

# **DETERMINAÇÃO DOS INTERFERENTES SOBRE A ROBUSTEZ E DEFINIÇÃO DA TAXA DE RECUPERAÇÃO DO PADRÃO DE 25(OH)D3 VISANDO À ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) (APOIO UNIP)**

**Aluno:** Igor Suares Bretas

**Orientador:** Prof. Dr. Luiz Carlos Martins das Neves

**Curso:** Biomedicina

**Campus:** Cidade Universitária / Marginal Pinheiros

Hidroxicolecalciferol, também conhecido como 25-hidroxi-vitamina D, [25(OH)D3] é um pré-hormônio esteroide, produzido pela hidroxilação da vitamina D, bastante conhecido por ter como uma das suas principais funções a relacionada à manutenção da homeostase de cálcio com auxílio de outros órgãos. Porém, além dessa importante ajuda, ultimamente tem-se ligado sua metabolização a algumas doenças, incluindo a interação com o sistema imunológico. Sua principal fonte de produção é endógena sendo também produzido, de forma menos eficaz, cerca de 20% pela dieta. Visando estabelecer um método cromatográfico validado, confiável e capaz de determinar a concentração de 25(OH)D3 em pacientes com deficiência na capacidade de metabolização de vitamina D, este projeto pretendeu estabelecer uma análise da robustez e definir a taxa de recuperação alcançada para o método com a metodologia de adição de padrão (200 ng/mL) a amostras de soro. Para tanto, a robustez e a taxa de recuperação foram definidas empregando padrão analítico de 25(OH)D3 (Sigma-Aldrich®) em todos os testes realizados. Ensaios preliminares indicaram a necessidade de definição rigorosa de procedimentos operacionais para as etapas de lavagem, preparo e esterilização de materiais, bem como limpeza do equipamento analítico. A robustez foi determinada a partir da análise de um padrão de 25(OH)D3 (200ng/mL), em quintuplicata, da influência da vazão (0.8mL/min, 1.0mL/min e 1.2mL/min), temperatura (35°C, 38°C, 40°C, 42°C e 45°C) e grau de pureza dos solventes utilizados (acetonitrila, água e metanol). Os resultados

obtidos indicaram que as análises apresentaram variação ao empregar solventes orgânicos não filtrados, em vazão diferente da estabelecida como ideal (1,0 mL/min) e ao empregar temperaturas superiores a 42°C. Mantidas as condições adequadas de análise, a recuperação foi de 96,1% com a determinação de um teor de 25(OH)D3 correspondente a  $164,26 \pm 5,23$  ng/mL. A avaliação estatística realizada para a aplicação em quintuplicata de amostras, após a definição dos procedimentos operacionais e das limitações do método, resultou em coeficiente de variação igual a 3,2%, indicando precisão adequada e erro relativo igual a 14,5% e necessidade de futuras adequações à metodologia analítica para que se obtenha uma exatidão maior entre o teor detectado pela análise cromatográfica e o valor real presente nas amostras.