 9787 de 10 de fevereiro de 1999. Altera a Lei n. 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11 de fevereiro de 1999.

BRITO, M. A., LIMA, S., FERNANDES, A., FALCÃO, A. S., SILVA, R. F. M., BUTTERFIELD, D. A. AND BRITES, D. Bilirubin injury to neurons: contribution of oxidative stress and rescue by glycoconjugated deoxycholic acid. **Neurotoxicology**, v. 29, p. 259-269, 2008.

BURKARD, I.; VON ECKARDSTEIN, A.; RENTSCH, K. M. Differentiated quantification of human bile acids in serum by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 826, n. 1-2, p. 147-159, 2005.

CAO, H.; XU, M.; DONG, W.; DENG, B.; WANG, S.; ZHANG, Y.; WANG, S.; QI, Y.; GAO, J.; YAN, F.; WANG, B. Secondary bile acid-induced dysbiosis promotes intestinal carcinogenesis. **International Journal of Cancer**; v.140, p. 2545-2556, 2017.

CAREY, E. J.; ALI, H.; LINDOR, K. D. Primary biliary cirrhosis. **The Lancet**, v. 386, n. 10003, p. 1565-1575, 2015.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B**, v. 689, p. 175-180, 1997.

CHAI, J.; ZOU, L.; LI, X.; HAN, D.; WANG, S.; HU, S.; GUAN, J. Mechanism of bile acid-regulated glucose and lipid metabolism in duodenal-jejunal bypass. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, p. 15778-15785, 2015.

CHAVES, A. R.; MOURA, B. H. F.; RABELO, D.; QUEIROZ, M. E. C. The development of a new disposable pipette extraction phase on polyaniline composites for determination of levels of antidepressants in plasma samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1399, p. 1-7, 2015.

CHEN, Y.; GUO, Z.; WANG, X.; QIU, C., Sample preparation, **Journal of Chromatography A**, v. 1184, p. 191-219.

CHENG, X.; BUCKLEY, D.; KLAASSEN, C. D. Regulation of hepatic bile acid transporters Ntcp and Bsep expression. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, n. 11, p. 1665-1676, 2007.

CHIANG, J. Y. Bile acid metabolism and signaling. **Comprehensive Physiology**, v. 3(3), p. 1191-1212, 2013.

CHIESI PHARMA INC, ZAMBOM LAB PHARMA INC. **Ursacol® [Package Insert]**. Santana do Parnaíba, SP (Brazil). Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=5100362015&pIdAnexo=2672212. Acesso em: 06/03/2018.

CHO, T.; KIM, Y. J.; PAIK, S. S. The efficacy of pharmacological treatment in pediatric nonalcoholic Fatty liver disease. **Pediatric gastroenterology, hepatology & nutrition**, v. 15, n. 4, 256-265, 2012.

CIOLA R. **Fundamentos da cromatografia a gás**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 1985. 266 p.

CODEX. Alimentarius Commission on Methods of Analysis and Sampling. **Criteria for Evaluating Acceptable Methods of Analysis for Codex Purposes**, CX/MAS 95/3, 1995.

COLE, R. B. **Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, and Applications**; Cole, R.B., ed. John Wiley & Sons: New York, 1997, p. 12.

COLOMBO, C.; BATTEZZATI, P. M.; PODDA, M.; BETTINARDI, N.; GIUNTA, A. Ursodeoxycholic acid for liver disease associated with cystic fibrosis: a double-blind multicenter trial. The Italian Group for the Study of Ursodeoxycholic Acid in Cystic Fibrosis. Department of Pediatrics, University of Sassari, Italy. **Hepatology**, v. 23, n. 6, p. 1484-1490, 1996.

CROSIGNANI, A.; BATTEZZATI, P. M.; SETCHELL, K. D.; INVERNIZZI, P.; COVINI, G.; ZUIN, M.; PODDA, M. Tauroursodeoxycholic acid for treatment of primary biliary cirrhosis. A dose-response study. **Digestive Diseases and Sciences**, v.41, p. 809–815, 1996.

CZUL, F.; PEYTON, A.; LEVY, C. Primary biliary cirrhosis: therapeutic advances. **Clinics in liver disease**, v. 17, n. 2, p. 229-242, 2013.

CUPERUS, F. J.; HAFKAMP, A. M.; HAVINGA, R.; VITEK, L.; ZELENKA, J.; TIRIBELLI, C.; OSTROW, J. D.; AND VERKADE, H. J. Effective treatment of unconjugated hyperbilirubinemia with oral bile salts in Gunn rats. **Gastroenterology**, v. 136, p. 673-682 e 671, 2009.

DALMÁZIO, I. **Aplicação da Espectrometria de Massas com Ionização Electrospray no Monitoramento de Processos Oxidativos Avançados de Interesse Ambiental: Degradação de Fármacos, Avaliação de Sistemas Oxidativos e Oxidação do Isopreno**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, 2007.

DA-SILVA, W. S.; RIBICH, S.; DRIGO, R. A.; CASTILLO, M.; PATTY, M. E.; BIANCO, A. C. The chemical chaperones tauroursodeoxycholic and 4 phenylbutyric acid accelerate thyroid hormone activation and energy expenditure. **Febs Lett**, v. 585, p. 539-544, 2011.

DEBRUYNE, P. R.; BRUYNEEL, E. A.; LI, X.; ZIMBER, A. GESPACH, C.; MAREEL, M. M. The role of bile acids in carcinogenesis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanism of Mutagenesis**, v. 480-481, p. 359-369, 2001.

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.

DINIZ, M. E. R. **Uso da técnica de espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) para o estudo do mecanismo de reações orgânicas e avaliação do perfil de fragmentação de bis-hidroxiiminas aromáticas**. 2011, 108 f. Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Química - Química Analítica, Belo Horizonte, 2011.

DIONÍSIO, P. A.; AMARAL, J. D.; RIBEIRO, M. F.; LO A. C.; D'HOOGHE, R.; RODRIGUES C. M. Amyloid- β pathology is attenuated by tauroursodeoxycholic acid treatment in APP/PS1 mice after disease onset. **Neurobiol Aging**, v. 36, p. 28-240, 2015.

DÜFER, M.; HÖRTH, K.; WAGNER, R.; SCHITTENHELM, B.; PROWALD, S.; WAGNER, T.F.; OBERWINKLER, J.; LUKOWSKI, R.; GONZALEZ, F. J.; KRIPPEIT-DREWS, P.; DREWS, G. Bile

acids acutely stimulate insulin secretion of mouse β -cells via farnesoid X receptor activation and K(ATP) channel inhibition. **Diabetes**, v. 61, p. 1479-1489, 2012.

EKMAN, R.; SILBERRING, J.; WESTMAN-BRINKMALM, A.; KRAJ, A. **Mass spectrometry: Instrumentation, Interpretation and Applications**. 3 ed. Jhon Wiley & Sons, 388 p., 2009.

EL KIHIL, L.; CLÉMENT, M.; BAZIN, M. A.; DESCAMPS, G.; KHALID, M.; RAULT, S. New lithocholic and chenodeoxycholic piperazinylcarboxamides with antiproliferative and pro-apoptotic effects on human cancer cell lines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 8737-8744, 2008.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). **Guideline on Bioanalytical Method Validation**. London, 2011.

FENN, J. B. "Mass spectrometric implications of high-pressure ion sources" **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 200, p. 459, 2000.

FERNANDES, A., VAZ, A. R., FALCÃO, A. S., SILVA, R. F. M., BRITO, M. A. AND BRITES, D. Glycoursodeoxycholic Acid and interleukin-10 modulate the reactivity of rat cortical astrocytes to unconjugated bilirubin. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 66, p. 789-798, 2007.

GANESAN, M.; NANJUNDAN, S.; VISWANATHAN, S.; UMA, G. Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry for the Simultaneous Determination of Ursodiol and its Major Metabolites, Tauroursodeoxycholic Acid and Glycoursodeoxycholic Acid in Human Plasma. **E-Journal of Chemistry**, v. 9(3), p. 1605-1612, 2012.

GOLDMAN, A.; CONDON, A.; ADLER, E.; MINNELLA, M.; BERNSTEIN, C.; BERNSTEIN, H.; DVORAK, K. Protective effects of glycoursodeoxycholic acid in Barrett's esophagus cells. **Diseases of the Esophagus**, v. 23, n. 2, p. 83-93, 2010.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Editor: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. 11 ed., Porto Alegre, AMFGH, 2010, 1844p.

GOWDA, G. A. N.; SHANAIAH, N.; COOPER, A.; MALUCCIO, M.; RAFTERY, D. Bile acids conjugation in human bile is not random: new insights from 1 H-NMR spectroscopy at 800 MHz. **Lipids**, v.44, p. 527-535, 2009.

GUO, Q.; SHI, Q.; LI, H. LIU, J.; WU, S.; SUN, H.; ZHOU, B. Glycolipid Metabolism Disorder in the Liver of Obese Mice Is Improved by TUDCA via the Restoration of Defective Hepatic Autophagy. **International Journal of Endocrinology**, v. 2015, p. 11, 2015.

HAGESTAM, H.; PINKERTON, T. C. Internal surface reversed-phase silica supports for liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 57, p. 1757-1763, 1985.

HARINCK, F. Primary biliary cholangitis, let's try to keep the new nomenclature correct!. Nail haemorrhage after high altitude; what is your diagnosis. **The Netherlands Journal of Medicine**, p. 229, 2016.

HIGUERA-DE LA TAJERA, F.; CAMANO, A. I. S. Pathophysiological mechanisms involved in non-alcoholic stetohepatitis and novel potential therapeutic targets. **World Journal of Hepatology**, v. 7, p. 1297-1301, 2015.

HO, C. S., LAM, C. W. K., CHAN, M. H. M., CHEUNG, R. C. K., LAW, L. K., LIT, L. C. W., TAI, H. L. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 24, n. 1, p. 3, 2003.

HOFMANN, A. The Continuing Importance of Bile Acids in Liver and Intestinal Disease. **Archives of Internal Medicine**, vol.159, n. 22, 13-27, 1999.

HOLCAPEK, M.; JIRÁSKO, R.; LÍSA, M. "Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related tchiques". **Journal of Chromatography A**, 1259:3, 2012.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V., **Mass Spectrometry Principles and Applications**, John Wiley & Sons, New York, 3 ed., 2007.

HORKOVICS-KOVATS, S.; ULČ, I.; VÍT, L.; NĚMEC, B.; RADA, V. Physicochemical pharmacokinetics as an optimization tool for generic development: A case study. **European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 111, p. 349-357, 2018.

ICH – International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **Guideline on validation of analytical procedure**: methodology, 1996.

IKEGAMI, T.; MATSUZAKI, Y. Ursodeoxycholic acid: Mechanim of action and novel clinical applications. **Hepatoly Research**, v. 38(2), p. 123-131, 2008.

JIN, Y.; XUE, X.; SHI, H.; XIAO, Y.; ZHANG, F.; LIANG, X. HPLC and UPLC switch for TCM analysis. **Mode. Tradit. Chin. Med. Mater. Med.**, v. 10(1), p.80 - 84, 2008.

KATONA, B. W.; ANANT, S.; COVEY, D. F.; STENSON, W. F. Characterization of enantiomeric bile acid-induced apoptosis in colon cancer cell lines. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 3354- 3364, 2009.

KOLE, P. L.; VENKATESH, J.; SHESHALA, R. Recent advances in sample preparation technicques for effective bioanalytical methods. **Biomedical Chromatography**, v. 25 (1-2), p. 199-217, 2011.

KUMAR, B.S.; CHUNG, B.C.; LEE, Y.; YI, H. J.; LEE, B.; JUNG, B. H. Gas chromatography–mass spectrometry-based simultaneous quantitative analytical method for urinary oxysterols and bile acids in rats. **Analytical Biochemistry**, v. 408, p. 242–252, 2011.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente "compatíveis"? **Scientia Chromatographica**, v. 1(2), 35-61, 2009.

LANG, J. R.; BOLTON, S.; A comprehensive method validation strategy for bioanalytical applications in the pharmaceutical industry--1. Experimental considerations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 9(5), p. 357-361, 1991.

LA ROCA, M. F.; SOBRINHOJ. L. S.; NUNE, L. C. C.; NETO, P. J. R. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Revista Brasileira Farmacologia**, Recife, v. 88, n. 4, p. 177-180, 2007.

LAZARIDIS, K. N.; GORES, G. J.; LINDOR, K. D. Ursodeoxycholic acid 'mechanisms of action and clinical use in hepatobiliary disorders. **Journal of Hepatology**, v. 35, p. 134-146, 2001.

LE, T. A.; LOOMBA, R. Management of Non-alcoholic Fatty Liver and Steatohepatites. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, v. 2(2), p. 156-173, 2012.

LIEBERMAN, M.; MARKS, A. D. **Marks' basic medical biochemistry: a clinical approach**. 4 ed. Philadelphia: Wolter Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 1014 p., 2013.

LEUSCHNER, U.; LEUSCHNER, M.; SIERATZKI. J.; KURTZ, W.; HÜBNER, K. Gallstone dissolution with ursodeoxycholic acid in patients with chronic active hepatitis and two years follow-up. A pilot study. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 30, p. 642-649, 1985.

LINDOR, K. D. Ursodiol for primary sclerosing cholangitis. **New England Journal of Medicine**, v. 336, p. 691-695, 1997.

LI, T.; CHIANG, J. Y. L. "Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy." **Pharmacological reviews**, vol. 66, p. 948-983, 2014.

LONG, S. L.; GAHAN, C. G. M.; JOYCE, S. A. Interactions between gut bacteria and bile in health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 56, p. 54-65, 2017.

MAJORS, R. E. **Sample Preparation Fundamentals for Chromatography**, Agilent Technology, Wilmington, 2014.

MAKINO, I.; SHINOZAKI, K.; YOSHINO, K.; NAKAGAWA, S. Dissolução de cálculos biliares de colesterol pela administração a longo prazo de ácido ursodesoxicólico. **Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi**, v. 72, p. 690 – 702, 1975.

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**, v. 75, p. 3019 – 3030, 2003.

MATYSIK, S.; SCHMITZ, G. Application of gas chromatographytriple quadrupole mass spectrometry to the determination of sterol components in biological samples in consideration of the ionization mode. **Biochimie**, v.95, p.489-95, 2013.

MENDHAM, J.; VOGEL, A. I.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D. **Análise química quantitativa**. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2002.

MERLI, M.; BERTASI, S.; SERVI, R.; DIAMANTI, S.; MARTINO, F.; DE SANTIS, A.; GOFFREDO, F.; QUATTRUCCI, S.; ANTONELLI, M.; ANGELICO, M. Effect of a medium dose of ursodeoxycholic acid with or without taurine supplementation on the nutritional status of patients with cystic fibrosis: a randomized, placebocontrolled, crossover trial. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.19, n. 2, p. 198-203, 1994.

MONTE, M. J.; MARIN, J. J.; ANTELO, A.; VAZQUEZ-TATO, J. Ácidos biliares: química, fisiologia e fisiopatologia. **World Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 7, 804-816, 2009.

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

NIESSEN, W. M. A. “State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry” **Journal of Chromatography A**, v. 856, p. 179, 1999.

NOVÁKOVÁ, L.; VLCKOVÁ, H. A. A review of current trends and advances in modern bioanalytical methods. Chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 656 n. 1-2, p. 8-35, 2009.

OZCAN, L.; ERGIN, A.S.; LU, A.; CHUNG, J.; SARKAR, S.; NIE, D.; MYERS M. J.; OZCAN, U. Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. **Cell Metabolism**, v. 9, p. 35-51, 2009.

PALMELA, I.; CORREIA, L.; SILVA, R. F. M.; SASAKI, H.; KIM, K. S.; BRITES, D.; BRITO, M. A. Hydrophilic bile acids protect human blood-brain barrier endothelial cells from disruption by unconjugated bilirubin: an *in vitro* study. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, p. 1-11, 2016

PERWAIZ, S.; TUCHWEBER, B.; MIGNAULT, D.; GILAT, T.; YOUSEF, I. M. Determination of bile acids in biological fluids by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Lipid Research**, v. 42, v. 114-119, 2001.

PIRES, M. J.; COLAÇO, A. O papel dos ácidos biliares na patologia e terapêutica das doenças hepáticas no cão e no gato. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 99, n. 551, p. 137-143, 2004.

PEREIRA, H. M. **Etapa Bioanalítica de estudos de bd/be: um novo olhar da Garantia da qualidade em busca da qualidade total**. 2014, 99 f. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária. Rio de Janeiro, 2014.

PORCARI, A. M. **Aplicações da espectrometria de massas em caracterização e quantificação de matrizes biológicas**. 2012, 75 f. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Química da UNICAMP para obtenção do título de Mestre em Química na área de Química Analítica, Campinas, 2102.

PORTINCASA, P.; DI, C. A.; WANG, H. H.; PALASCIANO, G.; VAN, E. K. J.; MOSCHETTA A.; WANG, D. Q. Coordinate regulation of gallbladder motor function in the gut-liver axis. **Hepatology**, v. 47. P. 2112-2126, 2008.

POSSAS, J. L. S.; SANTOS, J. E.; NASCIMENTO, M. C.; SANTOS, P. A.; ANJOS, D. W. C.; MOURA, W. C. Uso do conceito do erro total, dos perfis de exatidão e do índice de exatidão no pré-estudo de validação de ensaio imunoenzimático. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.71, n. 4, p. 691-705, 2012.

POUPON, R.; CHRÉTIEN, Y.; POUPON, R. E.; BALLETT, F.; CALMUS, Y.; DARNIS, F. Is ursodeoxycholic acid an effective treatment for primary biliary cirrhosis? **Lancet**, v. 1, p. 834 – 836, 1987.

POWELL, A. A.; LARUE, J. M.; BATTA, A. K.; MARTINEZ, J. D. Bile acid hydrophobicity is correlated with induction of apoptosis and/or growth arrest in HCT116 cells. **Biochemical Journal**, v. 356, p. 481– 486, 2001.

PRASAIN, J. K. **Tandem Mass Spectrometry: Applications and Principles**; Croatia, 2012.

PUTRI, S. P.; FUKUSAKI, E. Mass spectrometry-based metabolomics: a practical guide. **CRC Press**, 2014.

QIAO, X.; YE, M.; LIU, C. F.; YANG, W. Z.; MIAO, W. J.; DONG, J.; GUO, D. A. A tandem mass spectrometric study of bile acids: Interpretation of fragmentation pathways and differentiation of steroid isomers. **Steroids**, v. 77, p. 204-211, 2012.

QUEIROZ, M. E. C.; Lanças, F. M. Análise de fármacos em material biológico: acoplamento microextração em fase sólida "no tubo" e cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 28, n. 5, 880-886, 2005.

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**, v. 24, p. 68; 2001.

RAGHUNADHA, R. S.; SARATH, C. I.; JAYAVEERA, K. N.; KOTESWARA, R. D. Quantification of ursodeoxy cholic acid in human plasma by using high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometric method and its applications in pharmacokinetics. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 2, n.3, p.59-69, 2010.

RAJALINGAM, D.; LOFTIS, C.; XU, J. J. KUMAR, T. K. Trichloroacetic acid-induced protein precipitation involves the reversible association of a stable partially structured intermediate, **Protein science: a publication of the Protein Society**, v. 18, p. 980-993, 2009.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Revista Química Nova**, Campinas, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIDLON, J. M.; KANG, D. J. HYLEMON, P. B. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. **Journal of Lipid Research**, v. 47, p. 241-259, 2006.

SCHALLEY C. A., Supramolecular chemistry goes gas phase: the mass spectrometric examination of noncovalent interactions in host–guest chemistry and molecular recognition **Int. Journal of Mass Spectrometry**, v. 194, p. 11-39, 2000.

SHAH, V. P. et al. Bionalytical method validation – A revisit with a decade of progress. **Pharmaceutical Research**, v. 17, n.12, p. 1551-1557, 2000.

SI, MI; · DAVID, W. L.; JUSTINE, M. T.; · PAUL, W. W.; · JONATHAN, M. C. Determination of Bile Acids in Piglet Bile by Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry. **Lipids**, v. 51, p.359-372, 2016.

SIRTORI, C.; LÓPEZ, A. M. A.; RODRÍGUEZ, S. M. **Evaluación Analítica de Procesos de Transformación Biológica Fotoquímica y Fotocatalítica de Fármacos em Agua**, Editorial Ciemat: Madrid, 2007.

SILVA, S. L.; VAZ, A. R.; DIOGENES, M. J.; VAN ROOIJEN, N.; SEBASTIAO, A. M.; FERNANDES, A.; SILVA, R. F.; BRITES, D. Neuritic growth impairment and cell death by unconjugated bilirubin is mediated by NO and glutamate, modulated by microglia, and prevented by glycooursodeoxycholic acid and interleukin-10. **Neuropharmacology**, v. 62(7), 2398-2408, 2012.

SIDDESHA, J. M.; NAKADA, E. M.; MIHAVICS, B. R.; HOFFMAN, S. M.; RATTU, G. K.; CHAMBERLAIN, N.; CAHOON, J. M.; LAHUE, K. G.; DAPHTARY, N.; ALIYEVA, M.; CHAPMAN, D. G.; DESAI, D. H.; POYNTER, M. E.; ANATHY, V. Effect of a chemical chaperone, tauroursodeoxycholic acid, on HDM-induced allergic airway disease. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 310, p. 1243-1259, 2016.

SIMONI, P.; CERRÈ, C.; CIPOLLA, A.; POLIMENI, C.; PISTILLO, A.; CESCHEL, G.; RODA, E.; RODA, A. Bioavailability study of a new, sinking, enteric-coated ursodeoxycholic acid formulation. **Pharmacological Research**, 31, n. 2, 115-119, 1995

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. **Practical HPLC method development**", 2. ed. New York: John Wiley and Sons, 1997. p. 100-173.

STEVENSON, D. Sample preparation In: **High performance liquid chromatography, fundamental principles and practice**. Wainer, I.W. and Lough, W.J., Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1995. p. 168-185.

TAGUCHI, K.; FUKUSAKI, E.; BAMBA, T. Simultaneous and rapid analysis of bile acids including conjugates by supercritical fluid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1299, p. 103-109, 2013.

TANG, L.; KEBARLE, P. Effect of the conductivity of the electrosprayed solution on the electrospray current. Factors determining analyte sensitivity in electrospray mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 63, , 2709 – 2715, 1991.

TAY, J.; TINMOUTH, A. FERGUSSON, D.; HUEBSCH, L.; ALLAN, D. S. Systematic Review of Controlled Clinical Trials on the Use of Ursodeoxycholic Acid for the Prevention of Hepatic Venooclusive Disease in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 13(2), 206-217, 2007.

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

THAKARE, R.; ALAMOUDI, J. A.; GAUTAM, N.; RODRIGUES, A. D.; ALNOUTI, Y. Species differences in bile acids II. Bile acid metabolism. **Journal of Applied Toxicology**, v. 38, 1-17, 2018.

TONIN, F.; ARENDS, I. W. C. E. Latest development in the synthesis of ursodeoxycholic acid (UDCA): a critical review. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v.14, p. 470–483, 2018.

TURDI, S.; HU, N.; REN, J. Tauroursodeoxycholic acid mitigates high fat diet-induced cardiomyocyte contractile and intracellular Ca²⁺ anomalies. **PLoS One**, v. 8, 2013.

VAN DEN BOSSCHE, L.; HINDRYCKX, P.; DEVISSCHER, L.; DEVRIESE, S.; VAN WELDEN, S.; HOLVOET, T.; VILCHEZ-VARGAS, R.; VITAL, M.; PIEPER, D. H.; BUSSCHE, J. V.; VANHAECKE, L.; VAN DE WIELE, T.; DE VOS, M.; LAUKENS, D. Ursodeoxycholic Acid and Its Taurine- or Glycine-Conjugated Species Reduce Colitogenic Dysbiosis and Equally Suppress Experimental Colitis in Mice. **Applied and environmental microbiology**, 83(7), e02766-16, 2017.

VANG, S.; LONGLEY, K.; STEER, C. J.; LOW, W. C. The Unexpected Uses of Urso- and Tauroursodeoxycholic Acid in the Treatment of Non-liver Diseases. **Global advances in health and medicine**, 3(3), 58–69, 2014.

VALKONEN, A.; LAHTINEN, M.; TAMMINEN, J.; KOLEHMAINEN, E. Solid state structural studies of five bile acid derivatives. **Journal of Molecular Structure**, v. 886, p. 197-206, 2008.

VAZ, A. R.; DELGADO-ESTEBAN, M.; BRITO, M. A.; BOLANOS, J. P.; BRITES, D.; ALMEIDA, A. Bilirubin selectively inhibits cytochrome c oxidase activity and induces apoptosis in immature cortical neurons: assessment of the protective effects of glyoursodeoxycholic acid. *J Neurochem* 112(1):56-65. Vilhardt F. 2005. Microglia: phagocyte and glia cell. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, n. 1, p. 17-21, 2010.

VIEIRA, F. P.; REDIGUIERI, C. F.; REDIGUIERI, C. F. **A regulação de medicamentos no Brasil**. Porto Alegre: Artmed, 2013. 671p.

XAVIER, J. M. Tauroursodeoxycholic acid increases neural stem cell *pool* and neuronal conversion by regulating mitochondria-cell cycle retrograde signaling. **Cell Cycle**, v. 13, p.22, p.3576–3589, 2014.

WANG, X. X.; EDELSTEIN, M. H.; GAFTER, U.; QIU, L.; LUO, Y.; DOBRINSKIKH, E.; LUCIA, S.; ADORINI, L.; D'AGATI, V. D.; LEVI, J.; ROSENBERG, A.; KOPP, J. B.; GIUS, D. R.; SALEEM, M. A.; LEVI, M. G. Protein-Coupled Bile Acid Receptor TGR5 Activation Inhibits Kidney Disease in Obesity and Diabetes. **Journals of the American Society of Nephrology**, v. 27, p. 1362-1378, 2016.

WARD, J. E.; REN, R.; TORALDO, G.; SOOHOO, P.; GUAN, J.; HARA, C. O.; SELDIN, D. C. Doxycycline reduces fibril formation in a transgenic mouse model of AL amyloidosis. **Blood**, v. 118, n. 25, p. 6610–6617, 2011.

WARD, A.; BROGDEN, R. N.; HEEL, R. C.; SPEIGHT, T. M.; AVERY, G. S. Ursodeoxycholic acid: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy. **Drugs**. v. 27, p.95–131, 1984.

WHO-World Health Organization Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Thirty-second report, **WHO Technical Report Series**, n.823, Geneva, 1992.

WOO, S. J.; KIM, J. H.; YU, H. G. Ursodeoxycholic acid and tauroursodeoxycholic acid suppress choroidal neovascularization in a laser-treated rat model. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 26, p. 223-229, 2010.

YANG, J. S.; KIM, J. T.; JEON, J.; PARK, H. S.; KANG, G. H.; PARK, K. S.; LEE, H. K.; KIM, S.; CHO, Y. M. Changes in hepatic gene expression upon oral administration of taurine-conjugated ursodeoxycholic acid in ob/ob mice. **PLoS One**, v. 5, 2010.

YE, L.; LIU, S.; WANG, M.; SHAO, Y.; DING, M. High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of bile acid profiles in serum of women with intrahepatic cholestasis of pregnancy. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 860, p. 10-17, 2007.

YOU, J.; FU, Y.; SUN, Z.; SUO, Y. 2-(5-Benzoacridine)ethyl-ptoluenesulfonate as sensitive reagent for the determination of bile acids by HPLC with fluorescence detection and online atmospheric chemical ionization-mass spectrometric identification. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 2657-66, 2010.

YODIM, K. A.; SAUNDERS, K. C. 'A review of LC-MS techniques and high-throughput approaches used to investigate drug metabolism by cytochrome P450s". **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 878, p. 1326, 2010.

7. ANEXOS

. **Anexo i:** Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa. Número do Parecer: 2.969.992



ANEXO 1: PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: TCLE - Pool Plasma

Pesquisador: Márcia Aparecida Antônio

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 00343018.4.0000.5514

Instituição Proponente: CASA DE NOSSA SENHORA DA PAZ AÇAO SOCIAL FRANCISCANA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.969.992

Apresentação do Projeto:

TCLE - versão 4.0 para obtenção de Plasma.

Objetivo da Pesquisa:

Obtenção de plasma utilizado em desenvolvimento de metodologia analítica para fármacos diversos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não se aplica.

Benefícios:

Não se aplica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O protocolo baseia-se no envio ao CEP do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (versão 4.0), que será aplicado a voluntários para coleta de 80 mL de sangue com o objetivo de obtenção de plasma utilizado no desenvolvimento de metodologias analíticas diversas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os Termos de apresentação obrigatória foram enviados corretamente.

Recomendações:

Não há.

Endereço: SÃO FRANCISCO DE ASSIS 218

Bairro: JARDIM SAO JOSE

CEP: 12.916-900

UF: SP

Município: BRAGANÇA PAULISTA

Telefone: (11)2454-8981

Fax: (11)4034-1825

E-mail: comite.etica@saofrancisco.edu.br



Continuação do Parecer: 2.969.992

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Considerações Finais a critério do CEP:

APÓS DISCUSSÃO EM REUNIÃO DO DIA 18/10/2018, O COLEGIADO DELIBEROU PELA APROVAÇÃO DO TCLE POOL PLASMA. APÓS A CONCLUSÃO DO PROJETO É OBRIGATÓRIO O ENVIO DO RELATÓRIO FINAL PARA ENCERRAMENTO DO PROJETO.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1229428.pdf	02/10/2018 20:47:11		Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_POOL_versao4_completa.pdf	02/10/2018 20:46:12	Maira Eduarda Zanin	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PLASMA_POOL_vs4_15_10_2018.pdf	02/10/2018 20:45:48	Maira Eduarda Zanin	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Carta_Submis_TCLE_POOL_vs4_2018.pdf	02/10/2018 20:45:30	Maira Eduarda Zanin	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRAGANCA PAULISTA, 18 de Outubro de 2018

Assinado por:
Alessandra Gambero
(Coordenador(a))

Endereço: SAO FRANCISCO DE ASSIS 218
Bairro: JARDIM SAO JOSE **CEP:** 12.916-900
UF: SP **Município:** BRAGANCA PAULISTA
Telefone: (11)2454-8981 **Fax:** (11)4034-1825 **E-mail:** comite.etica@saofrancisco.edu.br

. Anexo ii: Method development and validation of ursodiol and its major metabolites in human plasma by HPLC-tandem mass spectrometry.

ANEXO 2

Clinical Pharmacology: Advances and Applications

Dovepress

open access to scientific and medical research

Open Access Full Text Article

Methodology

Method development and validation of ursodiol and its major metabolites in human plasma by HPLC-tandem mass spectrometry

This article was published in the following Dove Press journal:
Clinical Pharmacology: Advances and Applications

Márcio Cardoso Pinto
danilo Chorfi Berton
Alexandre Cavenatti de oliveira
Carolina Martins Lazaro
Silvana Aparecida Calafatti
Carandina

Pharmacology department (UNIFag),
Universidade São Francisco, Bragança
Paulista, SP, Brazil

Background: Ursodeoxycholic acid (UDCA) and its metabolites tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) and glyoursodeoxycholic acid (GUDCA) have been the subject of several pharmacological studies. The objective of this study was to develop an innovative method of quantification by HPL-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), with a lower cost and suitable, for application in bioequivalence studies.

Methods: The procedure involved liquid-liquid extraction for quantification of UDCA/GUDCA and precipitation extraction for TUDCA, using deuterated substances as internal standards (ISs) and Phenomenex Luna 250×4.6 mm 5 μ C₁₈ 100A column. The mobile phase used was acetonitrile/ammonium acetate 30 mM (420: 580 v/v pH 7) for UDCA, acetonitrile/ammonium acetate 10 mM/ammonium hydroxide (400:600: 0.5 v/v/v pH 9) for GUDCA, and acetonitrile/ammonium acetate 10 mM (570: 430 v/v pH 7) for TUDCA. Ions were monitored by the electrospray ion source (ESI) mass spectrometer, operating in a negative ionization mode. Compound determination was performed by LC-MS/MS system using a calibration curve of 15–10,000 ng/mL for UDCA/GUDCA and 5–500 ng/mL for TUDCA. The method was developed and validated according to the Brazilian National Health Surveillance Agency (ANVISA) of Brazil norms harmonized with the main international guidelines as a prerequisite for conducting *in vivo* study in human volunteers.

Results: The method did not present matrix effect and residual effect, showing to be selective for studied molecules, with adequate accuracy and precision. In addition, the method was considered sensitive presenting a coefficient of variation less than 20% for the lower limit of quantification of each compound.

Conclusion: This method can be applied in bioequivalence studies to determine ursodiol and its metabolites reproducibly, simply, and effectively with the use of readily accessible analytical materials and instrumentation.

Keywords: ursodeoxycholic acid, glicoursodeoxycholic acid, tauroursodeoxycholic acid, bioequivalence, LC-MS/MS

Introduction

Ursodeoxycholic acid or ursodiol (3 α , 7- β -dihydroxy-5- β -cholanic acid [UDCA]) is a bile acid that naturally occurs in small amounts in human plasma. It acts physiologically in the regulation of cholesterol, reducing the rate at which the intestine absorbs and synthesizes these molecules.^{1,2} For this reason, UDCA is used pharmacologically in pathologies where there is dysfunction of that regulation, such as for the treatment of gallstones formed by cholesterol, postcholecystectomy syndrome, primary biliary cirrhosis, dyskinesias, hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia, cholestasis, and chronic hepatitis, among others.^{3–6}

Correspondence: Márcio Cardoso Pinto
Pharmacology department (UNIFag),
São Francisco University (Universidade
São Francisco), Bragança Paulista College,
São Francisco de Assis Avenue, Jardim
São José, 12916-900, Bragança Paulista,
SP, Brazil
tel +55 11 2454 8405
Fax +55 11 99631 5831
email marcio.pinto@usf.edu.br

submit your manuscript | www.dovepress.com
Dovepress

<http://dx.doi.org/10.2147/CPAA.S187519>

Clinical Pharmacology: Advances and Applications 2019:11 1-13

1

© 2019 Pinto et al. This work is published and licensed by Dove Medical Press Limited. The full terms of this license are available at <https://www.dovepress.com/terms.php> and incorporate the Creative Commons Attribution - Non Commercial (unported, v3.0) License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>). By accessing the work you hereby accept the Terms. Non-commercial uses of the work are permitted without any further permission from Dove Medical Press Limited, provided the work is properly attributed. For permission for commercial use of this work, please see paragraphs 4.2 and 5 of our Terms (<https://www.dovepress.com/terms.php>).

After ingestion, UDCA passes through the liver where, by amidation processes, it is conjugated with glycine or taurine, originating from its main metabolites glyoursodeoxycholic acid ($(N-[(3\alpha,5\beta,7\beta)-3,7\text{-dihydroxy-24-oxocholan-24-yl}]\text{-glycine})$ [GUDCA]) and tauroursodeoxycholic acid ($2-[(3\alpha,7\beta\text{-dihydroxy-5}\beta\text{-cholan-24-oyl})\text{-taurine}]$ [TUDCA]). After being secreted into the hepatic bile ducts, these conjugates are concentrated in the gallbladder and expelled into the duodenum, where their pharmacological functions will be performed.^{4,5,7} Therefore, it is necessary to quantify both the unaltered drug (UDCA) and its metabolites (TUDCA and GUDCA) in bioequivalence studies.⁸ The chemical structures of these compounds are presented in Figure 1.

There are countless researches on new applications of UDCA nowadays, and so far, results have demonstrated that this drug is able to delay the progression of cataract in rats with diabetes induced by hyperglycemia due to its potential antioxidant action;⁹ the UDCA has also been shown to promote healing in the epithelium of the colonic mucosa of rats and has been identified as a natural regulator of that process;¹⁰ the previous studies have also shown that the ursodiol metabolite TUDCA promotes decreased insulin resistance in the liver, skeletal muscle, and adipose tissue in obese rats, and similar results have been obtained in humans;¹¹ UDCA has shown anti-inflammatory effects and promoted functional recovery in rats with spinal cord injury;⁶ male rats with cholestasis were treated with UDCA and it led to the prevention of the development of obesity associated with hypertension in their male litters,¹¹ among several other studies. The existence of recent research for treatment and control of several pathologies either associated with or not associated with liver problems shows that

UDCA has broad therapeutic potential and could well become the target of pharmacological discoveries. This makes the development of generic UDCA drugs especially attractive because it brings with it the possibility of new drug therapies at a lower cost to the population.

Several analytical methods have been developed for determining bile acids in biological fluids, among them the UDCA and its metabolites, each one with its own particularities.^{3,8,13} The development of a suitable and simple method in LC-MS/MS (HPLC-tandem mass spectrometry) for UDCA, GUDCA, and TUDCA determination could be useful in enabling an understanding of the original compound's metabolism as well as in obtaining new generic drugs that are more accessible and less costly for the population and the pharmaceutical industry.

This study aimed to develop a new, efficient, and simple methodology for quantification of ursodiol and its main metabolites in low concentrations in human plasma through the use of LC-MS/MS methodology, thereby enabling its application in bioequivalence/bioavailability studies. In addition, a full validation of the method was performed in accordance with the guidelines of the Brazilian National Health Surveillance Agency (ANVISA), which are harmonized with the main international guidelines and are a prerequisite for conducting an in vivo study in human volunteers.¹⁴

Materials and methods

Materials

The UDCA reference standard was purchased from British Pharmacopoeia (Queen's Road, Teddington, UK), and its metabolites, TUDCA sodium salt and GUDCA, were purchased from Synline Research (Ontario, Canada),

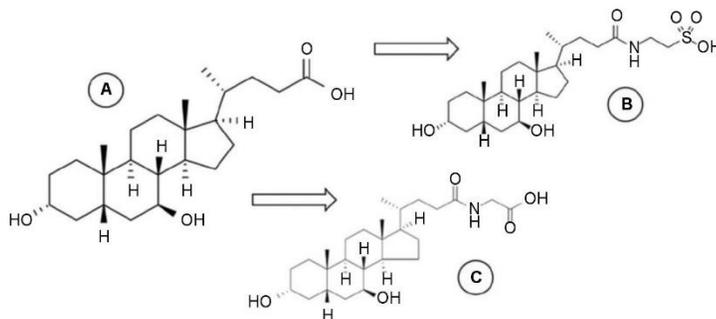


Figure 1 Chemical structure of UdCA (A) and its main metabolites, gUdCA (B) and tUdCA (C).
Abbreviations: gUdCA, glyoursodeoxycholic acid; tUdCA, tauroursodeoxycholic acid; UdCA, ursodeoxycholic acid.

while their respective deuterated internal standards (ISs) were purchased from IsoSciences (Pennsylvania, Ambler, USA). Human plasma was obtained from UNIFAG (Bragança Paulista, SP, Brazil). The type I water HPLC grade was obtained internally using a Millipore Academic purification system. Acetonitrile and methanol (MeOH) were purchased from J.T. Baker-Avantor (Xalostoc, Mexico), and ammonium acetate, hydrochloric acid (HCl), diethyl ether, dichloromethane, ammonium hydroxide, and ethyl acetate were purchased from EMD Millipore (Billerica, MA, USA).

Stock solutions and standards

The stock solutions of analytes (UDCA, GUDCA, and TUDCA) and their respective deuterated IS were prepared by mixing appropriate amounts of the standards with MeOH to obtain solutions at the respective concentrations: 100.0 µg/mL for TUDCA, TUDCA D₄, and GUDCA D₄; 200.0 µg/mL for UDCA D₄, and 500.0 µg/mL for UDCA and GUDCA. The stock solutions were stored in a refrigerator with controlled temperature in a range of 2°C–8°C±2°C.

From these solutions, the respective working solutions were prepared and used to obtain the calibration curve composed of eight points in the range of 15–10,000 ng/mL for UDCA/GUDCA and 5–500 ng/mL for TUDCA. Spiking was performed on human plasma with an appropriate amount of each analyte. Quality controls (QCs) were spiked similarly to calibration curve points at the concentration of 45, 5,000, and 8,000 ng/mL for UDCA/GUDCA and 15, 250, and 400 ng/mL for TUDCA.

Sample preparation

UdCA

The UDCA samples were prepared by liquid–liquid extraction done by shaking 450 µL of UDCA spiked plasma samples with 50 µL of 9.0 µg/mL UDCA D₄ solution prepared in MeOH, 50 µL of 1M HCl solution, and 1,250 µL diethyl ether/dichloromethane (70:30 v/v) for 5 minutes on a shaker table and then centrifuged for 10 minutes (relative centrifugal force [RCF]: 18,506× g, 4°C). 850 µL of the supernatant was transferred to another microtube and reserved. 1,250 µL of diethyl ether/dichloromethane (70:30 v/v) was added to the remaining plasma; it was shaken for 5 minutes and then centrifuged for 10 minutes (RCF: 18,506× g, 4°C). 850 µL of supernatant was transferred to the reserved microtube and was dried under nitrogen flow and resuspended in 150 µL of acetonitrile/ammonium acetate 10 mM/ammonium hydroxide (70:30:0.1 v/v/v), was shaken for 2 minutes, and then 30 µL was injected for analysis.

gUdCA

Like the UDCA samples, the GUDCA samples were prepared by liquid–liquid extraction, shaking 300 µL of GUDCA spiked plasma with 50 µL of 3.0 µg/mL glycosodeoxycholic D₄ solution in MeOH and 50 µL of 1M HCl solution for 1 minute on a shaker table. Then, 1,250 µL of diethyl ether/dichloromethane (70:30 v/v) was added, and the sample was shaken again for 5 minutes and then centrifuged for 10 minutes (RCF: 18,506× g, 4°C). 900 µL of the supernatant was transferred to another microtube. This was dried under nitrogen flow and resuspended in 150 µL of acetonitrile/ammonium acetate 10 mM/ammonium hydroxide (70:30:0.1 v/v/v), shaken for 2 minutes and then 15 µL were inject for analysis.

tUdCA

TUDCA samples were prepared by deproteinization extraction (precipitation), shaking 400 µL of TUDCA spiked plasma with 50 µL of 2.0 µg/mL TUDCA D₄ solution in acetonitrile (MeCN) and 1,250 µL of ethyl acetate for 3 minutes on a shaker table and then centrifuged for 5 minutes (RCF: 18,506× g, 4°C). Samples were frozen for 10 minutes in a –70°C freezer, the supernatant was discarded, and after complete thawing of the residual sample, 600 µL of acetonitrile was added. The mixture was shaken for 5 minutes and centrifuged for 10 minutes (RCF: 18,506× g, 4°C). 500 µL of supernatant was transferred to another microtube, 150 µL of Milli-Q ultrapure water was added and shaken for 2 minutes, and then 20 µL was injected for analysis.

Chromatography and quantification

The chromatographic systems used were HPLC (Shimadzu, Japan) coupled to a Quattro Micro/Quattro Premier mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA) for each of the three analytes. The chromatographic separation was done through a Phenomenex Luna 5µ C18 100A 250 × 4.6 mm (Torrence, USA) column for the three analytes, with a mobile phase consisting of acetonitrile/ammonium acetate 30 mM (420:580, v/v), pH 7.0, for the UDCA; acetonitrile/ammonium acetate 10 mM/ammonium hydroxide (400:600:0.5, v/v/v), pH 9.0, for the GUDCA; and acetonitrile/ammonium acetate 10 mM (570:430, v/v), pH 7.0, for the TUDCA. The mobile phase flows were set at 0.450 mL/min for UDCA (with gradient: 0.01–0.51 minute, 0.45 mL/min – 50 kgf; 0.52–1.90 minutes, 2.00 mL/min – 200 Kgf; 1.91 minute, 0.45 mL/min – 50 kgf), 0.700 mL/min for GUDCA (with gradient: 0.01–2.50 minutes, 0.700 mL/min – 85 kgf; 2.51–4.75 minutes, 0.35 mL/min – 44 kgf; 4.76 minute, 0.700 mL/min – 85 kgf), and 0.200 mL/min

for TUDCA (with gradient: 0.01–0.1 minute/1.21–5.5 minutes and 7.51 minutes, 0.200 mL/min – 20 kgf; 0.11–1.2 minutes and 5.51–7.5 minutes, 1.5 mL/min – 130 kgf).

The use of a splitter was not necessary. Under the described conditions, the UDCA, GUDCA, and TUDCA elution times are of 3.47, 3.34, and 3.19 with a total run time of 6.50, 5.00, and 8.00, respectively. Ions were monitored by an electrospray ion source (ESI) mass spectrometer, operating in a negative ionization mode, and the

transitions measured were m/z 391.30 > m/z 373.41 for UDCA, m/z 395.42 > m/z 377.15 UDCA D_4 , m/z 448.46 > m/z 73.70 for GUDCA, m/z 451.92 > m/z 73.70 for GUDCA D_4 , m/z 498.00 > m/z 79.63 for TUDCA, and m/z 502.44 > m/z 79.54 for TUDCA D_4 , as shown in Figures 2–7. The quantification of analytes in human plasma was based on the peak area ratio of the analytes by the IS. The determination of the concentration of analytes in human plasma was determined from calibration curves that were

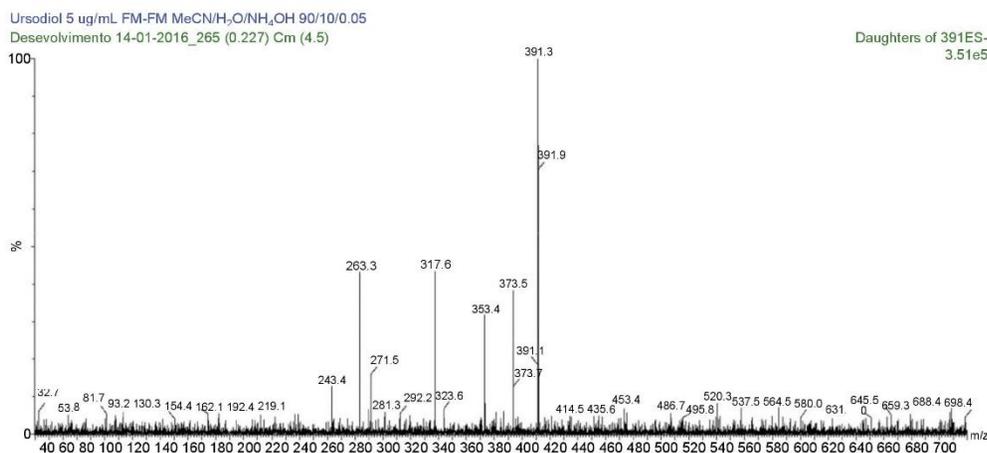


Figure 2 MS/MS spectrum of ursodeoxycholic acid: precursor ion m/z 391.3 da product ion, used to form the monitoring channel, m/z 373.5 da.
Abbreviation: MS/MS, tandem mass spectrometry.

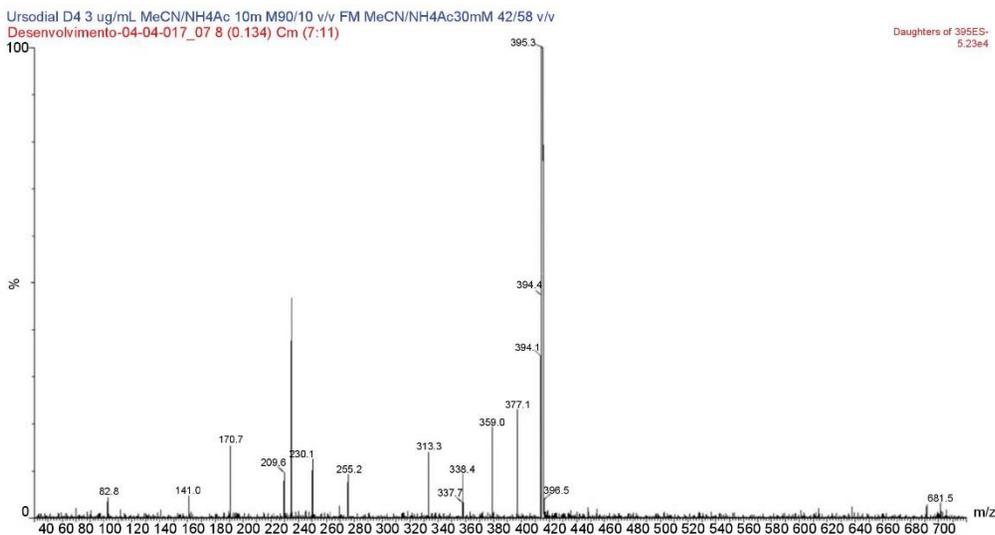


Figure 3 MS/MS spectrum of ursodeoxycholic acid D_4 : precursor ion m/z 395.3 da product ion, used to form the monitoring channel, m/z 377.1 da.
Abbreviation: MS/MS, tandem mass spectrometry.

analyzed by linear regression using the least squares method (linear correlation coefficient $1/x^2$).

Results and discussion

Method development

The chromatographic conditions were defined from several internal tests, seeking to obtain a higher peak response, with good resolution, symmetry, and the shortest running time, using the available materials.

The mobile phase for quantification of UDCA was defined after several tests, first acetonitrile/water/ammonium hydroxide (90:10:0.05–20:80:0.05 v/v/v) and acetonitrile/water (60:40 v/v), where the existence of a peak at the same retention time of analyte was observed after testing with blank plasma, which persisted even in the absence of organic modifiers. An increase in water (80 mL) resulted in a slight separation of these peaks when compared to blank samples and spiked samples. These results showed that the peak observed

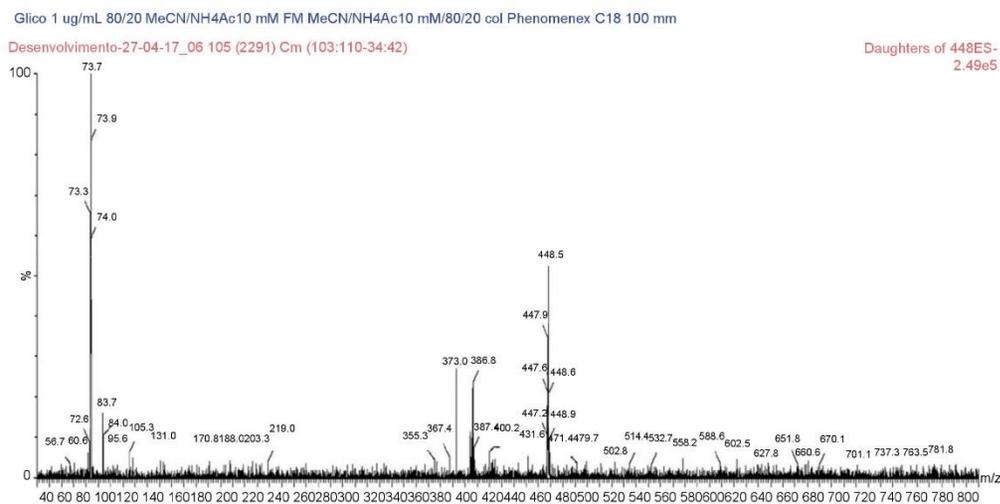


Figure 4 MS/MS spectrum of glycosodeoxycholic acid: precursor ion m/z 448.5 da product ion, used to form the monitoring channel, m/z 73.7 da. **Abbreviation:** MS/MS, tandem mass spectrometry.

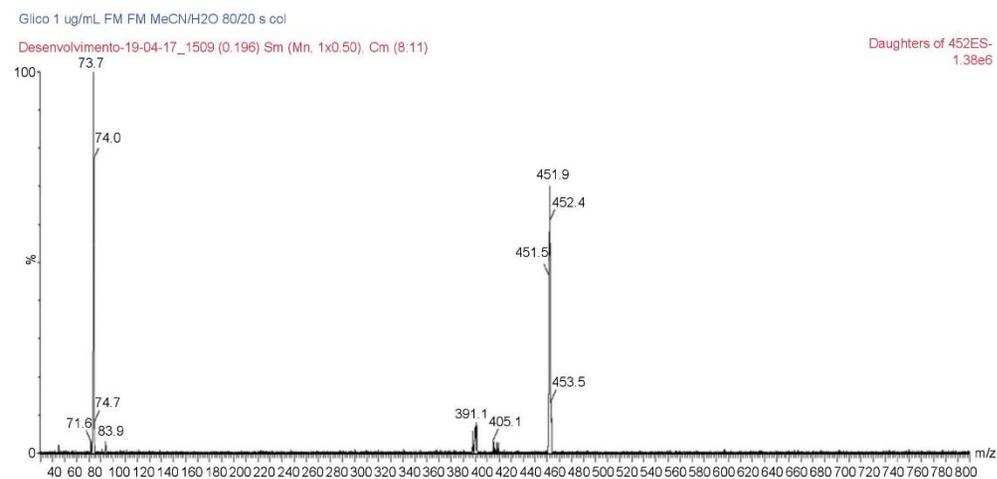


Figure 5 MS/MS spectrum of glycosodeoxycholic acid d_4 : precursor ion m/z 451.9 da product ion, used to form the monitoring channel, m/z 73.7 da. **Abbreviation:** MS/MS, tandem mass spectrometry.

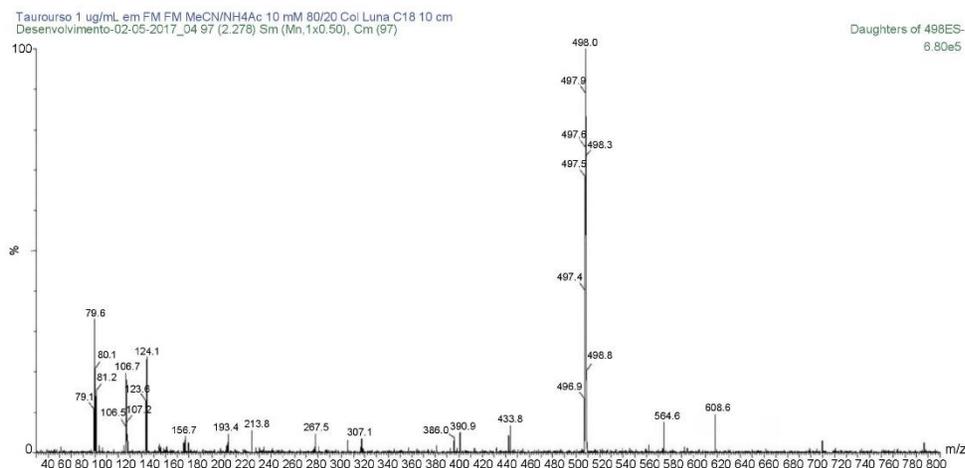


Figure 6 MS/MS spectrum of taurouroso: precursor ion m/z 498.0 da product ion, used to form the monitoring channel, m/z 79.6 da.
Abbreviation: MS/MS, tandem mass spectrometry.

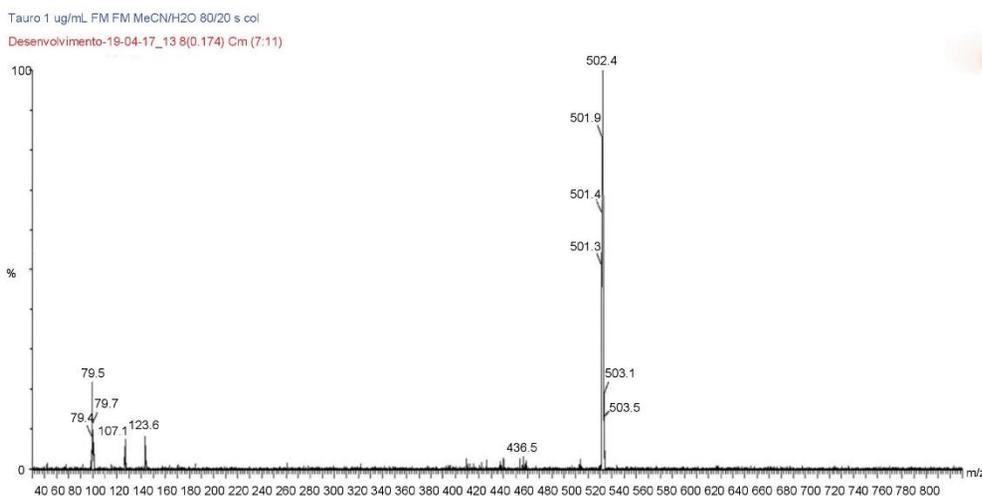


Figure 7 MS/MS spectrum of tauroursodeoxycholic acid d_2 : precursor ion m/z 502.4 da product ion, used to form the monitoring channel, m/z 79.5 da.
Abbreviation: MS/MS, tandem mass spectrometry.

in plasma samples corresponded to an intense cluting with the active. Accordingly, mobile phase tests were performed in several volumes of acetonitrile/water, acetonitrile/ammonium acetate 10 mM/ammonium hydroxide, acetonitrile/water/ammonium hydroxide; acetonitrile/ammonium acetate 10 mM; acetonitrile/ammonium acetate 20 mM; and acetonitrile/ammonium acetate 30 mM. The last solution presented an excellent separation and chromatographic resolution in the proportion of 42:58 (v/v), and so this was the mobile phase chosen for the method. In these tests, the addition of

ammonium acetate to the mobile phase favored a decrease in retention time of the peaks, while also minimizing the chromatographic variation and separation between analytes and interferents. The ammonium hydroxide was added as an organic modifier with basic characteristics, but in spite of promoting a significant increase of the electronic signal, it caused a smaller separation and chromatographic resolution. The water increase leads to an electronic signal decrease, making it difficult to quantify the lower limit of quantification (LLOQ), and so it was withdrawn from the final solution.

The mobile phase initially used to quantify the metabolites was acetonitrile/water/ammonium hydroxide (80:20:0.05 v/v/v), which resulted in an electronic signal gain for the two substances. However, these tests revealed peak spreading at the area of interest, so new mobile phases were tested as follows: without ammonium hydroxide, with ammonium acetate in its place, and with the presence of both those modifiers. The mobile phase with 10 mM ammonium acetate only presented the best result for precipitation tests, and so the mobile phase acetonitrile/ammonium acetate 10 mM (57:43 v/v) was used for TUDCA. However, after accuracy tests for GUDCA, interference peaks were observed, and so the mobile phase was changed to acetonitrile/ammonium acetate 10 mM (60:40 v/v), which leads to the separation of those peaks, but it was insufficient. Other proportions were tested: 80:20–50:50–40:60 v/v and the 40:60 v/v that presented the best results. Furthermore, organic modifiers were added to that mobile phase (ammonium hydroxide) in the hopes of improving the signal and chromatographic separation. The new mobile phase demonstrated effectiveness with a proportion of acetonitrile/ammonium acetate 10 mM/ammonium

hydroxide (40:60:0.5 v/v/v).

The following columns were also tested for UDCA determination: Synergi Fusion 25 cm, Luna Phenyl Hexyl 25 cm, Acc PFP C18 15 cm, and Luna 5 μ C18 100A 25 cm, the last one being the most efficient in separation of the ~~interfer~~ that eluted after the peak of interest. To stabilize possible variations in the column temperature that could affect its stability, an column oven was coupled keeping it at a temperature of 30°C and the dwell time parameter (speed scan) was increased to minimize the number of scans per seconds, thereby decreasing variations in retention time. For TUDCA and GUDCA, Luna 5 μ m C18 100 \times 4.6 mm, Phenomenex C18 100 \times 4.6 mm, Phenomenex 15 cm C18, Phenyl-Hexyl 15 cm, and Luna Phenomenex 5 μ C18 100A 25 cm columns were tested. The last one presented the best results in the separation of interfering peaks that had been found for GUDCA, also in obtaining a satisfactory result for TUDCA.

The UDCA resuspension solution was obtained from several tests to improve the electronic signal. Several proportions of acetonitrile/water/formic acid; acetonitrile/water; acetonitrile/water/ammonium hydroxide; acetonitrile/ammonium acetate 10 mM; and acetonitrile/water/ammonium hydroxide were tested. Although the last option presented a good electronic signal (90:10:0.05 v/v/v), the exclusion of base from the resuspension solution was important for the stabilization of retention time; thus, the solution chosen was acetonitrile/ammonium acetate 10 mM (90/10 v/v). The use of 1M HCl

in extractions of GUDCA showed better recovery results. In addition, several tests were performed for resuspension solution of this metabolite: acetonitrile/ammonium acetate 10 mM/ammonium hydroxide in 40:60:0.5, 80:20:0.1, and 70:30:0.1 v/v/v proportions, and the last option was chosen since it assisted in the elimination of peak spreading problems.

During extraction tests, the liquid–liquid technique was used because it is the most suitable method for predominantly nonpolar compounds, such as UDCA and GUDCA, especially because in its extraction process was made use of solvents and reagents with this characteristic. For TUDCA, the deproteinization technique was used due to its polar nature. The solid phase method, albeit cleaner and more effective, was not chosen due to its high cost, which made it infeasible for the purpose of this study.

For UDCA analysis, a flow of 0.450 mL/min was defined based on the gradient tests, which led to a considerable reduction in the time for each analysis. The channels defined were MRM m/z 391.30 > m/z 373.5 for UDCA and MRM channel m/z 395.3 > m/z 377.1 for UDCA₄ operating on D

ESI in a negative ionization mode (ESI⁻). The m/z 391.20 > m/z 355.04 channel was also tested for the analyte, but showed chromatographic interferences and poor solubility. For metabolites, signals of their respective masses were only observed in a negative ionization mode (ESI⁻), using a flow of 0.700 mL/min for GUDCA and 0.200 mL/min for TUDCA, and a gradient was also necessary. The channels were defined as specified earlier.

Thus, a test of accuracy and precision was carried out to confirm the efficiency and effectiveness of the method. With the chosen technique, a triplicate curve was obtained, nine QCs of each concentration and nine LLOQs (lower limit of quantification) for each compound separately (UDCA, GUDCA, and TUDCA). The test was injected and reinjected. There was no change in the analytes' retention times.

Validation of the analytical methodology Selectivity

Selectivity is the ability of a method to differentiate and quantify the analyte and IS in the presence of other components of the sample. In this test, it is necessary to compare the biological matrix, obtained from different sources, to investigate interferences that may affect the selectivity of method. Thus, lipemic samples (with high lipid content) and hemolysate (containing lysed erythrocytes) must also be tested.^{15–17} To confirm the selectivity of the method, blank samples of

The mobile phase initially used to quantify the metabolites was acetonitrile/water/ammonium hydroxide (80:20:0.05 v/v/v), which resulted in an electronic signal gain for the two substances. However, these tests revealed peak spreading at the area of interest, so new mobile phases were tested as follows: without ammonium hydroxide, with ammonium acetate in its place, and with the presence of both those modifiers. The mobile phase with 10 mM ammonium acetate only presented the best result for precipitation tests, and so the mobile phase acetonitrile/ammonium acetate 10 mM (57:43 v/v) was used for TUDCA. However, after accuracy tests for GUDCA, interference peaks were observed, and so the mobile phase was changed to acetonitrile/ammonium acetate 10 mM (60:40 v/v), which leads to the separation of those peaks, but it was insufficient. Other proportions were tested: 80:20–50:50–40:60 v/v and the 40:60 v/v that presented the best results. Furthermore, organic modifiers were added to that mobile phase (ammonium hydroxide) in the hopes of improving the signal and chromatographic separation. The new mobile phase demonstrated effectiveness with a proportion of acetonitrile/ammonium acetate 10 mM/ammonium hydroxide (40:60:0.5 v/v/v).

The following columns were also tested for UDCA determination: Synergi Fusion 25 cm, Luna Phenyl Hexyl 25 cm, Acc PFP C18 15 cm, and Luna 5 μ C18 100A 25 cm, the last one being the most efficient in separation of the ~~interfer~~ that eluted after the peak of interest. To stabilize possible variations in the column temperature that could affect its stability, an column oven was coupled keeping it at a temperature of 30°C and the dwell time parameter (speed scan) was increased to minimize the number of scans per seconds, thereby decreasing variations in retention time. For TUDCA and GUDCA, Luna 5 μ C18 100 \times 4.6 mm, Phenomenex C18 100 \times 4.6 mm, Phenomenex 15 cm C18, Phenyl-Hexyl 15 cm, and Luna Phenomenex 5 μ C18 100A 25 cm columns were tested. The last one presented the best results in the separation of interfering peaks that had been found for GUDCA, also in obtaining a satisfactory result for TUDCA.

The UDCA resuspension solution was obtained from several tests to improve the electronic signal. Several proportions of acetonitrile/water/formic acid; acetonitrile/water; acetonitrile/water/ammonium hydroxide; acetonitrile/ammonium acetate 10 mM; and acetonitrile/water/ammonium hydroxide were tested. Although the last option presented a good electronic signal (90:10:0.05 v/v/v), the exclusion of base from the resuspension solution was important for the stabilization of retention time; thus, the solution chosen was acetonitrile/ammonium acetate 10 mM (90/10 v/v). The use of 1M HCl

in extractions of GUDCA showed better recovery results. In addition, several tests were performed for resuspension solution of this metabolite: acetonitrile/ammonium acetate 10 mM/ammonium hydroxide in 40:60:0.5, 80:20:0.1, and 70:30:0.1 v/v/v proportions, and the last option was chosen since it assisted in the elimination of peak spreading problems.

During extraction tests, the liquid–liquid technique was used because it is the most suitable method for predominantly nonpolar compounds, such as UDCA and GUDCA, especially because in its extraction process was made use of solvents and reagents with this characteristic. For TUDCA, the deproteinization technique was used due to its polar nature. The solid phase method, albeit cleaner and more effective, was not chosen due to its high cost, which made it infeasible for the purpose of this study.

For UDCA analysis, a flow of 0.450 mL/min was defined based on the gradient tests, which led to a considerable reduction in the time for each analysis. The channels defined were MRM m/z 391.30 > m/z 373.5 for UDCA and MRM channel m/z 395.3 > m/z 377.1 for UDCA₄ operating on D

ESI in a negative ionization mode (ESI⁻). The m/z 391.20 > m/z 355.04 channel was also tested for the analyte, but showed chromatographic interferences and poor solubility. For metabolites, signals of their respective masses were only observed in a negative ionization mode (ESI⁻), using a flow of 0.700 mL/min for GUDCA and 0.200 mL/min for TUDCA, and a gradient was also necessary. The channels were defined as specified earlier.

Thus, a test of accuracy and precision was carried out to confirm the efficiency and effectiveness of the method. With the chosen technique, a triplicate curve was obtained, nine QCs of each concentration and nine LLOQs (lower limit of quantification) for each compound separately (UDCA, GUDCA, and TUDCA). The test was injected and reinjected. There was no change in the analytes' retention times.

Validation of the analytical methodology Selectivity

Selectivity is the ability of a method to differentiate and quantify the analyte and IS in the presence of other components of the sample. In this test, it is necessary to compare the biological matrix, obtained from different sources, to investigate interferences that may affect the selectivity of method. Thus, lipemic samples (with high lipid content) and hemolysate (containing lysed erythrocytes) must also be tested.^{15–17} To confirm the selectivity of the method, blank samples of

human plasma obtained from six different individuals were analyzed, with four normal samples, one lipemic sample, and one hemolysed sample for each analyte.

The samples were tested using the extraction procedure and the chromatographic conditions developed to evaluate possible interferences in retention time of the drug and IS.

The results were compared with those obtained with processed samples of LLOQ from each analyte (Figures 8–10).

The interfering peak responses near the retention time of the analyte should be less than 20% of the analyte response in the LLOQ samples and less than 5% of the IS response. As a result, there were no significant interfering responses at the retention times of analytes and IS, demonstrating the selectivity of the method in a biological matrix composed of human plasma.

Residual effect (carryover)

The residual effect, or carryover, is the effect generated by the appearance of or increase in the analyte or IS signal from contamination of previous samples. For that to be tested, it is necessary to consecutively inject a blank sample, a sample containing the analyte in the upper limit of quantification (ULOQ) concentration with IS, and then two blank samples.¹⁴

To evaluate whether there was any carryover effect, three injections of the same white sample were analyzed, with one made before and two soon after injection of the ULOQ sample.

Results were compared with those obtained in the LLOQ processed sample for each analyte.

The interfering peak responses near the retention time of the analyte should be less than 20% of the analyte response in the LLOQ samples and less than 5% of the IS response.

Name: -Seletividade_09: Ac. Ursodesoxicólico 15 ng/mL+PI, Date: 29-May-2017, Time: 17:37:06

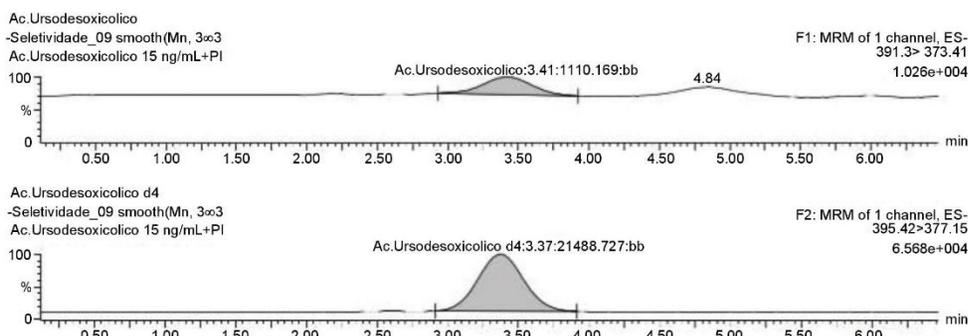


Figure 8 Normal blank plasma P15 76/2017 related to analyte and internal standard.

Name: -Seletividade_09: Ac. Glicoursodesoxicólico 15 ng/mL+PI, Date: 26-May-2017, Time: 16:16:35

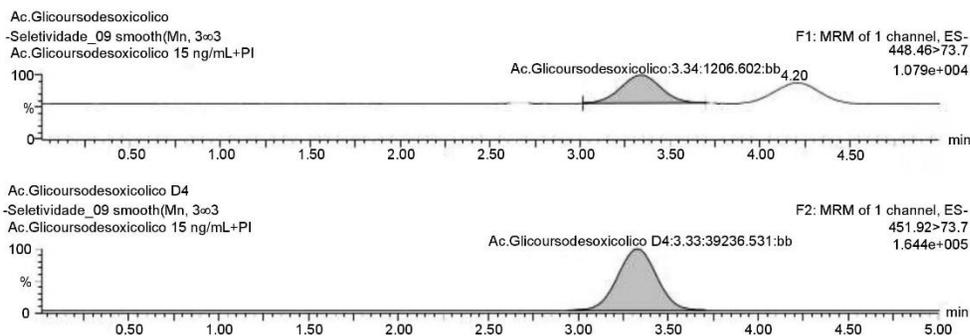


Figure 9 Normal blank plasma P15 65/2017 related to analyte and internal standard.

As a result, there were no interfering responses at the retention time of the analytes and IS, ie, no residual effect was observed in the methods developed.

Matrix effect

Substances coeluted with the analyte, but undetected, may reduce or increase the signal intensity corresponding to the mass transition of that analyte, affecting precision, accuracy, robustness, selectivity, and sensitivity of the method. This is a phenomenon called matrix effect, and its determination in the development and validation stages is fundamental to ensure the reliability and selectivity of the method.¹⁸⁻²¹ Therefore, to evaluate whether there was a matrix effect, samples from eight different sources were analyzed (four normal, two lipemic, and two hemolysates), and analyte and IS were spiked at the same concentrations of lower and higher QC. The results were evaluated from the normalized matrix factor (NMF)

calculation for the three analytes, respectively. The result showed that there was no significant interference of the plasma matrix.

Lower limit of quantification, linearity, precision, and accuracy

The established LLOQ was 15 ng/mL for UDCA and GUDCA and 5 ng/mL for TUDCA. A linear response for the peak area ratio (response) vs concentration in a range of 15–10,000 ng/mL for UDCA/GUDCA and 5–500 ng/mL for TUDCA (Tables 1–3, respectively), with a mean linear correlation coefficient of 0.9985 (n=8) or better must be evaluated. Intralot accuracy and precision were determined by the analysis of nine replicates of LLOQ, lower QC, medium QC, higher QC, and a diluted QC in five levels of concentration extracted on the same day, while the inter-lot evaluation was determined by the analysis of three calibration curves with each one of those nine controls with at least two being

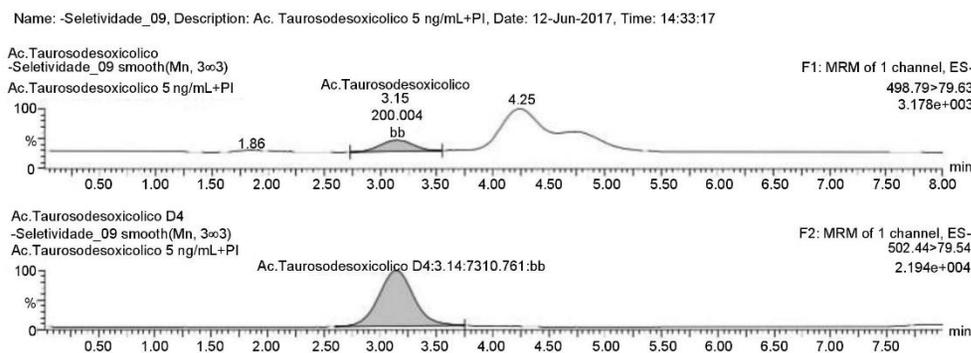


Figure 10 Normal blank plasma PIS 388/2016 related to analyte and internal standard.

Table 1 Ursodeoxycholic acid calibration curve data

Nominal concentration (ng/mL)	Lot 1		Lot 2		Lot 3	
	Experimental concentration (ng/mL)	Deviation (%)	Experimental concentration (ng/mL)	Deviation (%)	Experimental concentration (ng/mL)	Deviation (%)
15	14,446	-3.69	14,635	-2.44	15,282	1.88
50	55,624	11.25	54,570	9.14	37,511	-24.98*
100	102,702	2.70	97,945	-2.05	86,926	-13.07
1,000	957,397	-4.26	1,018,494	1.85	1,009,823	0.98
2,000	1,967,726	-1.61	1,966,279	-1.69	2,139,443	6.97
4,000	3,991,371	-0.22	3,893,776	-2.66	4,109,517	2.74
6,000	5,791,528	-3.7	5,968,888	-0.52	6,120,767	2.01
10,000	9,930,706	-0.69	9,836,070	-1.64	9,848,776	-1.1
Equation	y=0.00139156 x+0.0191452		y=0.00134053 x+0.0230972		y=0.00130278 x+0.0385574	

Note: *deviations above the allowed limit of 15%, this value was not included in the calculation of the curve equation.

Table 2 glyoursodeoxycholic acid calibration curve data

Nominal concentration (ng/mL)	Lot 1		Lot 2		Lot 3	
	Experimental concentration (ng/mL)	Deviation (%)	Experimental concentration (ng/mL)	Deviation (%)	Experimental concentration (ng/mL)	Deviation (%)
15	14,906	-0.63	14,932	-0.45	15,131	0.87
50	50,538	1.08	50,543	1.09	48,650	-2.70
100	102,042	2.04	100,792	0.79	99,197	-0.80
1,000	991,528	-0.85	1,010,979	1.10	1,036,006	3.60
2,000	2,037,794	1.89	1,988,106	-0.59	2,017,091	0.85
4,000	4,036,213	0.91	3,938,251	-1.54	4,044,814	1.12
6,000	5,974,005	-0.43	6,082,838	1.38	5,968,408	-0.53
10,000	9,599,408	-4.01	9,823,318	-1.77	9,758,223	-2.42
Equation	y=0.0019909 x+0.00610845		y=0.00199617 x+0.00795389		y=0.00196984 x+0.00750074	

Table 3 tauroursodeoxycholic acid calibration curve data

Nominal concentration (ng/mL)	Lot 1		Lot 2		Lot 3	
	Experimental concentration (ng/mL)	Deviation (%)	Experimental concentration (ng/mL)	Deviation (%)	Experimental concentration (ng/mL)	Deviation (%)
5	4,932	-1.37	4,871	-2.58	5,162	3.24
10	9,956	-0.44	10,692	6.92	9,750	-2.50
20	21,486	7.43	19,238	-3.81	18,245	-8.77
50	52,590	5.18	53,262	6.52	51,009	2.02
100	85,046	-14.95	88,543	-11.46	81,921	-18.08*
200	184,987	-7.51	186,820	-6.59	184,426	-7.79
300	313,981	4.66	321,609	7.20	324,854	8.28
500	534,977	7.00	518,950	3.79	527,573	5.51
Equation	y=0,00403375 x+0,0125843		y=0,00412367 x+0,0123351		y=0,00427581 x+0,010892	

Note: *deviations above the allowed limit of 15%, this value was not included in the calculation of the curve equation.

Table 4 Intraassay and interassay analyses of UdCA

Intraassay precision and accuracy															
Replicates (n=9)	LQC			MQC			HQC								
	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 1	Lot 2	Lot 3						
Mean	43,134	47,043	44,674	4,969,571	4,988,898	5,025,576	7,841,509	8,020,286	8,046,401						
Sd	4,355	3,291	6,381	99,720	95,988	96,083	101,452	125,976	136,082						
CV (%)	10,097	6,995	14,283	2,007	1,924	1,912	1,294	1,571	1,691						
RSe (%)	-4,147	4,539	-0,723	-0,609	-0,222	0,512	-1,981	0,254	0,580						
Replicates (n=9)	DQC (lot 1)			DQC (lot 2)			DQC (lot 3)								
Mean	4,350,024			4,300,213			4,339,477								
Sd	95,800			80,391			90,442								
CV (%)	2,202			1,869			2,084								
RSe (%)	2,354			1,181			2,105								
Replicates (n=9)	LLOQ (lot 1)			LLOQ (lot 2)			LLOQ (lot 3)								
Mean	14,550			17,823			14,773								
Sd	1,737			3,514			2,199								
CV (%)	11,938			19,714			14,886								
RSe (%)	-3,002			18,823			-1,513								
Interassay precision and accuracy															
Replicates (n=27)	LQC			MQC			HQC			DQC			LLOQ		
Mean	44,950			4,994,682			7,969,399			4,329,905			15,715		
Sd	4,938			96,413			149,527			88,353			2,921		
CV (%)	10,984			1,930			1,876			2,041			18,586		
RSe (%)	-0,110			-0,106			-0,383			1,880			4,769		

Note: Nominal concentration: LQC=45 ng/mL, MQC=5,000 ng/mL, HQC=8,000 ng/mL, dQC=4,250 ng/mL (1:3), LLOQ=15 ng/mL.

Abbreviations: CV, coefficient of variation; LLOQ, lower limit of quantification; RSE, relative standard error; UDCA, ursodeoxycholic acid; LQC, lower quality control; MQC, medium quality control; HQC, high quality control; DQC, dilution quality control; LLOQ, lower limit of quantification.

Table 5 Intraassay and interassay analyses of gUdCA

Intraassay precision and accuracy											
Replicates (n=9)	LQC			MQC			HQC				
	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 1	Lot 2	Lot 3		
Mean	49,594	48,943	45,502	5,008,555	5,136,619	4,991,153	7,990,112	7,935,940	7,928,215		
Sd	1,798	2,380	1,653	125,575	51,237	103,896	113,847	148,415	82,064		
CV (%)	3,625	4,863	3,633	2,507	0,997	2,082	1,425	1,870	1,035		
RSe (%)	10,209	8,761	1,117	0,171	2,732	-0,177	-0,124	-0,801	-0,897		
Replicates (n=9)	DQC (Lot 1)			DQC (lot 2)			DQC (lot 3)				
Mean	4,474,390			4,356,945			4,398,951				
Sd	73,523			37,072			108,721				
CV (%)	1,643			0,851			2,472				
RSe (%)	5,280			2,516			3,505				
Replicates (n=9)	LLOQ (lot 1)			LLOQ (lot 2)			LLOQ (lot 3)				
Mean	14,206			15,777			16,376				
Sd	0,951			1,570			0,738				
CV (%)	6,691			9,949			4,508				
RSe (%)	-5,292			5,181			9,176				
Interassay precision and accuracy											
Replicates (n=27)	LQC			MQC			HQC			DQC	LLOQ
Mean	48,013			5,045,442			7,951,422			4,410,095	15,453
Sd	2,631			115,542			116,727			90,415	1,440
CV (%)	5,481			2,290			1,468			2,050	9,318
RSe (%)	6,696			0,909			-0,607			3,767	3,022

Note: Nominal concentration: LQC=15 ng/mL, MQC=250 ng/mL, hQC=400 ng/mL, dQC=212.5 ng/mL (1:3), LLOQ=5 ng/mL.

Abbreviations: CV, coefficient of variation; GUDCA, glycooursodeoxycholic acid; LLOQ, lower limit of quantification; RSE, relative standard error; LQC, lower quality control; MQC, medium quality control; hQC, high quality control; dQC, dilution quality control.

Table 6 Intraassay and interassay analyses of tUdCA

Intraassay precision and accuracy											
Replicates (n=9)	LQC			MQC			HQC				
	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 1	Lot 2	Lot 3		
Mean	14,843	14,920	14,925	241,927	257,640	241,975	384,426	411,694	391,201		
dP	0,695	0,734	0,538	3,721	9,500	5,816	6,155	6,933	7,451		
CV (%)	4,681	4,919	3,603	1,538	3,687	2,403	1,601	1,684	1,905		
ePR (%)	-1,049	-0,531	-0,498	-3,229	3,056	-3,210	-3,893	2,923	-2,200		
Replicates (n=9)	DQC (lot 1)			DQC (lot 2)			DQC (lot 3)				
Mean	206,005			221,047			214,779				
dP	3,849			3,167			8,932				
CV (%)	1,868			1,433			4,159				
ePR (%)	-3,056			4,022			1,072				
Replicates (n=9)	LLOQ (lot 1)			LLOQ (lot 2)			LLOQ (lot 3)				
Mean	5,032			4,971			4,993				
dP	0,587			0,634			0,622				
CV (%)	11,659			12,745			12,450				
ePR (%)	0,640			-0,587			-0,144				
Interassay precision and accuracy											
Replicates (n=27)	LQC			MQC			HQC			DQC	LLOQ
Mean	14,896			247,181			395,774			213,944	4,998
dP	0,636			9,962			13,530			8,468	0,591
CV (%)	4,271			4,030			3,419			3,958	11,818
ePR (%)	-0,693			-1,128			-1,057			0,679	-0,030

Note: Nominal concentration: LQC=45 ng/mL, MQC=5,000 ng/mL, hQC=8,000 ng/mL, dQC=4,250 ng/mL (1:3), LLOQ=15 ng/mL.

Abbreviations: CV, coefficient of variation; LLOQ, lower limit of quantification; RSE, relative standard error; TUDCA, tauroursodeoxycholic acid; LQC, lower quality control; MQC, medium quality control; hQC, high quality control; dQC, dilution quality control.

on different days. The details of the results obtained in those tests are presented in Tables 4–6.

The samples considered as reinjected were those that were quantified more than once. The validation of reinjection aims to evaluate the validity of this procedure, when necessary.

The validation of the reinjection for each analyte was demonstrated through the results obtained during the precision and accuracy test, where the mean values for each QC (lower quality control [LQC], medium quality control [MQC], and high quality control [HQC]) of the reinjection were evaluated in relation to the means obtained for the samples of the first injection. No deviation above 15% was observed among them.

Stability

The stability of the UDCA, GUDCA, and TUDCA plasma samples was determined in the conditions of use and storage: top-bench, autosampler, freeze–thaw, and long term. The solutions used were also evaluated in the top-bench conditions (room temperature) and in refrigerator conditions. Initially, a calibration curve and samples at lower QC and higher QC concentrations were spiked, extracted, quantified, freshly prepared, and evaluated according to the acceptance criteria of 15% in comparison to the nominal value of each concentration (this criterion was applied to other stabilities, except for solution). After acceptance, the samples are suitable for determining other stabilities. Thus, a fraction of those spiked plasma QCs used in the initial assay was kept on the bench at controlled room temperature (18°C–24°C) for a period of 20 hours and 50 minutes for UDCA, 20 hours and 15 minutes for GUDCA, and 23 hours and 20 minutes for TUDCA. All of them remained stable during the period according to the previously established criterion. The processed samples were kept at autosampler (approximately 22°C), and each QC sample was analyzed in six replicates initially (at zero time) and after 24 hours for the three analytes. The results showed that they remained stable during that period. The spiked samples were also used for the freezing and thawing process in three cycles for each analyte at –20°C. After comparing the results, it was observed that they remained stable after the process.

The long-term stability of the stored (–20°C) spiked human plasma samples was evaluated for each analyte after 133 days (UDCA), 154 days (GUDCA), and 119 days (TUDCA). Comparing the variations between the lower QC and higher QC means from the stored samples in relation to the nominal value, the analyzed compounds remained stable during that period, since the deviations found were in alignment with the established criteria.

Stability analyses were carried out with a primary solution of higher concentration and a work solution of lower concen-

tration for each analyte and its respective IS. The results were evaluated comparing the individual areas of analyte and the individual areas of IS. Comparing the mean values of analyte and IS responses for the solutions analyzed after 25:40 hours (UDCA/UDCA D₁), 24:40 hours (GUDCA/GUDCA D₁), and 22:00 hours (TUDCA/TUDCA D₁) maintained at room temperature and samples analyzed after 29, 18, and 26 days kept under refrigeration, for each analyte and its IS, respectively, with the means obtained from freshly prepared solutions, it can be concluded that the solutions were stable, since the deviations found were less than 10%.

Conclusion

After all those tests, it was concluded that the analytical method was successfully developed and validated, since it did not present matrix effect and residual effect, proving to be selective for the molecules under study, with adequate accuracy and precision. Accordingly, the method was sensitive, having a coefficient of variation less than 20% for the LLOQ of each compound. In this way, the method can be applied in bioequivalence studies to determine ursodiol and its metabolites in a reproducible, simple, and effective way.

Author contributions

MCP, DCB, ACdO, CML, and SACC made equal contributions to the design and implementation of the research, to the analysis of the results, and to the writing of this manuscript. All authors contributed to data analysis, drafting and revising the article, gave final approval of the version to be published, and agree to be accountable for all aspects of the work.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

1. The ALSUntangled Group. ALSUntangled no. 25: ursodiol. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2014;15(5–6):475–478.
2. Tonin F, Arends I. Latest development in the synthesis of ursodeoxycholic acid (UDCA): a critical review. *Beilstein J Org Chem*. 2018;14:470–483.
3. Tessier E, Neirinck L, Zhu Z. High-performance liquid chromatographic mass spectrometric method for the determination of ursodeoxycholic acid and its glycine and taurine conjugates in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2003;798(2):295–302.
4. Ursacol® [Package Insert]. Santana do Parnaíba, SP (Brazil): CHIESI Pharma Inc, Zambon Lab Pharma Inc; 2015.
5. URSO 250® and URSO Forte® [Package Insert]. Bridgewater, NJ: Aptalis Pharma US, Inc; 2013.
6. Ko WK, Kim SJ, Jo MJ, et al. Ursodeoxycholic acid inhibits inflammatory responses and promotes functional recovery after spinal cord injury in rats. *Mol Neurobiol*. Epub 2018 Mar 20.
7. Thakare R, Alamoudi JA, Gautam N, Rodrigues AD, Alnouti Y. Species differences in bile acids II. Bile acid metabolism. *J Appl Toxicol*. 2018;38(10):1336–1352.

8. Horkovics-Kovats S, Ulč I, Vít L, Němce B, Rada V. Physicochemical pharmacokinetics as an optimization tool for generic development: A case study. *Eur J Pharm.Sci.* 2018;111:349–357.
9. Abdel-Ghaffar A, Ghanem HM, Ahmed EK, Hassanin OA, Mohamed RG. Ursodeoxycholic acid suppresses the formation of fructose/streptozotocin-induced diabetic cataract in rats. *Fundam Clin Pharmacol.* 2018;32(6):627–640.
10. Mroz MS, Lajczak NK, Goggins BJ, Keely S, Keely SJ. The bile acids, deoxycholic acid and ursodeoxycholic acid, regulate colonic epithelial wound healing. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2018;314(3):G378–G387.
11. Shima KR, Ota T, Kato KI, et al. Ursodeoxycholic acid potentiates dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin by enhancing glucagon-like peptide-1 secretion in patients with type 2 diabetes and chronic liver disease: a pilot randomized controlled and add-on study. *BMJ Open Diabetes Res Care.* 2018;6(1):e000469.
12. Pataia V, Papaclavoulou G, Nikolova V, et al. Paternal cholestasis exacerbates obesity-associated hypertension in male offspring but is prevented by paternal ursodeoxycholic acid treatment. *Int J Obes.* Epub 2018 May 24.
13. Sundd Singh S, Shah II, Gupta S, et al. Validation of LC/MS electrospray ionisation method for the estimation of ursodiol in human plasma and its application in bioequivalence study. *Ann Chim.* 2004;94(12):951–959.
14. BRAZIL. National Health Surveillance Agency. Resolution RDC n. 27, dated May 17, 2012. Provides the minimum requirements for the validation of bioanalytical methods used in studies for registration and post-registration of drugs. Official Gazette of the Federative Republic of Brazil, Brasilia, May 2012.
15. BRAZIL. National Health Surveillance Agency. RE n. 899, dated May 29 2003. Guide for validation of Bioanalytical and Analytical Methods. Official Gazette of the Federative Republic of Brazil, Brasilia, June 2003.
16. BRASIL. National Health Surveillance Agency. *Manual of Good Practices for Bioequivalence and Bioavailability.* Brasilia; 2002.
17. FDA. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Centre for Drug Evaluation and Research (CDER). 2013.
18. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem.* 2003;75(13):3019–3030.
19. Kushnir MM, Rockwood AL, Nelson GJ, Yue B, Urry FM. Assessing analytical specificity in quantitative analysis using tandem mass spectrometry. *Clin Biochem.* 2005;38(4):319–327.
20. Chambers E, Wagrowski-Diehl DM, Lu Z, Mazzeo JR. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007;852(1–2):22–34.
21. Sennbro CJ, Knutsson M, van Amsterdam P, Timmerman P. Anticoagulant counter ion impact on bioanalytical LC-MS/MS assays: results from discussions and experiments within the European Bioanalysis Forum. *Bioanalysis.* 2011;3(21):2393–2399.

Clinical Pharmacology: Advances and Applications

Publish your work in this journal

Clinical Pharmacology: Advances and Applications is an international, peer-reviewed, open access journal publishing original research, reports, reviews and commentaries on all areas of drug experience in humans. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use.

Submit your manuscript here: <https://www.dovepress.com/clinical-pharmacology-advances-and-applications-journal>

Dovepress

Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.