UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Validação de métodos para análise de citrato de colina e
acetilmetionina em soluções injetáveis por cromatografia líquida
de alta eficiência e eletroforese capilar**

Grazielle Prado Alexandre

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof^a. Titular Maria Inês Rocha Miritello Santoro

São Paulo
2010

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Alexandre, Grazielle Prado
A381v Validação de métodos para análise de citrato de colina e
acetilmetionina em soluções injetáveis por cromatografia
líquida de alta eficiência e eletroforese capilar / Grazielle
Prado Alexandre. -- São Paulo, 2010.
88p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Santoro, Maria Inês Rocha Miritello

1. Medicamento : Controle de qualidade 2. Eletroforese
capilar : Química analítica 3. Cromatografia líquida de alta
eficiência : Química analítica I. T. II. Santoro, Maria Inês
Rocha Miritello , orientador.

615.19015 CDD

Grazielle Prado Alexandre

**Validação de métodos para análise de citrato de colina e
acetilmetionina em soluções injetáveis por cromatografia líquida
de alta eficiência e eletroforese capilar**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^a. Titular Maria Inês Rocha Miritello Santoro
orientador/ presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

" O que eu faço, é uma gota no meio de um oceano.

Mas sem ela, o oceano será menor."

Madre Teresa de Cálcuta

A Deus que me conduziu e tornou este sonho
realidade. Pela sua presença e força.

A meus pais, que sempre apoiaram
meus sonhos e deram toda a
base e força para enfrentar
os desafios da vida.

A minha querida irmã pelo apoio e
encorajamento em todos
os momentos.

Ao meu esposo que tanto me apoiou,
incentivou e colaborou em
todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À Professora Titular Maria Inês Rocha Miritello Santoro, sinceros agradecimentos pelos seus ensinamentos, pela oportunidade em ser sua aluna, seu carinho e constante incentivo durante todas as etapas.

À Professora Maria Segunda A. Prado, pelo convívio, suas contribuições e ensinamentos.

À Professora Érika R. M. Kedor-Hackmann, pelas sugestões no transcorrer do trabalho.

Aos colegas do Laboratório que contribuíram no desenvolvimento deste trabalho.

Meus eternos agradecimentos a Ana Maria e Gilberto Elisei pela oportunidade de realizar meu mestrado.

Aos amigos que tanto me apoiaram e incentivaram: Carmem Lúcia, Cristine, Micheline e Mara.

Aos amigos da Divisão de Farmácia do Hospital das Clínicas pelo apoio, incentivo e colaboração para finalização desta etapa.

À equipe do serviço de Farmácia do Hospital Universitário-USP pelo apoio e amizade.

A todos aqueles que de uma forma ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1 Citrato de colina.....	20
2.2 Acetilmetionina	20
2.3 Metodologia analítica.....	21
2.4 Metodologia analítica utilizada na pesquisa.....	23
2.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	23
2.4.2 Eletroforese capilar.....	24
3. OBJETIVOS.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 Materiais.....	28
4.1.1 Reagentes.....	28
4.1.2 Padrões analíticos.....	28
4.1.3 Amostras.....	28
4.1.4 Equipamentos.....	29
4.2 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	29
4.2.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	29
4.2.1.2 Metodologia.....	30
4.2.1.3 Preparação do tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 5,7.....	30
4.2.1.4 Condições cromatográficas.....	30
4.2.1.5 Validação do método analítico para determinação simultânea de citrato de colina e acetilmetionina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	31

4.2.1.5.1 Seletividade.....	31
4.2.1.5.2 Linearidade.....	31
4.2.1.5.2.2 Limite de detecção (LD).....	33
4.2.1.5.2.3 Limite de quantificação (LQ).....	33
4.2.1.5.4 Repetibilidade.....	33
4.2.1.5.5 Precisão intermediária.....	34
4.2.1.5.6 Exatidão.....	34
4.2.1.5.7 Teste de estresse.....	36
4.2.1.5.7.1 Estabilidade em meio ácido.....	36
4.2.1.5.7.2 Estabilidade em meio alcalino.....	37
4.2.1.5.7.3 Estabilidade em meio oxidante.....	37
4.2.1.5.7.4 Estabilidade em meio neutro.....	38
4.2.1.5.8 Robustez.....	39
4.2.2 ELETROFORESE CAPILAR.....	39
4.2.2.1 Determinação quantitativa de acetilmetionina.....	39
4.2.2.2 Metodologia.....	39
4.2.2.3 Preparação do tampão de tetraborato de sódio 20mM, pH 9.2.....	39
4.2.2.4 Condições analíticas.....	40
4.2.2.5 Validação do método analítico para determinação de acetilmetionina por eletroforese capilar.....	40
4.2.2.5.1. Seletividade.....	40
4.2.2.5.2 Linearidade.....	41
4.2.2.5.2 Limite de detecção (LD).....	42
4.2.2.5.3 Limite de quantificação (LQ).....	42
4.2.2.5.4 Repetibilidade.....	43
4.2.2.5.5 Precisão intermediária.....	43
4.2.2.5.6 Exatidão.....	44
4.2.1.5.7 Teste de estresse.....	45
4.2.2.5.7.1 Estabilidade em meio ácido.....	46
4.2.2.5.7.2 Estabilidade em meio alcalino.....	46
4.2.2.5.7.3 Estabilidade em meio oxidante.....	47

4.2.2.5.7.4 Estabilidade em meio neutro.....	48
4.2.1.5.8 Robustez.....	48
5. RESULTADOS.....	49
5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	49
5.1.1 Seletividade.....	51
5.1.2 Linearidade.....	52
5.1.3 Teste de adequabilidade do sistema.....	53
5.1.4 Precisão.....	54
5.1.5 Exatidão.....	54
5.1.6 Teste de estresse.....	55
5.1.6.1 Meio ácido.....	56
5.1.6.2 Meio alcalino.....	57
5.1.6.3 Meio oxidante.....	57
5.1.6.4 Meio neutro.....	58
5.1.7 Robustez.....	58
5.2 Eletroforese capilar.....	59
5.2.1 Seletividade.....	61
5.2.2 Linearidade.....	61
5.2.3 Teste de adequabilidade do sistema.....	62
5.2.4 Precisão.....	63
5.2.5 Exatidão.....	63
5.2.6 Teste de estresse.....	64
5.2.6.1 Meio ácido.....	65
5.2.6.2 Meio alcalino.....	66
5.2.6.3 Meio oxidante.....	67
5.2.6.4 Meio neutro.....	68
5.2.7 Robustez.....	69
5.2.8 Comparação dos resultados obtidos pelas técnicas de CLAE e EC para determinação quantitativa de acetilmetionina.....	69

6. DISCUSSÃO.....	71
6.1 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	71
6.2 Eletroforese capilar.....	74
6.3 CLAE e EC para determinação quantitativa de acetilmetionina.....	77
7. CONCLUSÃO.....	78
8. REFERÊNCIAS.....	79
ANEXOS.....	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do citrato de colina.

Figura 2. Estrutura química da acetilmetionina.

Figure 3. Cromatogramas das soluções do padrão (a), da amostra (b) e do placebo (c). Concentração: 1,307 mg/mL de citrato de colina e 1,000 mg/mL de acetilmetionina. Condições: coluna C18, 250 x 4.6 mm, 5µm, Shim-Pack® VP-ODS, fase móvel: tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 5,7 ajustado com ácido fosfórico 10%: acetonitrila: metanol (88:10:2 v/v/v), vazão: 1,1 mL/min, detecção UV 210 nm, volume de injeção: 20 µL e temperatura do forno 25°C.

Figura 4. Curva analítica do citrato de colina obtida pelo método cromatográfico. Condições: coluna C18, 250 x 4.6 mm, 5µm, Shim-Pack® VP-ODS, fase móvel: tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 5,7 ajustado com ácido fosfórico 10%: acetonitrila: metanol (88:10: 2 v/v/v), vazão: 1,1 mL/min, detecção UV 210 nm, volume de injeção: 20 µL e temperatura do forno 25°C.

Figura 5. Curva analítica da acetilmetionina obtida pelo método cromatográfico. Condições: coluna C18, 250 x 4.6 mm, 5µm, Shim-Pack® VP-ODS, fase móvel: tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 5,7 ajustado com ácido fosfórico 10%: acetonitrila: metanol (88:10: 2 v/v/v), vazão: 1,1 mL/min, detecção UV 210 nm, volume de injeção: 20 µL e temperatura do forno 25°C.

Figura 6. Cromatograma da solução de citrato de colina 1,307 mg/mL e de acetilmetionina 1,000 mg/mL após exposição em meio ácido. Condições: coluna C18, 250 x 4.6 mm, 5µm, Shim-Pack® VP-ODS, fase móvel: tampão fosfato de sódio 25 mM pH 5,7 ajustado com ácido fosfórico 10%: acetonitrila: metanol (88: 10: 2 v/v/v), vazão: 1,1 mL/min, detecção UV 210 nm, volume de injeção: 20 µL e temperatura do forno 25°C.

Figura 7. Cromatograma da solução de citrato de colina 1,307 mg/mL e de acetilmetionina 1,000 mg/mL após exposição em meio alcalino. Condições: coluna C18, 250 x 4.6 mm, 5µm, Shim-Pack® VP-ODS, fase móvel: tampão fosfato de sódio 25 mM pH 5,7 ajustado com ácido fosfórico 10%: acetonitrila: metanol (88: 10: 2 v/v/v), vazão: 1,1 mL/min, detecção UV 210 nm, volume de injeção: 20 µL e temperatura do forno 25°C.

Figura 8. Cromatograma da solução de citrato de colina 1,307 mg/mL e de acetilmetionina 1,000 mg/mL após exposição em meio oxidante. Condições: coluna C18, 250 x 4.6 mm, 5µm, Shim-Pack® VP-ODS, fase móvel: tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 5,7 ajustado com ácido fosfórico 10%: acetonitrila: metanol (88: 10: 2 v/v/v), vazão: 1,1 mL/min, detecção UV 210 nm, volume de injeção: 20 µL e temperatura do forno 25°C.

Figura 9. Cromatograma da solução de citrato de colina 1,307 mg/mL e de acetilmetionina 1,000 mg/mL após exposição em meio neutro. Condições: coluna C18, 250 x 4.6 mm, 5µm, Shim-Pack® VP-ODS, fase móvel: tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 5,7 ajustado com ácido fosfórico 10%: acetonitrila: metanol (88: 10: 2 v/v/v), vazão: 1,1 mL/min, detecção UV 210 nm, volume de injeção: 20 µL e temperatura do forno 25°C.

Figura 10. Eletroferogramas das soluções de padrão (a), da amostra (b) e do placebo(c). Concentração: 0,100 mg/mL de acetilmetionina. Condições: capilar de sílica fundida de 40,2 cm sendo 30 cm efetivos, 75 µm de diâmetro interno, eletrólito: tampão tetraborato de sódio 20 mM pH 9,2, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi , 5 segundos, voltagem: + 25 kV, detecção UV 200 nm, temperatura 20°C.

Figura 11. Curva analítica da acetilmetionina obtida pelo método por EC. Condições: capilar de sílica fundida de 40,2 cm sendo 30 cm efetivos, 75 µm de diâmetro interno, eletrólito: tampão tetraborato de sódio 20 mM pH 9,2, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi , 5 segundos, voltagem: + 25 kV, detecção UV 200 nm, temperatura 20°C.

Figura 12. Eletroferograma da solução de acetilmetionina (0,100 mg/mL) após exposição em meio ácido. Condições: capilar de sílica fundida de 40,2 cm sendo 30 cm efetivos, 75 µm de diâmetro interno, eletrólito: tampão tetraborato de sódio 20 mM pH 9,2, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi , 5 segundos, voltagem: + 25 kV, detecção UV 200 nm, temperatura 20°C.

Figura 13. Eletroferograma da solução de acetilmetionina (0,100 mg/mL) após exposição em meio alcalino. Condições: capilar de sílica fundida de 40,2 cm sendo 30 cm efetivos, 75 µm de diâmetro interno, eletrólito: tampão tetraborato de sódio 20 mM pH 9,2, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi , 5 segundos, voltagem: + 25 kV, detecção UV 200 nm, temperatura 20°C.

Figura 14. Eletroferograma da solução de acetilmetionina (0,100 mg/mL) após exposição em meio oxidante. Condições: capilar de sílica fundida de 40,2 cm sendo 30 cm efetivos, 75 µm de diâmetro interno, eletrólito: tampão tetraborato de sódio 20 mM pH 9,2, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi , 5 segundos, voltagem: + 25 kV, detecção UV 200 nm, temperatura 20°C.

Figura 15. Eletroferograma da solução de acetilmetionina (0,100 mg/mL) após exposição em meio neutro. Condições: capilar de sílica fundida de 40,2 cm sendo 30 cm efetivos, 75 µm de diâmetro interno, eletrólito: tampão tetraborato de sódio 20 mM pH 9,2, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi , 5 segundos, voltagem: + 25 kV, detecção UV 200 nm, temperatura 20°C.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos analíticos para determinação de colina e de acetilmetionina.

Tabela 2. Preparação das amostras para a determinação da linearidade do citrato de colina e de acetilmetionina

Tabela 3. Preparação de amostras para determinação da exatidão do método por CLAE para determinação do citrato de colina e de acetilmetionina

Tabela 4. Condições empregadas nos testes de estresse (KLICK et al., 2005).

Tabela 5. Preparação das amostras para determinação da linearidade do método por EC para a acetilmetionina

Tabela 6. Preparação das amostras para determinação da exatidão do método por EC para a acetilmetionina

Tabela 7. Condições empregadas nos testes de estresse (KLICK et al., 2005).

Tabela 8. Valores obtidos nos ensaios de seletividade para o citrato de colina e acetilmetionina por CLAE

Tabela 9. Regressão linear dos dados e limites de detecção e de quantificação obtidos na determinação simultânea de citrato de colina e de acetilmetionina por CLAE

Tabela 10. Resultados estatísticos obtidos no teste de adequabilidade do sistema

Tabela 11. Resultados estatísticos obtidos no ensaio de precisão para determinação simultânea de citrato de colina e acetilmetionina em soluções injetáveis por CLAE

Tabela 12. Resultados estatísticos obtidos no teste de recuperação após adição das soluções padrão de citrato de colina e de acetilmetionina ao placebo e analisadas por CLAE

Tabela 13. Resultados obtidos empregando-se CLAE após as condições de estresse do citrato de colina e de acetilmetionina.

Tabela 14. Resultados obtidos nos ensaios de robustez: estabilidade 5 horas, detecção no UV em 215 nm e alteração da composição da fase móvel do citrato de colina e a acetilmetionina em comparação com a condição inicial

Tabela 15. Valores obtidos durante os ensaios de seletividade para a acetilmetionina empregando-se a EC

Tabela 16. Regressão linear dos dados e limites de detecção e de quantificação obtidos na análise de acetilmetionina por EC

Tabela 17. Resultados estatísticos obtidos no teste de adequabilidade do sistema

Tabela 18. Resultados estatísticos obtidos no ensaio de precisão para determinação de acetilmetionina em EC

Tabela 19. Resultados estatísticos obtidos no teste de recuperação da solução padrão de acetilmetionina adicionadas ao placebo e analisadas por EC

Tabela 20. Resultados obtidos utilizando o método por EC após o teste de estresse

Tabela 21. Resultados obtidos nos testes de robustez com variação da voltagem e pH da solução tampão tetraborato de sódio 20 mM pH 9.2 para a determinação de acetilmetionina por EC em comparação com a condição inicial

Tabela 22. Comparação dos resultados obtidos pelas técnicas de CLAE e EC para determinação quantitativa de acetilmetionina

LISTA DE ABREVIATURAS

AM	acetilmetionina
CC	citrato de colina
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
cm	centímetro
DPR	desvio padrão relativo
EC	eletroforese capilar
g	grama
HCL	ácido clorídrico
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
kV	kilovolts
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
NaOH	hidróxido de sódio

nm	nanômetro
r	coeficiente de correlação
s	segundo
μm	micrômetro
μL	microlitros
UV	ultravioleta

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi desenvolver, validar e comparar métodos analíticos para separação e quantificação de citrato de colina e acetilmetionina em formulações injetáveis por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC). O método por CLAE, com o qual foi possível quantificar e separar simultaneamente, o citrato de colina e a acetilmetionina, foi realizado empregando-se uma coluna cromatográfica C18, 250 x 4,6 mm, 5µm, Shim-Pack® VP-ODS e fase móvel constituída por tampão fosfato de potássio 25 mM pH 5,7: acetonitrila: metanol (88:10:2 v/v/v). O método por EC foi validado utilizando-se como eletrólito, tampão de tetraborato de sódio 20 mM a pH 9,2 e capilar de sílica fundida de 40,2 cm, sendo 30 cm efetivos, com 75 µm de diâmetro interno. O método por CLAE apresentou um coeficiente de correlação (r) de 0,9996 para o citrato de colina e 0,9998 para a acetilmetionina. No método por EC, o coeficiente de correlação (r) encontrado foi de 0,9996 para a acetilmetionina. Os métodos podem ser considerados eficientes e confiáveis para serem empregados em análises de rotina de controle de qualidade de soluções injetáveis contendo a associação dos dois fármacos selecionados para o estudo.

Palavras chaves: Métodos analíticos. Cromatografia líquida de alta eficiência. Eletroforese capilar. Citrato de colina. Acetilmetionina.

Validation of methods for analysis of choline citrate and acetylmethionine in injectable solutions by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis.

ABSTRACT

The objective of this research was to develop, to validate and to compare two analytical methods for separation and quantification of choline citrate and acetylmethionine in injectable formulations by high performance liquid chromatography (HPLC) and capillary electrophoresis (CE). The HPLC method which enables the separation and simultaneous quantitative determination of choline citrate and acetylmethionine was performed using a C18, 250 x 4.6 mm, 5 μ m-Shim-Pack®VP-ODS column and a mobile phase constituted of buffer 25 mM potassium phosphate, pH 5.7: acetonitrile: methanol (88:10:2 v/v/v). The CE method was validated using a solution of 20 mM sodium tetraborate buffer pH 9.2 as the electrolyte and a fused silica capillary of 40.2 cm, with 30 cm effective, and 75 μ m of diameter. The HPLC method showed a correlation coefficient (r) of 0.9996 for choline citrate and 0.9998 for acetylmethionine. For CE method the correlation coefficient (r) was found to be 0.9996 for acetylmethionine. The methods showed to be efficient and reliable methods, and can be used in routine analysis for quality control of injectable solutions containing the association of the two compounds selected to be studied in this research.

Keywords: Analytical methods. High performance liquid chromatography. Capillary electrophoresis. Choline citrate. Acetylmethionine

1. INTRODUÇÃO

O citrato de colina e a acetilmetionina são fármacos com ação lipotrópica utilizados em diferentes tipos de formulações farmacêuticas.

A análise química de misturas complexas é um dos ramos mais difundidos da Química Analítica, sendo a etapa inicial do processo de análise, o isolamento dos analitos dos interferentes e da matriz, seguida da determinação quantitativa dos analitos presentes na amostra.

Na presente pesquisa a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) será uma das técnicas empregadas para a quantificação de citrato de colina e da acetilmetionina em formulações farmacêuticas. A versatilidade desta técnica reside no grande número de fases estacionárias existentes, as quais possibilitam análises, separações e determinações quantitativas de uma ampla gama de compostos com alta eficiência (AQINO NETO, 2003).

Uma outra técnica a ser utilizada é a eletroforese capilar (EC) que nos últimos anos vem apresentando grandes possibilidades de aplicação na análise de preparações farmacêuticas, sendo que uma de suas grandes vantagens sobre a CLAE é a utilização de instrumentação muito simples e pouca quantidade de solventes (SANTORO et al., 2000).

O objetivo da pesquisa é, portanto, validar métodos analíticos para a separação e determinação do citrato de colina e da acetilmetionina em formulações injetáveis, visando a aplicação em análises de rotina destas formulações farmacêuticas, uma vez que conforme a RDC nº 17 de 16 de abril de 2010, que dispõe sobre as “Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos”, os métodos analíticos devem ser validados antes de serem adotados em laboratórios de controle de qualidade de medicamentos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Citrato de colina

O citrato de colina (Figura 1) é um pó branco cristalino. Facilmente solúvel em água, levemente solúvel em álcool e praticamente insolúvel em benzeno, clorofórmio e éter. Apresenta ponto de fusão de 105-107,5 °C, peso molecular de 295,29 e fórmula molecular $C_{11}H_{21}NO_8$. Tem como nome químico citrato de (2-hidroxi-etil) trimetilamônio e CAS 77-97-8 (MERCK INDEX, 2006).

Figura 1. Estrutura química do citrato de colina.

2.2 Acetilmetionina

A acetilmetionina (Figura 2) é um pó branco cristalino. Solúvel em água, álcool fervente, acetona. Apresenta ponto de fusão de 114-115 °C, peso molecular de 191,25 e fórmula molecular $C_7H_{13}NO_3S$. Tem como nome químico N-acetil-DL-metionina e CAS 1115-47-5 (MERCK INDEX, 2006).

Figura 2. Estrutura química da acetilmetionina.

2.3 Metodologia analítica

Foi realizada uma revisão bibliográfica para verificar o que já existe na literatura para a determinação quantitativa de colina e acetilmetionina (**Tabela 1**).

Para análise de colina foi desenvolvido um método por CLAE para avaliar a estabilidade das soluções por um período de 9 meses (HAYES et al, 1998).

A determinação de colina em aditivos alimentícios foi possível empregando-se a cromatografia líquida de troca iônica, (ZHANG; ZHU, 2007) e CLAE acoplada à espectrofotometria de massas, em alimentos infantis (ANDRIEUX et al., 2008).

Um método por espectrofotometria de fluorescência foi desenvolvido para determinar colina em enzimas (VICENTE et al., 2008). Empregando-se a EC, a colina foi determinada em *Rhizoma dioscoreae* (ZHANG; LIU; CHEN, 2004), em produtos farmacêuticos (CHERNOV`YANTS; SIMONYAN, 2003), alimentos infantis e em alguns alimentos selecionados (CARTER; TRENERRY, 1996). Um método espectrofotométrico é indicado pela Farmacopéia Brasileira 2ª edição de 1959.

Dentre os métodos descritos para a acetilmetionina estão a titulometria conforme indicado na Farmacopéia Brasileira 3ª edição de 1977, CLAE para determinação de aminoácidos em hidrolisados de caseína (CARREIRA et al., 2002), cromatografia de troca iônica para determinação de aminoácidos em culturas celulares e caldo de fermentação (HANKO; HECKENBER; ROHRER 2004) e EC para a determinação em plasma (ZINELLU et al., 2007).

A determinação simultânea de colina e de metionina por EC foi descrita em amostras de fluido amniótico (TUMA; SAMCOVÁ; ANDELOVÁ, 2006).

Tabela 1. Métodos analíticos para determinação de colina e de acetilmetionina.

Referência	Método/ Fármaco	Sistemas
HAYES et al, 1998.	CLAE Cloreto de metacolina	Fase móvel: Acetonitrila: 0,01M heptanossulfonato de sódio (20:80), coluna: C18 Waters Symetry ®5µm (3,9 x 150 mm).
ZHANG; ZHU, 2007.	Cromatografia de troca iônica Colina	Fase móvel: 4,5 mmol/L ácido metanossulfônico contendo 10% acetonitrila, coluna: Dionex IonPac SCS1® (250mm x 4 mm).
ANDRIEUX et al., 2008.	CLAE/EM Colina	Fase móvel: Metanol: Água (50:50) Coluna: ODS-3 Inertsil® 5µm (3,0 x 250 mm).
VICENTE et al., 2008.	Espectrofotometria de fluorescência Colina	Diluyente: tampão 0,1 M H ₂ KPO ₄ e 0,1M HNa ₂ PO ₄ , pH 8,0, 286 nm e 340 nm: comprimentos de onda de excitação e emissão.
ZHANG; LIU; CHEN, 2004.	EC Colina	Eletrólito: tampão fosfato 30 mmol/L, pH 9,25, 24 kV, 200nm, capilar 70 cm, 60 cm efetivo x 75µm diâmetro interno.
CHERNOV`YANTS; SIMONYAN, 2003	EC Colina	Eletrólito: 6 mM benzimidazol e 2,5 mM ácido tartárico pH 5,25, 10kV, 253,7 nm, capilar 60 cm, 50 cm efetivo x 75 µm diâmetro interno.
CARTER; TRENERRY, 1996.	EC Colina	Eletrólito: 5 mM metilimidazole pH 4,5, 30 kV, 214 nm, capilar 75 cm x 75µm, diâmetro interno.
FARMACOPÉIA Brasileira, 2ª ed, 1959.	Espectrofotometria Citrato de Colina	Reagentes: reineckato de amônio (3% p/v), água e álcool, acetona, 526 nm.

cont.

Referência	Método/ Fármaco	Metodologia
FARMACOPÉIA Brasileira 3ª ed, 1977.	Volumetria Acetilmetionina	Titulante: tiosulfato de sódio 0,1N.
CARREIRA et al., 2002.	CLAE Metionina	Fase móvel: Acetonitrila: trietilamina fosfato (10mMol/L), pH 2,8 (70:30), coluna: PHEA (poli-(2-hidroxietilaspártamida) Silica) PolyLc® 5µm (9,4 x 250 mm), 215 nm.
HANKO; HECKENBER; ROHRER 2004.	Cromatografia de troca iônica Metionina	Eluentes: A) 10mM NaOH, B) 250 mM NaOH, C) 25 mM NaOH em 1M de acetato de sódio e D) 100mM ácido acético. Coluna: AminoPac PA10® (2 x 250mm)
ZINELLU et al., 2007.	EC Metionina	Eletrólito: tampão fosfato pH 2,3, + 24 kV, 204nm, capilar 60,2 cm comprimento x 50 cm efetivo x 75 µm diâmetro interno.
TUMA; SAMCOVÁ; ANDELOVÁ, 2006.	EC com detector CCD Colina /Metionina	Eletrólito: ácido acético 1,7 M e hidroxietil- celulose 0,1% pH 2,15 capilar 80 cm de comprimento x 75 µm diâmetro interno, 67 para o CCD e 72 cm para o DAD.

2.4 Metodologia analítica utilizada na pesquisa

2.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi inicialmente conhecida como cromatografia líquida de alta pressão. Esta última terminologia foi abandonada há muito tempo, quando constatou-se que o diferencial de comportamento desta para com os demais tipos de cromatografias líquidas, não era a maior pressão, mas sim o melhor desempenho cromatográfico.

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias torna-a uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação.

A cromatografia pode ser utilizada para a identificação de compostos, por comparação com padrões previamente existentes, para a purificação de compostos, separando-se as substâncias indesejáveis e para a separação dos componentes de uma mistura.

O papel do solvente neste tipo de cromatografia é fundamental, pois as moléculas da fase móvel competem pelos sítios de adsorção polar, com as moléculas do soluto.

Entre as vantagens do emprego da CLAE, podem ser citadas:

- Procedimento simples e razoavelmente rápido; exige conhecimento das variáveis cromatográficas sobre as interações intermoleculares, que conduzem à separação.
- A análise instrumental permite maior resolução, automação de operações, registro e processamento da informação obtida.
- São requeridas apenas pequenas quantidades de amostra, podendo-se fazer uso de quantidades maiores de material (AQINO NETO, 2003).

2.4.2 Eletroforese capilar

Como quase todas as boas idéias, a eletroforese capilar (EC) é fácil e eficiente. O equipamento é constituído por componentes simples e perfeitamente controlados, proporcionando a repetibilidade e confiabilidade requeridas para a validação dos métodos analíticos empregados no controle de qualidade de medicamentos.

Para a separação de alguns compostos com estruturas muito complexas, tais como princípios ativos altamente polares, enantiômeros e compostos básicos, a EC oferece

vantagens muito significativas em relação a CLAE. A EC permite, ainda, fácil validação de ensaios quantitativos para determinação de traços de impurezas, assim como para a determinação quantitativa de vários compostos em fluidos biológicos (SANTORO et al., 2000).

Dentre outras vantagens temos o excelente poder de separação, boa sensibilidade, simplicidade operacional (LEITE, 2002).

A EC pode ser definida como o transporte de partículas eletricamente carregadas, em meio líquido, sob a influência de um campo elétrico. A separação eletroforética em capilares foi relatada na literatura na década de 70.

A EC é utilizada na análise de compostos polares iônicos e não-iônicos, biomoléculas de elevada massa molecular e compostos quirais. O mesmo capilar pode ser utilizado para separação e análise de compostos polares, não-polares, substâncias quirais e biomoléculas volumosas, como proteínas, peptídeos e carboidratos.

A maioria dos métodos de EC emprega detectores baseados em absorções nas regiões UV e UV-VIS (SANTORO et al., 2000).

Os módulos que compõe o sistema de EC são muito similares aos de um cromatógrafo líquido. A principal diferença é a utilização de uma fonte de alta voltagem para impulsionar o tampão através do capilar, em vez de uma bomba empregada em cromatografia líquida (LANÇAS, 2004).

Compostos polares e não polares podem ser analisados por EC e por CLAE. As duas técnicas podem ser utilizadas para análises de compostos ionizados, incluindo cátions e ânions inorgânicos. Em EC o eletrólito é normalmente uma solução tampão aquosa. É possível injetar diretamente a amostra, sem nenhum tratamento prévio.

Na EC, algumas vezes, adiciona-se pequena quantidade de solvente orgânico à solução tampão com o objetivo de solubilizar as substâncias que apresentem baixa solubilidade em água. A solução tampão empregada na EC pode abranger ampla faixa de pH. Nas colunas utilizadas em CLAE não devem ser empregadas fases móveis com pH acima de 8,0.

A técnica pode ser aplicada na determinação quantitativa de fármacos em formulações farmacêuticas. Nestes casos, o fármaco se encontra misturado com diversos excipientes que asseguram a reprodutibilidade de absorção pelo organismo (SANTORO et al., 2000).

3. OBJETIVOS

A qualidade de um produto farmacêutico é algo que se obtém como resultado de vários fatores que, de uma maneira ou de outra, entra na concepção, desenvolvimento, distribuição e uso do fármaco (SANTORO, 1988).

A necessidade de desenvolvimento e validação de métodos para a análise de citrato de colina e de acetilmetionina em preparações farmacêuticas é evidente, uma vez que pela revisão da literatura efetuada, ficou demonstrada a necessidade do desenvolvimento e validação de métodos empregando técnicas analíticas modernas, para a determinação simultânea e quantificação destes fármacos em preparações farmacêuticas.

Assim, os objetivos da pesquisa foram:

- Desenvolver e validar métodos analíticos simples, eficientes e de baixo custo para quantificação de citrato de colina e de acetilmetionina;
- Aplicar as metodologias validadas em formulações farmacêuticas injetáveis que tenham a associação dos fármacos, citrato de colina e acetilmetionina, uma vez que esta associação se encontra em diversas formulações disponíveis no comércio.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes

- Água deionizada pelo sistema MilliQ®;
- Acetonitrila grau cromatográfico (J.T.Baker®, Phillipsburg, USA)
- Metanol grau cromatográfico (J.T.Baker®, Phillipsburg, USA)
- Ácido ortofosfórico (Vetec®, Rio de Janeiro, Brasil)
- Fosfato de sódio dibásico p.a (Vetec®, Rio de Janeiro, Brasil)
- Fosfato de potássio monobásico p.a (Synth®, São Paulo, Brasil)
- Ácido fosfórico p.a (Synth®, São Paulo, Brasil)
- Ácido clorídrico p.a (Synth®, São Paulo, Brasil)
- Hidróxido de sódio p.a (Synth®, São Paulo, Brasil)
- Peróxido de hidrogênio p.a (Synth®, São Paulo, Brasil)
- Tetraborato de sódio p.a (Sigma Aldrich®)

4.1.2 Padrões analíticos

- Acetilmetionina (Sigma Aldrich®, Germany) 99,5 % de pureza.
- Citrato de colina (Sigma Aldrich®, USA) 100,00 % de pureza.

4.1.3 Amostras

- Solução injetável contendo 13,07g de citrato de colina e 10,00 g de acetilmetionina/ 100 mL.
- Solução placebo contendo inositol (5,0 g), cloridrato de tiamina (1,0 g), cloridrato de piroxidina (0,50 g), metilparabeno (0,09 g), propilparabeno (0,01g), amarelo tartrazina (0,012 g) e solução de cloreto de sódio 0.9 %/ 100mL.

4.1.4 Equipamentos

- Cromatógrafo líquido Shimatzu® composto de injetor automático SIL-20A com loop de 100 μ L, sistema de degasseificador DGU-20A5 on-line, sistemas de bombas quaternário LC-20AT, forno CTO-10Asvp, detector SPD-20A UV/VIS e software LC Solution® (Kyoto, Japan);
- Aparelho de eletroforese capilar Beckman Coulter Capillary Electrophoresis System P/ACE MDQ® (Brea, USA);
- pHmetro Quimis® Q400MT (São Paulo, Brasil);
- Balança analítica AB204-5 Mettler Toledo® (São Paulo, Brasil);
- Banho de ultrassom Quimis® Q335D (São Paulo, Brasil);
- Coluna cromatográfica C18, 250 x 4,6 mm, 5 μ m, Shim-Pack® VP-ODS (Kyoto, Japan);
- Pré- coluna cromatográfica C18, 10 x 4,6 mm, 5 μ m, Shim-Pack® VP-ODS (Kyoto, Japan);
- Capilar de sílica fundida de 40,2 cm sendo 30 cm efetivos até a coluna, 75 μ m de diâmetro interno, Polymicro Technologies® (AZ, USA);
- Milli-Q Ultrapure Water Purification System® (São Paulo, Brasil);
- Sistema de filtração a vácuo Millipore® (São Paulo, Brasil);
- Membrana filtrante PTFE 0,45 μ m, 47mm de diâmetro Millipore® (São Paulo, Brasil);
- Filtro Millex de PTFE 0,45 μ m, 25 mm de diâmetro Millipore® (São Paulo, Brasil).

4.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.2.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

4.2.1.2 Metodologia

- **Preparação do padrão:** Pesar cerca de 50,00 mg de padrão de acetilmetionina e 65,35 mg de citrato de colina e transferir para balão volumétrico de 50 mL. Adicionar cerca de 20 mL de água ultrapura e levar ao ultrasson por 5 minutos. Esperar esfriar, completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Filtrar em filtro Millex® PTFE 0,45 µm e transferir para um “vial”.
- **Preparação da amostra:** Pipetar 1 mL de amostra e transferir para balão volumétrico de 100 mL. Completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Filtrar em filtro Millex® PTFE 0,45 µm e transferir para um “vial”.

4.2.1.3 Preparação do tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 5,7

Dissolver 3,53 g de fosfato de sódio dibásico e 3,39 g de fosfato de potássio monobásico em 1 litro de água ultrapura. Ajustar o pH para 5,7 com ácido fosfórico 10%. Filtrar em membrana filtrante PTFE 0,45 µm com auxílio do sistema de filtração a vácuo.

4.2.1.4 Condições cromatográficas

- **Fase móvel:** Tampão fosfato de potássio 25 mM pH 5,7: Acetonitrila: Metanol (88:10:2, v/v/v)
- **Vazão:** 1,1 mL/min
- **Coluna:** C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm-Shim-Pack® VP-ODS
- **Pré-coluna:** C18, 10 x 4,6 mm, 5 µm, Shim-Pack® VP-ODS
- **Detecção:** UV 210 nm
- **Volume de injeção:** 20 µL
- **Temperatura:** 25°C

4.2.1.5 Validação do método analítico para determinação simultânea de citrato de colina e acetilmetionina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

4.2.1.5.1 Seletividade

A determinação da seletividade do método analítico foi realizada preparando-se soluções do padrão, amostras e placebo conforme descrito abaixo. As amostras foram preparadas em triplicata. Pela análise do placebo pode-se avaliar se os analitos presentes na matriz da amostra não sofrem interferências dos excipientes.

- **Preparação do padrão:** Pesar cerca de 50,00 mg de padrão de acetilmetionina e 65,35 mg de citrato de colina e transferir para balão volumétrico de 50 mL. Adicionar cerca de 20 mL de água ultrapura e levar ao ultrasson por 5 minutos. Esperar esfriar e completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Filtrar em filtro Millex® PTFE 0,45 µm e transferir para um “vial”.
- **Preparação da amostra:** Pipetar 1 mL de amostra e transferir para balão volumétrico de 100 mL. Completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Filtrar em filtro Millex® PTFE 0,45 µm e transferir para um “vial”.
- **Preparação do placebo:** Pipetar 1 mL do placebo e transferir para balão volumétrico de 100 mL. Completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Filtrar em filtro Millex® PTFE 0,45 µm e transferir para um “vial”.

4.2.1.5.2 Linearidade

A linearidade de um método determina a proporcionalidade entre a concentração e a resposta. É determinada através da construção da curva analítica (MARTIN-SMITH; RUDD, 1990).

Na linearidade busca-se a obtenção de resultados que apresentem proporção direta às concentrações da substância em estudo. Para o estudo da linearidade, faz-se necessária a confecção de uma curva de resposta, sendo o eixo **x** o da concentração e o eixo **y** o da resposta obtida.

$$y = ax + b$$

Onde: **a** = coeficiente angular (expressa a inclinação da reta)

b = coeficiente linear (expressa a intersecção da curva aos eixos).

As amostras foram preparadas em triplicata.

- **Preparação da solução mãe dos padrões:** Pesar exatamente 1,000 g de padrão de acetilmetionina e 1,307 g de citrato de colina e transferir para balão volumétrico de 100 mL. Adicionar cerca de 20 mL de água ultrapura e levar ao ultrassom por 5 minutos. Esperar esfriar e completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Pipetar a quantidade correspondente para balão volumétrico de 50 mL, conforme **Tabela 2**, para preparação das amostras de concentração 80%, 90%, 100%, 110% e 120%. Filtrar em filtro Millex® PTFE 0,45 µm e transferir para um “vial”.

Tabela 2. Preparação das amostras para a determinação da linearidade do citrato de colina e de acetilmetionina

Linearidade (%)	Volume solução mãe padrão (mL)	Balão volumétrico (mL)
80	4,0	50
90	4,5	50
100	5,0	50
110	5,5	50
120	6,0	50

4.2.1.5.2.2 Limite de detecção (LD)

É a concentração mínima detectada com precisão e exatidão especificada pelo método, porém não necessariamente quantificada (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

$$LD = \frac{\text{Desvio padrão médio}}{\text{Inclinação da curva}} \times 3,3$$

Inclinação da curva

4.2.1.5.2.3 Limite de quantificação (LQ)

É a concentração mínima mensurada com precisão e exatidão especificada pelo método e dentro de valores aceitáveis (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

$$LQ = \frac{\text{Desvio padrão médio}}{\text{Inclinação da curva}} \times 10$$

Inclinação da curva

4.2.1.5.4 Repetibilidade

A determinação da repetibilidade do método analítico foi realizada preparando-se as soluções do padrão e da amostra conforme descrito abaixo. As amostras foram preparadas em 6 réplicas.

- **Preparação do padrão:** Pesar cerca de 50,00 mg de padrão de acetilmetionina e 65,35 mg de citrato de colina e transferir para balão volumétrico de 50 mL. Adicionar cerca de 20 mL de água ultrapura e levar ao ultrassom por 5 minutos. Esperar esfriar e

completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Filtrar em filtro Millex® PTFE 0,45 µm e transferir para um “vial”.

- **Preparação da amostra:** Pipetar 1 mL de amostra e transferir para balão volumétrico de 100 mL. Completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Filtrar em filtro Millex® PTFE 0,45 µm e transferir para um “vial”.

4.2.1.5.5 Precisão intermediária

A determinação da precisão intermediária do método analítico foi realizada preparando-se as soluções do padrão e da amostra conforme descrito a seguir. As amostras foram preparadas em triplicata e analisadas por três dias consecutivos

- **Preparação do padrão:** Pesar cerca de 50,00 mg de padrão de acetilmetionina e 65,35 mg de citrato de colina e transferir para balão volumétrico de 50 mL. Adicionar cerca de 20 mL de água ultrapura e levar ao ultrassom por 5 minutos. Esperar esfriar e completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Filtrar em filtro Millex® PTFE 0,45 µm e transferir para um “vial”.
- **Preparação da amostra:** Pipetar 1 mL de amostra e transferir para balão volumétrico de 100 mL. Completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Filtrar em filtro Millex® PTFE 0,45 µm e transferir para um “vial”.

4.2.1.5.6 Exatidão

É a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.

A exatidão de um método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 determinações contemplando o intervalo linear do procedimento ou seja, em 3 concentrações, baixa, média e

alta, com 3 réplicas de cada (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

- **Preparação da solução mãe dos padrões:** Pesar exatamente 1 g de padrão de acetilmetionina e 1,307 g de citrato de colina e transferir para balão volumétrico de 100 mL. Adicionar cerca de 20 mL de água ultrapura e levar ao ultrassom por 5 minutos. Esperar esfriar e completar o volume com água ultrapura e homogeneizar.
- **Preparação das amostras adicionadas ao padrão:** Pipetar a quantidade correspondente de solução mãe dos padrões para balão volumétrico de 50 mL conforme **Tabela 3**, para preparação das amostras com concentrações de 80%, 100% e 120%. Acrescentar no mesmo balão a quantidade correspondente de placebo conforme descrito na **Tabela 3**. Completar com o volume água ultrapura e homogeneizar. Filtrar em filtro Millex® PTFE 0,45 µm e transferir para um “vial”.

Preparar amostras de padrão na concentração de 80%, 100% e 120% e amostras placebo sem contaminação para proceder aos cálculos de recuperação.

Tabela 3. Preparação de amostras para determinação da exatidão do método por CLAE para determinação do citrato de colina e de acetilmetionina

Exatidão (%)	Volume transferido (mL)	Balão volumétrico (mL)
80	4,0	50
100	5,0	50
120	6,0	50

$$\text{Cálculos: } \frac{\% \text{ amostra padrão sem contaminação}}{\% \text{ amostra contaminada}} \times 100$$

4.2.1.5.7 Teste de estresse

Tabela 4. Condições empregadas nos testes de estresse (KLICK et al., 2005).

Meio de reação	Temperatura (°C)	Tempo (horas)	Diluyente
Ácido	80	2	HCL 1M
Alcalino	80	2	NaOH 1M
Oxidante	80	2	H ₂ O ₂ 3%
Neutro	80	2	Água ultrapura

4.2.1.5.7.1 Estabilidade em meio ácido

A determinação da estabilidade em meio ácido foi realizada preparando-se as soluções do padrão e da amostra conforme descrito abaixo. As amostras foram preparadas em triplicata.

- **Preparação do padrão:** Pesar cerca de 50,00 mg de padrão de acetilmetionina e 65,35 mg de citrato de colina em becker de 50 mL. Adicionar exatamente 10 mL de HCL 1M. Levar a estufa a 80°C por 2 h. Transferir para balão volumétrico de 50 mL e após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Filtrar em filtro Millex® PTFE 0,45 µm e transferir para um “vial”.
- **Preparação da amostra:** Pipetar 1 mL de amostra em becker de 50 mL. Adicionar exatamente 10 mL de HCL 1M. Levar a estufa a 80°C por 2 h. Transferir para balão volumétrico de 100 mL e após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Filtrar em filtro Millex® PTFE 0,45 µm e transferir para um “vial”.

4.2.1.5.7.2 Estabilidade em meio alcalino

A determinação da estabilidade em meio alcalino foi realizada preparando-se as soluções do padrão e da amostra conforme descrito abaixo. As amostras foram preparadas em triplicata.

- **Preparação do padrão:** Pesar cerca de 50,00 mg de padrão de acetilmetionina e 65,35 mg de citrato de colina em becker de 50 mL. Adicionar exatamente 10 mL de NaOH 1M. Levar a estufa a 80°C por 2 h. Transferir para balão volumétrico de 50 mL e após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Filtrar em filtro Millex® PTFE 0,45 µm e transferir para um “vial”.
- **Preparação da amostra:** Pipetar 1 mL de amostra em becker de 50 mL. Adicionar exatamente 10 mL de NaOH 1M. Levar a estufa a 80°C por 2 h. Transferir para balão volumétrico de 100 mL e após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Filtrar em filtro Millex® PTFE 0,45 µm e transferir para um “vial”.

4.2.1.5.7.3 Estabilidade em meio oxidante

A determinação da estabilidade em meio oxidante foi realizada preparando-se as soluções do padrão e da amostra conforme descrito abaixo. As amostras foram preparadas em triplicata.

- **Preparação do padrão:** Pesar cerca de 50,00 mg de padrão de acetilmetionina e 65,35 mg de citrato de colina em becker de 50 mL. Adicionar exatamente 10 mL de peróxido de hidrogênio 3%. Levar a estufa a 80°C por 2 h. Transferir para balão volumétrico de 50 mL e após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente

completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Filtrar em filtro Millex® PTFE 0,45 µm e transferir para um “vial”.

- **Preparação da amostra:** Pipetar 1 mL de amostra em becker de 50 mL. Adicionar exatamente 10 mL de peróxido de hidrogênio 3%. Levar a estufa a 80°C por 2 h. Transferir para balão volumétrico de 100 mL e após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Filtrar em filtro Millex® PTFE 0,45 µm e transferir para um “vial”.

4.2.1.5.7.4 Estabilidade em meio neutro

A determinação da estabilidade em meio neutro foi realizada preparando-se as soluções do padrão e da amostra conforme descrito abaixo. As amostras foram preparadas em triplicata.

- **Preparação do padrão:** Pesar cerca de 50,00 mg de padrão de acetilmetionina e 65,35 mg de citrato de colina em becker de 50 mL. Adicionar exatamente 10 mL de água ultrapura. Levar a estufa a 80°C por 2 h. Transferir para balão volumétrico de 50 mL e após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Filtrar em filtro Millex® PTFE 0,45 µm e transferir para um “vial”.
- **Preparação da amostra:** Pipetar 1 mL de amostra em becker de 50 mL. Adicionar exatamente 10 mL de água ultrapura. Levar a estufa a 80°C por 2 h. Transferir para balão volumétrico de 100 mL e após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Filtrar em filtro Millex® PTFE 0,45 µm e transferir para um “vial”.

4.2.1.5.8 Robustez

Para os ensaios de robustez as amostras foram preparadas conforme o item 4.2.1.5.5. Foram empregadas as seguintes condições: alteração do comprimento de onda para 215 nm e da composição da fase móvel para (89:8:3, v/v/v).

4.2.2 ELETROFORESE CAPILAR

4.2.2.1 Determinação quantitativa de acetilmetionina

4.2.2.2 Metodologia

- **Preparação do padrão:** Pesar cerca de 10,00 mg de padrão de acetilmetionina e transferir para balão volumétrico de 10 mL. Adicionar cerca de 5 mL de água ultrapura e levar ao ultrassom por 5 minutos. Esperar esfriar e completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Transferir 500 µL para balão volumétrico de 5 mL, completar o volume e homogeneizar. Transferir para um “microvial”.
- **Preparação da amostra:** Pipetar 100 µL de amostra e transferir para balão volumétrico de 10 mL. Transferir 500 µL para balão volumétrico de 5 mL, completar o volume e homogeneizar. Completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Transferir para um “microvial”.

4.2.2.3 Preparação do tampão de tetraborato de sódio 20 mM, pH 9,2.

Dissolver 0,95 g de tetraborato de sódio e transferir para balão volumétrico de 25 mL, adicionar 15 mL de água ultrapura e levar ao ultrassom por 20 minutos. Esperar esfriar e completar o volume para 25 mL. Transferir 2 mL para balão volumétrico de 10 mL e completar o volume com água ultrapura. Filtrar em filtro Millex® PTFE 0,45 µm.

4.2.2.4 Condições analíticas

- **Eletrólito:** Tampão tetraborato de sódio 20 mM, pH 9,2
- **Modo de injeção:** Hidrodinâmica 0,5 psi , 5 segundos
- **Capilar:** Capilar de sílica fundida de 40,2 cm sendo 30 cm efetivos até a coluna, 75 µm de diâmetro interno, Polymicro Technologies®, AZ, USA.
- **Deteção:** UV 200 nm
- **Voltagem:** + 25 kV
- **Temperatura:** 20°C

O capilar foi condicionado com NaOH 0,1 N por 10 minutos, água ultrapura por 10 minutos e tampão tetraborato de sódio 20 mM, pH 9,2 por 20 minutos. Entre as corridas o capilar foi lavado com NaOH 0,1 N por 0,5 minutos, água ultrapura com por 1,5 minutos e com tampão tetraborato de sódio 20 mM pH 9,2 por 1,5 minutos.

4.2.2.5 Validação do método para determinação de acetilmetionina por eletroforese capilar

4.2.2.5.1 Seletividade

A determinação da seletividade do método analítico foi realizada preparando-se as soluções do padrão, amostra e placebo conforme descrito abaixo. As soluções da amostra foram preparadas em triplicata. Pela análise do placebo pode-se avaliar se os analitos presentes na matriz da amostra não sofrem interferências dos excipientes.

- **Preparação do padrão:** Pesar cerca de 10,00 mg de padrão de acetilmetionina e transferir para balão volumétrico de 10 mL. Colocar cerca de 5 mL de água ultrapura e levar ao ultrasson por 5 minutos. Esperar esfriar e completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Transferir 500 µL para balão volumétrico de 5 mL, completar o volume e homogeneizar. Transferir para um “microvial”.

- **Preparação da amostra:** Pipetar 100 µL de amostra e transferir para balão volumétrico de 10 mL. Transferir 500 µL para balão volumétrico de 5 mL, completar o volume e homogeneizar. Completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Transferir para um “microvial”.
- **Preparação do placebo:** Pipetar 100 µL do placebo e transferir para balão volumétrico de 10 mL. Transferir 500 µL para balão volumétrico de 5 mL, completar o volume e homogeneizar. Completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Transferir para um “microvial”.

4.2.2.5.2 Linearidade

A linearidade de um método determina a proporcionalidade entre a concentração e a resposta. É determinada através da construção da curva analítica (MARTIN-SMITH; RUDD, 1990).

Para o estudo da linearidade, faz-se necessária a confecção de uma curva de resposta, sendo o eixo **x** o da concentração e o eixo **y** o da resposta obtida.

$$y = ax + b$$

Onde: **a** = coeficiente angular (expressa a inclinação da reta)

b = coeficiente linear (expressa a intersecção da curva aos eixos).

As amostras foram preparadas em triplicata.

- **Preparação da solução mãe:** Pesar cerca de 25,00 mg de padrão de acetilmetionina e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 10 mL de água ultrapura e levar ao ultrassom por 5 minutos. Esperar esfriar e completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Pipetar a quantidade correspondente para balão volumétrico de 5 mL conforme **Tabela 5** para preparação das amostras de concentração 80%, 90%, 100%, 110% e 120%. Transferir para um “microvial”.

Tabela 5. Preparação das amostras para determinação da linearidade do método por EC para a acetilmetionina

Linearidade (%)	Volume solução mãe padrão (µL)	Balão volumétrico (µL)
80	400	5
90	450	5
100	500	5
110	550	5
120	600	5

4.2.2.5.2 Limite de detecção (LD)

É a concentração mínima detectada com precisão e exatidão especificada pelo método, porém não necessariamente quantificada (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

$$LD = \frac{\text{Desvio padrão médio} \times 3,3}{\text{Inclinação da curva}}$$

4.2.2.5.3 Limite de quantificação (LQ)

É a concentração mínima mensurada com precisão e exatidão especificada pelo método e dentro de valores aceitáveis (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

$$LQ = \frac{\text{Desvio padrão médio} \times 10}{\text{Inclinação da curva}}$$

4.2.2.5.4 Repetibilidade

A determinação da repetibilidade do método analítico foi realizada preparando-se as soluções do padrão e das amostras conforme descrito abaixo. As amostras foram preparadas em 6 replicatas.

- **Preparação do padrão:** Pesar cerca de 10,00 mg de padrão de acetilmetionina e transferir para balão volumétrico de 10 mL. Colocar cerca de 5 mL de água ultrapura e levar ao ultrassom por 5 minutos. Esperar esfriar e completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Transferir 500 μ L para balão volumétrico de 5 mL, completar o volume e homogeneizar. Transferir para um “microvial”.
- **Preparação da amostra:** Pipetar 100 μ L de amostra e transferir para balão volumétrico de 10 mL. Transferir 500 μ L para balão volumétrico de 5 mL, completar o volume e homogeneizar. Completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Transferir para um “microvial”.

4.2.2.5.5 Precisão intermediária

A determinação da precisão intermediária do método analítico foi realizada preparando-se o padrão e amostras conforme descrito abaixo. As amostras foram preparadas em triplicatas e analisadas em três dias alternados.

- **Preparação do padrão:** Pesar cerca de 10,00 mg de padrão de acetilmetionina e transferir para balão volumétrico de 10 mL. Adicionar cerca de 5 mL de água ultrapura e levar ao ultrassom por 5 minutos. Esperar esfriar e completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Transferir 500 μ L para balão volumétrico de 5 mL, completar o volume e homogeneizar. Transferir para um “microvial”.

- **Preparação da amostra:** Pipetar 100 μL de amostra e transferir para balão volumétrico de 10 mL. Transferir 500 μL para balão volumétrico de 5 mL, completar o volume e homogeneizar. Completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Transferir para um “microvial”.

4.2.2.5.6 Exatidão

É a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.

A exatidão de um método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 determinações, contemplando o intervalo linear do procedimento ou seja, em 3 concentrações baixa, média e alta, com 3 réplicas de cada (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

- **Preparação da solução mãe do padrão:** Pesar cerca de 25,00 mg de padrão de acetilmetionina e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Colocar cerca de 10 mL de água ultrapura e levar ao ultrassom por 5 minutos. Esperar esfriar e completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Pipetar a quantidade correspondente para balão volumétrico de 5 mL conforme **Tabela 6** para preparação das amostras de concentração 80%, 100% e 120%. Transferir para um “microvial”.
- **Preparação da solução mãe do placebo:** Pipetar 500 μL do placebo e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Transferir para “microvial”. Pipetar a quantidade correspondente para balão volumétrico de 5 mL conforme **Tabela 6**. Transferir para um “microvial”.

- **Preparação das amostras adicionadas de padrão:** Pipetar a quantidade correspondente de solução mãe do padrão para balão volumétrico de 5 mL conforme **Tabela 6** para preparação das amostras de concentração 80%, 100% e 120%. Acrescentar no mesmo balão a quantidade correspondente de placebo conforme descrito na tabela abaixo. Transferir para um “microvial”.

Preparar amostras de padrão na concentração de 80%, 100% e 120% e amostras placebo sem contaminação para proceder aos cálculos de recuperação.

Tabela 6. Preparação das amostras para determinação da exatidão do método por EC para a acetilmetionina

Exatidão (%)	Volume transferido (µL)	Balão volumétrico (µL)
80	400	5
100	500	5
120	600	5

$$\text{Cálculos: } \frac{\% \text{ amostra padrão sem contaminação}}{\% \text{ amostra contaminada}} \times 100$$

4.2.1.5.7 Teste de estresse

Tabela 7. Condições empregadas nos testes de estresse (KLICK et al., 2005).

Meio de reação	Temperatura (°C)	Tempo (horas)	Diluyente
Ácido	80	2	HCL 1M
Alcalino	80	2	NaOH 1M
Oxidante	80	2	H ₂ O ₂ 3%
Neutro	80	2	Água ultrapura

4.2.2.5.7.1 Estabilidade em meio ácido

A determinação da estabilidade em meio ácido foi realizada preparando-se as soluções do padrão e das amostras conforme descrito abaixo. As amostras foram preparadas em triplicata.

- **Preparação do padrão:** Pesar 10,00 mg de padrão de acetilmetionina em becker de 50 mL. Adicionar 2 mL de HCL 1M. Levar a estufa a 80°C por 2 h. Transferir para balão volumétrico de 10 mL e após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente completar o volume com água ultrapura. Transferir 500 µL para balão volumétrico de 5 mL. Completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Transferir para um “microvial”.
- **Preparação da amostra:** Pipetar 100 µL de amostra em becker de 50 mL. Adicionar exatamente 2 mL de HCL 1M e levar a estufa a 80°C por 2 h. Transferir para balão volumétrico de 10 mL e após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente completar o volume com água ultrapura. Transferir 500 µL para balão volumétrico de 5 mL. Completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Transferir para um “microvial”.

4.2.2.5.7.2 Estabilidade em meio alcalino

A determinação da estabilidade em meio alcalino foi realizada preparando-se as soluções do padrão e das amostras conforme descrito abaixo. As amostras foram preparadas em triplicata.

- **Preparação do padrão:** Pesar 10,00 mg de padrão de acetilmetionina em becker de 50 mL. Adicionar 2 mL de NaOH 1M. Levar a estufa a 80°C por 2 h. Transferir para balão volumétrico de 10 mL e após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente completar o volume com água ultrapura. Transferir 500 µL para balão

volumétrico de 5 mL. Completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Transferir para um “microvial”.

- **Preparação da amostra:** Pipetar 100 μ L de amostra em becker de 50 mL. Adicionar exatamente 2 mL de NaOH 1M e levar a estufa a 80°C por 2 h. Transferir para balão volumétrico de 10 mL e após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente completar o volume com água ultrapura. Transferir 500 μ L para balão volumétrico de 5 mL. Completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Transferir para um “microvial”.

4.2.2.5.7.3 Estabilidade em meio oxidante

A determinação da estabilidade em meio oxidante foi realizada preparando-se as soluções do padrão e das amostras conforme descrito abaixo. As amostras foram preparadas em triplicata.

- **Preparação do padrão:** Pesar 10,00 mg de padrão de acetilmetionina em becker de 50 mL. Adicionar 2 mL de peróxido de hidrogênio 3%. Levar a estufa a 80°C por 2 h. Transferir para balão volumétrico de 10 mL e após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente completar o volume com água ultrapura. Transferir 500 μ L para balão volumétrico de 5 mL. Completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Transferir para um “microvial”.
- **Preparação da amostra:** Pipetar 100 μ L de amostra em becker de 50 mL. Adicionar exatamente 2 mL de peróxido de hidrogênio 3% e levar a estufa a 80°C por 2 h. Transferir para balão volumétrico de 10 mL e após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente completar o volume com água ultrapura. Transferir 500 μ L para balão volumétrico de 5 mL. Completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Transferir para um “microvial”.

4.2.2.5.7.4 Estabilidade em meio neutro

A determinação da estabilidade em meio neutro foi realizada preparando-se as soluções do padrão e das amostras conforme descrito abaixo. As amostras foram preparadas em triplicata.

- **Preparação do padrão:** Pesar 10,00 mg de padrão de acetilmetionina em becker de 50 mL. Adicionar 2 mL de água ultrapura. Levar a estufa a 80°C por 2 h. Transferir para balão volumétrico de 10 mL e após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente completar o volume com água ultrapura. Transferir 500 µL para balão volumétrico de 5 mL. Completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Transferir para um “microvial”.
- **Preparação da amostra:** Pipetar 100 µL de amostra em becker de 50 mL. Adicionar exatamente 2 mL de água ultrapura e levar a estufa a 80°C por 2 h. Transferir para balão volumétrico de 10 mL e após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente completar o volume com água ultrapura. Transferir 500 µL para balão volumétrico de 5 mL. Completar o volume com água ultrapura e homogeneizar. Transferir para um “microvial”.

4.2.1.5.8 Robustez

Para os ensaios de robustez as amostras foram preparadas conforme descrito no item 4.2.2.5. Foram analisadas as seguintes alterações:

- Alteração da voltagem para +23 kV e +27 kV;
- Alteração do pH do tampão fosfato de sódio para 9,0 e 9,4.

5. RESULTADOS

5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para desenvolvimento do método para determinação simultânea de citrato de colina e de acetilmetionina por CLAE, diferentes fases móveis e colunas foram testadas para alcançar uma separação e resolução eficiente dos dois fármacos. Para obtenção de uma boa simetria dos picos foi utilizada uma fase móvel tamponada, onde o pico de citrato de colina foi detectado em 2,42 min e o da acetilmetionina em 3,96 min. Os cromatogramas obtidos podem ser observados na **Figura 3**.

Figure 3. Cromatogramas das soluções do padrão (a), da amostra (b) e do placebo (c). Concentração: 1,307 mg/mL de citrato de colina e 1,000 mg/mL de acetilmetionina. Condições: coluna C18, 250 x 4.6 mm, 5μm, Shim-Pack® VP-ODS, fase móvel: tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 5,7 ajustado com ácido fosfórico 10%: acetonitrila: metanol (88:10:2 v/v/v), vazão: 1,1 mL/min, detecção UV 210 nm, volume de injeção: 20 μL e temperatura do forno 25°C.

5.1.1 Seletividade

Os resultados encontrados na determinação da seletividade empregando-se o método por CLAE podem ser observados na **Tabela 8**.

Tabela 8. Valores obtidos nos ensaios de seletividade para o citrato de colina e acetilmetionina por CLAE

Citrato de colina	Solução amostra			Solução placebo		
	1	2	3	1	2	3
(%)	103,16	103,05	102,51	0	0	0
Média (%)		102,91			0	
DPR (%)		0,34			0	

Acetilmetionina	Solução amostra			Solução placebo		
	1	2	3	1	2	3
(%)	97,01	97,10	96,59	0	0	0
Média (%)		96,90			0	
DPR (%)		0,28			0	

DPR = Desvio padrão relativo (%)

5.1.2 Linearidade

Os resultados da determinação da curva analítica empregando-se o método por CLAE podem ser observados nas **Figuras 4 e 5**.

Figura 4. Curva analítica do citrato de colina obtida pelo método cromatográfico. Condições: coluna C18, 250 x 4.6 mm, 5 μ m, Shim-Pack® VP-ODS , fase móvel: tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 5,7 ajustado com ácido fosfórico 10%: acetonitrila: metanol (88:10: 2 v/v/v), vazão: 1,1 mL/min, detecção UV 210 nm, volume de injeção: 20 μ L e temperatura do forno 25°C.

Figura 5. Curva analítica da acetilmetionina obtida pelo método cromatográfico. Condições: coluna C18, 250 x 4.6 mm, 5 μ m, Shim-Pack® VP-ODS, fase móvel: tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 5,7 ajustado com ácido fosfórico 10%: acetonitrila: metanol (88:10: 2 v/v/v), vazão: 1,1 mL/min, detecção UV 210 nm, volume de injeção: 20 μ L e temperatura do forno 25°C.

Os resultados obtidos na determinação da curva analítica e os limites de detecção e de quantificação, empregando-se o método por CLAE, podem ser observados na **Tabela 9**.

Tabela 9. Regressão linear dos dados e limites de detecção e de quantificação obtidos na determinação simultânea de citrato de colina e de acetilmetionina por CLAE

Parâmetros estatísticos	Citrato de colina	Acetilmetionina
Intervalo de concentração (mg/mL) ^a	1,045 – 1,568	0,800 – 1,200
Equação da reta	$y = 781564x + 84114$	$y = 9.10^6 x + 1.10^6$
Coefficiente de correlação (r)	0,9996	0,9998
Limite de detecção (mg/mL)	0,065	0,004
Limite de quantificação (mg/mL)	0,197	0,013
Teste F ^b	3766,293	7452,647

^a n= 5

^b Valor de confiança de 95%, 6,39.

5.1.3 Teste de adequabilidade do sistema

Os resultados obtidos no teste de adequabilidade do sistema podem ser observados na **Tabela 10**.

Tabela 10. Resultados estatísticos obtidos no teste de adequabilidade do sistema

Parâmetros ^a	Citrato de colina	Acetilmetionina
Tempo de retenção	2,415 ± 0,03	3,961 ± 0,13
Área	1111534 ± 0,36	9954008 ± 0,06
Altura dos picos	168900 ± 0,23	1282136 ± 0,51
Pratos teóricos	2805 ± 0,90	5446 ± 1,15
Fator de capacidade	0,10 ± 0,00	0,74 ± 0,64
Assimetria	1,00 ± 0,00	1,18 ± 0,00

^a Média 10 determinações padrão

5.1.4 Precisão

Os resultados da determinação da precisão obtidos podem ser observados na **Tabela 11**.

Tabela 11. Resultados estatísticos obtidos no ensaio de precisão para determinação simultânea de citrato de colina e acetilmetionina em soluções injetáveis por CLAE

Precisão	Citrato de colina (%)	Acetilmetionina (%)
Repetibilidade ^a	103,06	97,04
DPR (%)	0,46	0,48
Precisão intermediária ^b	104,96	98,94
	103,41	98,94
	102,91	96,90
DPR (%)	1,03	1,20

^a valor média aritmética (n = 6)

^b valor média aritmética (n = 3)

DPR= Desvio padrão relativo (%)

5.1.5 Exatidão

Os resultados do teste de recuperação obtidos, empregando-se o método de determinação por CLAE, podem ser observados na **Tabela 12**.

Tabela 12. Resultados estatísticos obtidos no teste de recuperação após adição das soluções padrão de citrato de colina e de acetilmetionina ao placebo e analisadas por CLAE

	Adicionado (mg/ mL)	Encontrado (mg/ mL)	Recuperado (%)
Citrato de colina	1,046	1,038	99,24
	1,306	1,307	100,08
	1,570	1,561	99,43
	Adicionado (mg/ mL)	Encontrado (mg/ mL)	Recuperado (%)
Acetilmetionina	0,799	0,793	99,25
	0,997	0,998	100,10
	1,199	1,197	99,83

5.1.6 Teste de estresse

Os resultados obtidos nos testes de estresse, empregando-se o método por CLAE, podem ser observados na **Tabela 13** e nas **Figuras 6, 7, 8 e 9**.

Tabela 13. Resultados obtidos empregando-se CLAE após as condições de estresse do citrato de colina e de acetilmetionina.

Meio de reação	Condição Inicial (%)		Após estresse (%)		Degradação (%)	
	CC	AM	CC	AM	CC	AM
Ácido	104,96	97,65	52,78	93,88	52,18	3,77
Alcalino	104,96	97,65	94,03	96,07	10,93	1,58
Oxidante	104,96	97,65	105,02	0,00	0,00	100,00
Neutro	104,96	97,65	104,20	96,93	0,76	0,72

CC= Citrato de colina

AM= Acetilmetionina

5.1.6.1 Meio ácido

Figura 6. Cromatograma da solução de citrato de colina 1,307 mg/mL e de acetilmetionina 1,000 mg/mL após exposição em meio ácido. Condições: coluna C18, 250 x 4.6 mm, 5 μ m, Shim-Pack® VP-ODS, fase móvel: tampão fosfato de sódio 25 mM pH 5,7 ajustado com ácido fosfórico 10%: acetonitrila: metanol (88: 10: 2 v/v/v), vazão: 1,1 mL/min, detecção UV 210 nm, volume de injeção: 20 μ L e temperatura do forno 25°C.

5.1.6.2 Meio alcalino

Figura 7. Cromatograma da solução de citrato de colina 1,307 mg/mL e de acetilmetionina 1,000 mg/mL após exposição em meio alcalino. Condições: coluna C18, 250 x 4.6 mm, 5 μ m, Shim-Pack® VP-ODS, fase móvel: tampão fosfato de sódio 25 mM pH 5,7 ajustado com ácido fosfórico 10%: acetonitrila: metanol (88: 10: 2 v/v/v), vazão: 1,1 mL/min, detecção UV 210 nm, volume de injeção: 20 μ L e temperatura do forno 25°C.

5.1.6.3 Meio oxidante

Figura 8. Cromatograma da solução de citrato de colina 1,307 mg/mL e de acetilmetionina 1,000 mg/mL após exposição em meio oxidante. Condições: coluna C18, 250 x 4.6 mm, 5 μ m, Shim-Pack® VP-ODS, fase móvel: tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 5,7 ajustado com ácido fosfórico 10%: acetonitrila: metanol (88: 10: 2 v/v/v), vazão: 1,1 mL/min, detecção UV 210 nm, volume de injeção: 20 μ L e temperatura do forno 25°C.

5.1.6.4 Meio neutro

Figura 9. Cromatograma da solução de citrato de colina 1,307 mg/mL e de acetilmetionina 1,000 mg/mL após exposição em meio neutro. Condições: coluna C18, 250 x 4.6 mm, 5µm, Shim-Pack® VP-ODS, fase móvel: tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 5,7 ajustado com ácido fosfórico 10%: acetonitrila: metanol (88: 10: 2 v/v/v), vazão: 1,1 mL/min, detecção UV 210 nm, volume de injeção: 20 µL e temperatura do forno 25°C.

5.1.7 Robustez

Os resultados obtidos no ensaio de robustez, empregando-se o método por CLAE, podem ser observados na **Tabela 14**.

Tabela 14. Resultados obtidos nos ensaios de robustez: estabilidade 5 horas, detecção no UV em 215 nm e alteração da composição da fase móvel do citrato de colina e a acetilmetionina em comparação com a condição inicial

Estabilidade 5 horas	Citrato de colina ^a	Acetilmetionina ^a
	0,28	0,09
Robustez	Citrato de colina ^a	Acetilmetionina ^a
Detecção UV (215 nm)	0,16	0,14
Composição fase móvel (89:8:3, v/v/v)	0,86	0,11

^a Desvio padrão relativo (%)

5.2 Eletroforese capilar

Para desenvolvimento do método para determinação de acetilmetionina por eletroforese capilar, diferentes tampões, capilares e parâmetros foram testados para quantificar o fármaco.

Foi utilizado o tampão de tetraborato de sódio 20 mM, quando o pico da acetilmetionina foi detectado em 1,908 min. Os eletroferogramas obtidos podem ser observados na **Figura 10**.

Figura 10. Eletroferogramas das soluções de padrão (a), da amostra (b) e do placebo(c). Concentração: 0,100 mg/mL de acetilmetionina. Condições: capilar de sílica fundida de 40,2 cm sendo 30 cm efetivos, 75 μ m de diâmetro interno, eletrólito: tampão tetraborato de sódio 20 mM pH 9,2, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi , 5 segundos, voltagem: + 25 kV, detecção UV 200 nm, temperatura 20°C.

5.2.1 Seletividade

Os resultados encontrados na determinação da seletividade empregando-se o método por EC podem ser observados na **Tabela 15**.

Tabela 15. Valores obtidos durante os ensaios de seletividade para a acetilmetionina empregando-se a EC

Acetilmetionina	Solução amostra			Solução placebo		
	1	2	3	1	2	3
(%)	99,40	99,24	99,47	0	0	0
Média (%)		99,37			0	
DPR (%)		0,12			0	

DPR= Desvio padrão relativo (%)

5.2.2 Linearidade

Os resultados da determinação da curva analítica empregando-se o método por EC podem ser observados na **Figura 11**.

Figura 11. Curva analítica da acetilmetionina obtida pelo método por EC. Condições: capilar de sílica fundida de 40,2 cm sendo 30 cm efetivos, 75 µm de diâmetro interno, eletrólito: tampão tetraborato de sódio 20 mM pH 9,2, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi, 5 segundos, voltagem: + 25 kV, detecção UV 200 nm, temperatura 20°C.

Os resultados obtidos na determinação da curva analítica e os limites de detecção e de quantificação, empregando-se o método por EC, podem ser observados na **Tabela 16**.

Tabela 16. Regressão linear dos dados e limites de detecção e de quantificação obtidos na análise de acetilmetionina por EC

Parâmetros estatísticos	Acetilmetionina
Intervalo de concentração (mg/mL) ^a	0,080 – 0,120
Equação da reta	$y = 756097x + 3016,3$
Coeficiente de correlação (r)	0.9996
Limite de detecção (mg/mL)	0,007
Limite de quantificação (mg/mL)	0,020
Teste F ^b	4499,981

^a n= 5

^b Valor de confiança de 95%, 6,39.

5.2.3 Teste de adequabilidade do sistema

Os resultados obtidos no teste de adequabilidade do sistema, empregando-se o método por EC, podem ser observados na **Tabela 17**.

Tabela 17. Resultados estatísticos obtidos no teste de adequabilidade do sistema

Parâmetros ^a	Acetilmetionina
Tempo de retenção	$1,923 \pm 0,11$
Área	$24986 \pm 1,58$
Altura dos picos	$13248 \pm 1,61$
Pratos teóricos	$23214 \pm 0,77$
Fator de capacidade	$0,60 \pm 0,12$
Assimetria	$0,82 \pm 1,19$

^a Média 10 determinações padrão

5.2.4 Precisão

Os resultados da determinação da precisão obtidos, empregando-se o método de determinação por EC, podem ser observados conforme **Tabela 18**.

Tabela 18. Resultados estatísticos obtidos no ensaio de precisão para determinação de acetilmetionina em EC

Precisão	Acetilmetionina (%)
Repetibilidade ^a	98,56
DPR (%)	0,94
Precisão intermediária ^b	99,44
	99,37
	98,75
DPR (%)	0,38

^a valor média aritmética (n = 6)

^b valor média aritmética (n = 3)

DPR= Desvio padrão relativo (%)

5.2.5 Exatidão

Os resultados do teste de recuperação obtidos, empregando-se o método de EC podem ser observados conforme **Tabela 19**.

Tabela 19. Resultados estatísticos obtidos no teste de recuperação da solução padrão de acetilmetionina adicionadas ao placebo e analisadas por EC

	Adicionado (mg/ mL)	Encontrado (mg/ mL)	Recuperado (%)
Acetilmetionina	0,080	0,079	98,75
	0,100	0,100	100,00
	0,120	0,119	99,17

5.2.6 Teste de estresse

Os resultados obtidos do teste de estresse, empregando-se o método por EC podem ser observados na **Tabela 20** e nas **Figuras 12, 13, 14 e 15**.

Tabela 20. Resultados obtidos utilizando o método por EC após o teste de estresse

Meio de reação	Condição Inicial (%)	Após estresse (%)	Degradação (%)
Ácido	99,37	98,32	1,05
Alcalino	99,37	86,49	12,88
Oxidante	99,37	82,23	17,14
Neutro	99,37	89,27	10,10

5.2.6.1 Meio ácido

Figura 12. Eletroferograma da solução de acetilmetionina (0,100 mg/mL) após exposição em meio ácido. Condições: capilar de sílica fundida de 40,2 cm sendo 30 cm efetivos, 75 μ m de diâmetro interno, eletrólito: tampão tetraborato de sódio 20 mM pH 9,2, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi, 5 segundos, voltagem: + 25 kV, detecção UV 200 nm, temperatura 20°C.

5.2.6.2 Meio alcalino

Figura 13. Eletroferograma da solução de acetilmetionina (0,100 mg/mL) após exposição em meio alcalino. Condições: capilar de sílica fundida de 40,2 cm sendo 30 cm efetivos, 75 μ m de diâmetro interno, eletrólito: tampão tetraborato de sódio 20 mM pH 9,2, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi , 5 segundos, voltagem: + 25 kV, detecção UV 200 nm, temperatura 20°C.

5.2.6.3 Meio oxidante

Figura 14. Eletroferograma da solução de acetilmetionina (0,100 mg/mL) após exposição em meio oxidante. Condições: capilar de sílica fundida de 40,2 cm sendo 30 cm efetivos, 75 μ m de diâmetro interno, eletrólito: tampão tetraborato de sódio 20 mM pH 9,2, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi , 5 segundos, voltagem: + 25 kV, detecção UV 200 nm, temperatura 20°C.

5.2.6.4 Meio neutro

Figura 15. Eletroferograma da solução de acetilmetionina (0,100 mg/mL) após exposição em meio neutro. Condições: capilar de sílica fundida de 40,2 cm sendo 30 cm efetivos, 75 μ m de diâmetro interno, eletrólito: tampão tetraborato de sódio 20 mM pH 9,2, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi, 5 segundos, voltagem: + 25 kV, detecção UV 200 nm, temperatura 20°C.

5.2.7 Robustez

Os resultados obtidos no ensaio de robustez, empregando-se o método por EC, podem ser observados na **Tabela 21**.

Tabela 21. Resultados obtidos nos testes de robustez com variação da voltagem e pH da solução tampão tetraborato de sódio 20 mM pH 9.2 para a determinação de acetilmetionina por EC em comparação com a condição inicial

Robustez (voltagem)	Condição Inicial (%)	+ 23 kV	+ 27 kV
%	99,37	100,83	98,07
DPR (%)		1,03	0,93
Robustez (pH)	Condição Inicial (%)	pH 9,0	pH 9,4
%	99,37	98,63	101,06
DPR (%)		0,53	0,19

DPR= Desvio padrão relativo (%)

5.2.8 Comparação entre as técnicas de CLAE e EC para determinação quantitativa de acetilmetionina

Os resultados obtidos na determinação de acetilmetionina por CLAE e por EC podem ser observados na **Tabela 22**.

Tabela 22. Comparação dos resultados obtidos pelas técnicas de CLAE e EC para determinação quantitativa de acetilmetionina

Acetilmetionina	CLAE	EC
	98,94	99,37
DPR (%)		0,31
Teste F ^a		9,12
Teste t ^b		1,99

DPR= Desvio padrão relativo (%)

^a Valor crítico F com P= 95%, F= 19,0.

^b Valor crítico t – Student's com P= 95%, t = 2,571.

6. DISCUSSÃO

A qualidade de um produto farmacêutico é algo imprescindível para segurança e eficácia ao usuário do medicamento.

O controle de qualidade deve pesquisar novas metodologias e validá-las, o que implica em maior qualidade e assegura que os medicamentos se encontram dentro das especificações de qualidade para o mesmo.

A confiabilidade de um método analítico é confirmada pelo processo de validação. Este processo deve garantir, através de estudos experimentais, que todas as exigências das aplicações analíticas sejam atendidas, o que assegura os resultados obtidos pelo método analítico em estudo (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA., 2003; RIBANI et al., 2004).

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar metodologias para quantificação de citrato de colina e de acetilmetionina em soluções injetáveis comercializadas no Brasil por cromatografia líquida de alta eficiência e por eletroforese capilar, através de métodos simples e eficientes.

Após revisão da literatura ficou evidente que não se encontram muitas publicações sobre a determinação quantitativa de citrato de colina e de acetilmetionina em soluções injetáveis, e que não é relatada a quantificação simultânea dos dois fármacos por cromatografia líquida de alta eficiência.

6.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

Para a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram testadas diferentes fases móveis e diferentes colunas cromatográficas. Foram testadas as colunas C18 e C8 para verificar a melhor separação. Foi observado que a coluna cromatográfica C18, 250 x 4.6 mm, 5 µm-Shim-Pack® VP-ODS foi a que possibilitou a melhor separação dos picos dos dois fármacos.

Com o propósito de desenvolver uma metodologia simples, rápida e de baixo custo foi utilizada uma fase móvel constituída de tampão fosfato de potássio 25 mM pH 5,7:

acetonitrila: metanol (88:10:2, v/v/v). Foram testados diferentes pHs, mas o que se apresentou melhor foi o pH de 5,7, o qual foi ajustado com ácido fosfórico 10%. O comprimento de onda escolhido foi o de 210 nm, assim como a vazão de 1,1 mL/min, volume de injeção de 20 µL e temperatura de 25°C.

Foi estabelecido o comprimento de onda de 210 nm, pois dentre os outros testados para a detecção, foi este o que proporcionou os melhores resultados.

As condições foram escolhidas visto que os tempos de retenção foram adequados para a análise de rotina, sendo 2,42 min citrato de colina e 3,96 min para a acetilmetionina. A temperatura do forno foi mantida em 25°C.

As soluções foram preparadas na concentração de 1,307 mg/mL de citrato de colina e 1,000 mg/mL de acetilmetionina. Nestas concentrações os compostos apresentam-se dentro da faixa de linearidade obedecendo à lei de Lambert-Beer e estão acima dos limites de detecção 0,065 mg/mL e 0,004 mg/mL e dos limites de quantificação 0,197 mg/mL e 0,013 mg/mL para o citrato de colina e para a acetilmetionina, respectivamente. Para o cálculo dos limites de quantificação e de detecção foram utilizados os parâmetros da curva analítica, que são estatisticamente confiáveis.

Para a diluição das soluções analisadas utilizou-se como solvente a água ultrapura, já que após os testes efetuados com diferentes solventes, inclusive a fase móvel, a água ultrapura foi a que proporcionou as respostas mais satisfatórias em relação aos outros solventes, além de ser a mais econômica e não tóxica para o ser humano e para o ambiente.

Outras fases móveis foram testadas, mas a que possibilitou a determinação simultânea dos dois fármacos, com uma boa assimetria e resolução dos picos, foi a fase móvel descrita anteriormente.

Para a validação do método analítico foi realizado o ensaio de seletividade, que garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Conforme pode ser visto na **Figura 3** pode-se observar que os excipientes não interferem na quantificação do citrato de colina e da acetilmetionina.

A curva analítica foi construída traçando-se a área do pico versus a concentração. Foi encontrado um coeficiente de correlação de 0,9996 para o citrato de colina e 0,9998 para a acetilmetionina tanto para o citrato de colina como para a acetilmetionina. Para o método proposto a curva foi traçada na concentração de 1,045–1,568 mg/mL e 0,800– 1,200 mg/mL, respectivamente, para o citrato de colina e para a acetilmetionina. O range utilizado foi

conforme ICH (2005) que descreve que para ensaios de substâncias e produto acabado é indicado um range de 80 to 120% da concentração teórica.

Outro teste que confirma a proporcionalidade é o teste F para a regressão linear, resultante da análise da variância. O valor experimental deve ser pelo menos 10 vezes maior que o valor tabelado para um nível de confiança de 95% (PIMENTEL; NETO, 1996). O valor obtido foi muito maior que 10 vezes o valor tabelado (6,39), conclui-se, assim proporção linear e validade da regressão linear para o nível de confiança selecionado.

Os resultados do teste de adequabilidade do sistema podem ser observados na **Tabela 10**. Por este teste pode-se verificar que a resolução e a repetibilidade do sistema cromatográfico estão adequadas. Os resultados destes testes garantem que o equipamento utilizado está apto a gerar resultados confiáveis (USP, 2010). Pelos resultados obtidos para o desvio padrão relativo (DPR), que foram inferiores a 2%, pode-se assegurar que o sistema está adequado para a realização dos testes de validação.

Pelo ensaio de repetibilidade, expresso pelo DPR, que está apresentado na **Tabela 11**, observa-se que o DPR foi inferior a 5%, conforme RE 899, indicando a repetibilidade do método.

Pela precisão intermediária (**Tabela 11**) e pelos dados encontrados, pode-se verificar que o DPR foi inferior a 2%, assegurando a precisão do método proposto.

A exatidão foi avaliada em três níveis de concentração. A recuperação média encontrada foi de 99,58% para o citrato de colina e de 99,73% para a acetilmetionina, (**Tabela 12**). Os valores encontrados demonstram que o método é exato, pois a recuperação obtida está dentro da faixa de 98-102% do valor teórico (JENKE, 1996, BLIESNER, 2006).

Para o método por CLAE, os resultados dos testes de estresse podem ser observados na **Tabela 13** e nas **Figuras 6, 7, 8 e 9**. Após exposição em meio neutro observou-se que o tempo de retenção não variou e não verificou-se a degradação da amostra. Após exposição em meio oxidante, o pico do citrato de colina não sofre degradação, mas o da acetilmetionina, sim. Picos desconhecidos podem ser observados, indicando a degradação da acetilmetionina. Na exposição em meio ácido observou-se a degradação significativa do citrato de colina. Após exposição em meio alcalino observou-se degradação do citrato de colina, mas os tempos de retenção dos dois fármacos não foram alterados.

Após mudanças deliberadas nos parâmetros de análise, não foram observadas alterações significativas na resposta instrumental e nos valores de DPR, que foram inferiores a 1%, em todos os casos (**Tabela 14**). Quando o comprimento de onda foi alterado para 215

nm, o DPR foi de 0,16% para o citrato de colina e 0,14% para a acetilmetionina. Quando a composição da fase móvel foi alterada para 25 mM de tampão fosfato de potássio pH 5,7, ajustado com ácido fosfórico 10% , acetonitrila e metanol (89:8:3, v/v/v), o DPR foi de 0,86% e 0,11% para o citrato de colina e acetilmetionina, respectivamente. Todos os resultados obtidos no ensaio de robustez foram semelhantes aos da condição inicial. Assim, o método proposto pode ser considerado confiável e robusto.

6.2 Eletroforese capilar

Utilizou-se a técnica de eletroforese capilar (EC) para o desenvolvimento de metodologia para quantificação da acetilmetionina. Pela EC não foi possível quantificar simultaneamente os dois fármacos. Foram testados diferentes eletrólitos na tentativa de obter-se a determinação simultânea, mas não foram encontradas condições em que ocorresse a separação de dois picos, correspondentes aos dois fármacos. Entre os eletrólitos testados, um tornou possível a quantificação da acetilmetionina.

Foram testados os seguintes eletrólitos na tentativa de separar e quantificar simultaneamente o citrato de colina e a acetilmetionina ou, a determinação do citrato de colina isoladamente. Para cada eletrólito foram realizadas variações nas condições propostas como pH, concentração do eletrólito, voltagem, comprimento de onda e temperatura na tentativa de se obterem resultados satisfatórios.

- Imidazol 20 mM, 0,5 psi, +15 kV, coluna de sílica de 75 μ m x 50 cm, 200 nm a 25°C.
- Dodecilsulfato de sódio 30 mM + tetraborato de sódio 10 mM, 0,5 psi, +15 kV, coluna de sílica de 75 μ m x 50 cm, 200 nm a 25°C.
- Dodecilsulfato de sódio 20 mM + tetraborato de sódio 20 mM, 0,5 psi, +15 kV, coluna de sílica de 75 μ m x 50 cm, 200 nm a 25°C.
- Histidina 20 mM, 0,5 psi, +15 kV, coluna de sílica de 75 μ m x 50 cm, 200 nm a 25°C.
- Imidazol 5 mM + tetraborato de sódio 20 mM, 0,5 psi, +25 kV, coluna de sílica de 75 μ m x 50 cm, 200 nm a 25°C.
- Fosfato de sódio 20 mM, 0,5 psi, +25 kV, coluna de sílica de 75 μ m x 50 cm, 200 nm a 25°C.

- Fosfato de sódio 20 mM + trietanolamina 10 mM, 0,5 psi, +25 kV, coluna de sílica de 75 μ m x 50 cm, 200 nm a 25°C.
- Imidazol 10 mM + dodecilsulfato de sódio 30 mM + tetraborato de sódio 10 mM, 0,5 psi, +25 kV, coluna de sílica de 75 μ m x 50 cm, 200 nm a 25°C.
- Microemulsão: Butanol 1,2%, dodecilsulfato de sódio 0,5%, acetato de etila 0,5%, imidazol 5 mM, tetraborato de sódio 25 mM, 0,5 psi, +25 kV, coluna de sílica de 75 μ m x 50 cm, 200 nm a 25°C.
- β ciclodextrina 1%, 0,5 psi, +25 kV, coluna de sílica de 75 μ m x 50 cm, 200 nm a 25°C.
- Imidazol 10 mM + β ciclodextrina 1%, 0,5 psi, +25 kV, coluna de sílica de 75 μ m x 50 cm, 200 nm a 25°C.
- Imidazol 15 mM + β ciclodextrina 1% + dodecilsulfato de sódio 20 mM, 0,5 psi, +25 kV, coluna de sílica de 75 μ m x 50 cm, 200 nm a 25°C.
- Ácido 3- ciclohexilamino-1- propanossulfônico 20mM, 0,5 psi, +25 kV, coluna de sílica de 75 μ m x 50 cm, 200 nm a 25°C.
- Brometo de hexadeciltrimetilamônio 50 mM + 15% Metanol, 0,5 psi, +25 kV, coluna de sílica de 75 μ m x 50 cm, 200 nm a 25°C.
- Lauril éter de polioxietileno (23) Brij 35® 1% + Fosfato de sódio monobásico monohidratado 1%, 0,5 psi, +25 kV, coluna de sílica de 75 μ m x 50 cm, 200 nm a 25°C.

Para quantificação de acetilmetionina uma metodologia simples, rápida e de baixo custo foi possível pela utilização de eletrólito constituído por tampão de tetraborato de sódio 20 mM pH 9,2. Foram testados diferentes pHs, mas o que apresentou melhor resposta foi o no pH de 9,2. As condições estabelecidas foram: comprimento de onda, 200 nm, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi por 5 segundos, capilar de sílica fundida de 40,2 cm sendo 30 cm efetivos, 75 μ m de diâmetro interno, voltagem de + 25 kV e temperatura 20°C.

O comprimento de onda de 200 nm foi escolhido, pois dentre os testados foi o que proporcionou os melhores resultados dando origem a um pico com boa resolução. O tempo de retenção de 1,908 min é adequado para análises de rotina

A concentração de 0,100 mg/mL de acetilmetionina foi utilizada, pois é a que apresenta-se dentro da faixa de linearidade, obedecendo a lei de Lambert-Beer e está acima do limite de detecção 0,007 mg/mL e do limite de quantificação 0,020

mg/mL. Para o cálculo dos limites de quantificação e de detecção utilizaram-se os parâmetros da curva analítica.

As soluções analisadas foram diluídas em água ultrapura. Foram testados diferentes solventes, inclusive o eletrólito e observou-se que a resposta com a água ultrapura foi melhor em relação aos outros solventes, além de ser um solvente econômico e não é tóxico ao meio ambiente e ao analista. Como os fármacos são facilmente solúveis em água ultrapura, a escolha se justifica.

Foram testados outros eletrólitos, mas o que possibilitou a quantificação da acetilmetionina sem a interferência do citrato de colina de forma seletiva e com uma boa resolução do pico, foi o tampão tetraborato de sódio 20 mM pH 9,2.

Para a validação do método analítico por EC foi realizado o ensaio de seletividade, cujos resultados estão apresentados na **Figura 10**. Observa-se que os excipientes não interferem na quantificação da acetilmetionina.

Construiu-se a curva analítica traçando-se a área do pico versus a concentração. O coeficiente de correlação foi de 0,9996 para a acetilmetionina. A curva foi traçada na concentração de 0,080 – 0,120 mg/mL conforme range descrito no ICH (2005).

Foi realizado o teste F para a regressão linear onde o valor obtido foi muito maior que 10 vezes em relação ao valor tabelado (6,39), conclui-se, assim proporção linear e validade da regressão linear para o nível de confiança selecionado.

Os resultados do teste de adequabilidade do sistema podem ser observados na **Tabela 17**. Pelos valores obtidos verificou-se uma boa resolução e repetibilidade do sistema, o que garante a confiabilidade na utilização do sistema e de seus resultados. O DPR, que foi inferior a 2%, assegura que o sistema está adequado para a realização dos testes de validação.

A repetibilidade foi expressa pelo DPR e os resultados podem ser observados na **Tabela 18**. Obteve-se um DPR foi inferior a 5%, o que demonstra que o método apresenta boa repetibilidade.

Na **Tabela 18** podem ser observados os resultados obtidos na precisão intermediária. O DPR é inferior a 2%, o que assegura a precisão do método.

Procedeu-se a análise da exatidão em três níveis de concentração. A recuperação média encontrada foi de 99,31%, conforme pode ser visto na **Tabela 19**. Os valores encontrados demonstram que o método é exato, pois a porcentagem de recuperação está dentro da faixa de 98-102% do valor teórico (Jenke, 1996, Bliesner, 2006).

Os resultados do teste de hidrólise podem ser observados na **Tabela 20** e nas **Figuras 12, 13, 14 e 15**. Constatou-se que na exposição em meio neutro, o tempo de retenção não variou, mas ocorreu degradação de 10,1% na amostra, o que pode ser verificado na mesma **Tabela 20**. Após exposição em meio oxidante observou-se que houve a degradação do fármaco de 17,14%. Após exposição em meio ácido não foi observada degradação significativa da acetilmetionina. No entanto, após exposição em meio alcalino houve degradação de 12,88% e uma pequena variação no tempo de retenção.

Para avaliar a robustez do método, mudanças deliberadas nos parâmetros de análise foram realizadas. Não foram observadas alterações significativas na resposta instrumental e nos valores de DPR, que foram inferiores a 2%. Quando a voltagem foi mudada para + 23 kV, o tempo de retenção da acetilmetionina foi de 2,092 min. Mudando-se para + 27 kV, o tempo encontrado foi de 1,721 min. Quando o pH do eletrólito foi alterada para 9,0, o tempo de retenção encontrado foi de 1,867 min e o pico não apresentou boa resolução. Com o pH de 9,4, o tempo de retenção encontrado foi de 1,917 e o pico da acetilmetionina também não apresentou boa assimetria.

6.3 CLAE e EC para determinação quantitativa de acetilmetionina

Pela comparação estatística entre os dois métodos para determinação de acetilmetionina por CLAE e EC, observa-se que o valor do DPR encontrado foi inferior a 2%.

Os resultados encontrados no teste F ($F_{\text{tabelado}} > F_{\text{encontrado}}$) e o teste t student's onde ($t_{\text{tabelado}} > t_{\text{encontrado}}$) demonstram que não existem diferenças significativas entre os dois métodos propostos. (**Tabela 22**).

7. CONCLUSÃO

Considerando a revisão da literatura e os resultados experimentais obtidos, conclui-se que:

- Os métodos propostos para determinação quantitativa de citrato de colina e acetilmetionina em soluções injetáveis são simples, rápidos, eficientes e econômicos quando comparados aos métodos descritos na literatura;
- Os excipientes das amostras comerciais não interferem nas análises, o que demonstra que os métodos são seletivos;
- Os métodos propostos apresentam vantagens quando comparados com os descritos na literatura, visto que utilizam reagentes de baixo custo, são simples e rápidos;
- A CLAE possibilitou a separação e a determinação quantitativa simultânea dos dois fármacos em soluções injetáveis;
- A EC, nas condições testadas, não possibilitou a determinação simultânea dos dois fármacos em soluções injetáveis;
- Não foi encontrado na literatura método descrito para a determinação simultânea de citrato de colina e de acetilmetionina por CLAE.
- Estatisticamente não existem diferenças significativas entre os dois métodos;
- Os métodos podem ser utilizados em laboratórios de controle de qualidade para análise de rotina de acetilmetionina e do citrato de colina em soluções injetáveis comercializadas no Brasil.

8. REFERÊNCIAS ¹

ANDRIEX, P.; KILINC, T.; PERRIN, C.; CAMPOS-GIMÉNEZ, E. Simultaneous determination of free carnitine and total choline by chromatography/ mass spectrometry in infant formula and health-care products: single-laboratory validation. **Journal of AOAC International**, v.91, n.4, p.777-785, 2008.

BLIESNER, D.M. **Validating chromatographic methods**: practical guide. Hoboken: John Wiley, 2006. 285p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Resolução RDC n.17, de 16 de abril de 2010**. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0017_16_04_2010.html. Acesso em: 22 jun. 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Resolução RE n.899, de 29 de maio de 2003**. Determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acesso em: 22 jun. 2010.

CARREIRA, R.L.; BARBOSA, C.M.S.; SILVESTRE, M.K.C.; MOTTA, S.; JUNQUEIRA, R.G.; MOTTA, S.; SILVESTRE, M.P.C. Emprego de cromatografia líquida de alta eficiência hidrolítica na determinação dos aminoácidos de hidrolisados de caseína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, p.229-232, 2002.

CARTER, N.; TRENNERY, V.C. The determination of choline in vitamin preparations, infant formula and selected foods by capillary zone electrophoresis with indirect ultraviolet detection. **Electrophoresis**, v.17, n.10, p.1622-1626, 1996.

CHERNOV'YANTS, M.S.; SIMONYAN, S.S. Electrophoretic separation and quantitative determination of halides and iodohalides of the choline series. **Journal of Analytical Chemistry**, v.59, p.571-572, 2004.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2.ed. São Paulo: Siqueira, 1959. v.1, p.221-222.

FARMACOPÉIA Brasileira. 3.ed. São Paulo: Organização Andrei, 1977. v.1, p.73-74.

HANKO, V.P.; HECKENBERG, A.; ROHRER, J.S. Determination of amino acids in cell culture and fermentation broth media using anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection. **Journal of Biomolecular Techniques: JBT**, v.15, n.4, p.317-324, 2004.

---

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023

HAYES, R.D.; BEACH, J.R.; RUTHEFORD, D.M.; SIM, M.R. Stability of methacholine chloride solutions under different storage conditions over a 9 month period. **European Respiratory Journal**, v.11, p.946-948, 1998.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. **Guidance for industry: ICH-Q2R1: Validation of analytical procedures**: methodology for validation of analytical methods. 2005. Disponível em: <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>. Acesso em: 22 jun. 2010.

KLICK, S.; MUIJSELAAR, P.G.; WATERVAL, J.; EICHINGER, T.; KORN, C.; GERDING, T.K.; DEBETS, A.J.; GRIEND, C.S.; BELD, C.V.D.; SOMSEN, G.W.; DE JONG, G.J. Stress testing of drug substances and drug products. **Pharmaceutical Technology**, p.48-66, fev. 2005. Disponível em: <http://pharmtech.findpharma.com/pharmtech/data/articlestandard//pharmtech/072005/146294/article.pdf>. Acesso em: 22 jun. 2010.

JENKE, D.R. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. II. Guidelines for primary validation parameters. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.19, n.5, p.737-757, 1996.

LANÇAS, F.M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: Rima, 2004. 46 pag (Métodos cromatográficos de análise, 6).

LEITE, F. **Validação em análise química**: conceitos, repê, reprô, estatística, calibrações. 4.ed. Campinas: Átomo, 2002. 278p.

MARTIN-SHIMITH, M.; RUDD, D.R. The importance of proper validation of the analytical methods employed in the quality control of pharmaceuticals. **Acta Pharmaceutica Jugoslavica**, v.40, n.1/2, p.7-19, 1990.

MERCK Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 14.ed. Withehouse Station, Merck, 2006. p.17, 367.

AQINO NETO, F.R.; NUNES, D.S.S. **Cromatografia**: princípios básicos e técnicas afins. Rio de Janeiro: Interciência, 2003. 187p.

PIMENTEL, M.F.; NETO, B.B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v.19, n.3, p.268-277, 1996.

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

SANTORO, M.I.R.M.; PRADO, M.S.A.; STEPPE, M.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M. Eletroforese capilar: teoria e aplicações na análise de medicamentos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.36, p.97-110, 2000.

SANTORO, M.I.R.M. **Introdução ao controle de qualidade de medicamentos**. São Paulo: Atheneu, Editora da USP, 1988. 122p.

TUMA, P.; SAMCOVÁ, E.; ANDELOVÁ, K. Determination of free amino acids and related compounds in amniotic fluid by capillary eletrophoresis with contactless conductivity detectation. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.839, n.1/2, p.12-18, 2006.

UNITED States Pharmacopeia. 33.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2010. v.1, p.773-777.

VICENTE, I.S.; ROMERO, J.J.; MARCOS, S.; OSTRÁ, M.; UBIDE, C.; GALBÁN, J. Simultaneous determination of glucose and choline based on the intrinsic fluorescence of the enzymes. **Journal of Fluorescence**, v.19, p.583-591, 2009.

ZHANG, J.; ZHU, Y. Determination of betaine, choline and trimethylamine in feed additive by ion-exchange liquid chromatography/ non-suppressed conductivity detection. **Journal Chromatography, A**, v.1170, p.114-117, 2007.

ZHANG, L.; LIU, Y.; CHEN, G. Simultaneous determination of allantoin, choline and L-arginine in *Rhizoma dioscoreae* by capillary eletrophoresis. **Journal Chromatography, A**, v.1043, p.317-321, 2004.

ZINELLU, A.; SOTGIA, S.; USAI, M.F.; ZINELLU, E.; POSADINO, A.M.; GASPA, L.; CHESSA, L.; PINNA, A.; CARTA, F.; DEIANA L.; CARRU, C. Plasma methionine determination by capillary electrophoresis–UV assay: application on patients affected by retinal venous occlusive disease. **Analytical Biochemistry**, v.363, p.91-96, 2007.

ANEXOS

- Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9139 - 6522222/2 - Grazielle Prado Alexandre

Email: grazialexandre@usp.br
Data de Nascimento: 01/04/1980
Local de Nascimento: Estado de Minas Gerais
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico Industrial - Universidade José do Rosário Vellano - Minas Gerais - Brasil - 2003

Curso: Mestrado
Programa: Fármaco e Medicamentos
Área: Produção e Controle Farmacêuticos
Data de Matrícula: 02/02/2009
Início da Contagem de Prazo: 10/09/2008
Data Limite: 10/03/2011
Orientador: Prof(a). Dr(a). Maria Ines Rocha Miritello Santoro - 02/02/2009 até o presente. E.Mail: ines@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 21/10/2010
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 20/08/2010

Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:

Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:

Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:

Histórico de Ocorrências: Ingressou no Mestrado em 02/02/2009
 Matrícula de Acompanhamento em 25/07/2010

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 25/07/2010

Impresso em: 24/11/10 20:19:17

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9139 - 6522222/2 - Grazielle Prado Alexandre

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5778-1/2	Biofarmacotécnica: Estudo de Permeabilidade de Fármacos (1)	10/09/2008	21/10/2008	60	4	100	A	N	Concluída
FBF5706-6/2	Preparação e Emprego de Padrões Farmacêuticos (1)	05/11/2008	16/12/2008	60	4	83	A	N	Concluída
FBF5777-2/1	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos	16/03/2009	28/06/2009	45	3	90	A	N	Concluída
EDM5071-1/1	Trabalho e Profissionalização Docente no Brasil: Imagens e Representações (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	21/08/2009	30/11/2009	120	8	92	A	N	Concluída
FBT5737-6/1	Tecnologia de Síntese de Fármacos	17/09/2009	03/12/2009	90	6	90	A	N	Concluída
FBC5813-2/2	Aplicações de Cromatografia em Análises Toxicológicas	16/11/2009	20/12/2009	60	0	0	-	N	Turma cancelada

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	25	25	25
Atividades Programadas:			
Seminários:			
Estágios:			
Total:	25	25	25

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Observações:

1) Disciplina(s) cursada(s) isoladamente e aceita(s) pelo(a) orientador(a) do(a) candidato(a).

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 25/07/2010

Impresso em: 24/11/10 20:19:17

Grazielle Prado Alexandre

Graduação em Farmácia Industrial pela Universidade José do Rosário Vellano. Iniciação científica na área de Controle de Qualidade Microbiológico. Pós-graduação em Química pela Universidade Federal de Lavras. Experiência em indústrias na área de Controle de Qualidade e Produção.

(Texto informado pelo autor)

Última atualização do currículo em 22/11/2010

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/7372722253543662>

Dados pessoais

Nome Grazielle Prado Alexandre

Nome em citações bibliográficas ALEXANDRE, G. P.

Sexo Feminino

Endereço profissional Universidade de São Paulo.
Av. Professor Lineu Prestes, 580
Butantã
05315-970 - Sao Paulo, SP - Brasil
Telefone: (011) 30913655 Ramal: 3655

Formação acadêmica/Titulação

- 2009** Mestrado em andamento em Fármacos e Medicamentos (Conceito CAPES 5) .
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Validação de métodos para análise de citrato de colina e acetilmetionina em soluções injetáveis por cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar,
Orientador: Prof^a. Titular Maria Inês Rocha Miritello Santoro.
Grande área: Ciências da Saúde / *Área:* Farmácia.
Grande área: Ciências da Saúde / *Área:* Farmácia / *Subárea:* Análise e Controle de Medicamentos.
Setores de atividade: Saúde e Serviços Sociais.
- 2006 - 2008** Especialização em Pós-graduação em química. (Carga Horária: 450h).
Universidade Federal de Lavras, UFLA, Brasil.
Título: Desenvolvimento e Validação da Metodologia de doseamento por Cromatografia Líquida de Febantel em comprimidos.
Orientador: Mário César Guerreiro.
- 1999 - 2003** Graduação em Farmácia Industrial.
Universidade José do Rosário Vellano -Alfenas.
- 1996 - 1997** Curso técnico/profissionalizante.
Escola Estadual Dr. Emílio da Silveira.

Atuação profissional

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, HCFMUSP, Brasil.

Vínculo institucional

2010 - Atual Vínculo: Servidor Público, Enquadramento Funcional: Farmacêutico. Carga horária: 36

Jofadel Indústria Farmacêutica, JOFADEL, Brasil.

Vínculo institucional

2006 - 2009 Vínculo: Celetista formal, Enquadramento Funcional: Gerente do Controle de Qualidade, Carga horária: 44.

Outras informações Supervisão das atividades do Controle de Qualidade, análises de rotina, desenvolvimento e validação de metodologia analítica, validação de limpeza e validação do sistema de água. Controle de Reagentes Controlados, envio do relatório mensal aos órgãos fiscalizadores e responsável pela documentação frente aos mesmos. Elaboração de Procedimento Operacional Padrão.

Drogaria Cidade Nova, DROGARIA, Brasil.

Vínculo institucional

2005 - 2006 Vínculo: Celetista formal, Enquadramento Funcional: Farmacêutica Responsável, Carga horária: 44.

Cimed Indústria Farmacêutica, INDÚSTRIA, Brasil.

Vínculo institucional

2003 - 2005 Vínculo: Celetista formal, Enquadramento Funcional: Analista do Controle de Qualidade, Carga horária: 44.

Outras informações Analista de matéria-prima e produto acabado. Análises por Cromatografia Líquida. Preparo e Padronização de reagentes. Análises de Dissolução.

*Áreas de atuação**Idiomas*

Inglês Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

Espanhol Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Pouco.

Produção bibliográfica**Apresentações de Trabalho**

1. ★ ALEXANDRE, G. P; SANTORO, M. I. Simultaneous determination of choline citrate and acetylmethionine in injectables solutions by high performance liquid chromatography. 2010. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
2. ★ ALEXANDRE, G. P; COSTA, M. R. Avaliação da eficácia do sistema conservante em xampus. 2002. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Eventos**Participação em eventos**

1. I Simpósio de Farmácia Clínica. 2010.
2. Palestra "Monitoramento de medicamentos de baixo índice terapeutico". 2009.
3. Workshop "Desenvolvimento de métodos analíticos por HPLC U.S. Pharmacopeiae Febrafarma". 2007.
4. Treinamento em operação do cromatógrafo Líquido Shimatzu série LC- 20A. 2007.
5. Curso "Fundamentos em cromatografia com ênfase em HPLC". 2007.
6. Curso "Validação em análises químicas". 2007.

September 20th, 2010

Maria Santoro

Faculty of Pharmaceutical Sciences - University of São Paulo (ines@usp.br)

Manuscript Identification Number: LAJP 2363-10

Dear author:

I am glad to inform you that your article '**Simultaneous determination of choline citrate and acetylmethionine in injectable solutions by high performance liquid chromatography**' by *Grazielle Prado Alexandre, María Segunda Aurora-Prado, Erika Rosa Maria Kedor-Hackmann, Anil Kumar Singh, Maria Inês Rocha Miritello Santoro* has been accepted for publication in Latin American Journal of Pharmacy. In due moment you will receive the page proof consigning the issue where your article will be included.

Many thanks for your interest in our journal.

Reviewer's comments:

The new version is suitable for publication. Figs 1 and 2 were joined as Fig 1A and B.

Yours sincerely,

Prof. Néstor O. Caffini, Editor
Latin American Journal of Pharmacy
E-mail: caffini@biol.unlp.edu.ar