

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

**TRANSFERÊNCIA DE MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC
PARA UPLC PARA QUANTIFICAÇÃO DE FLAVANONAS
TOTAIS EM DIFERENTES MATRIZES BIOLÓGICAS**

Maria Julia Lima Viviani

Araraquara-SP

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

**TRANSFERÊNCIA DE MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA
UPLC PARA QUANTIFICAÇÃO DE FLAVANONAS TOTAIS EM
DIFERENTES MATRIZES BIOLÓGICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Araraquara, da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, para a obtenção do grau
de Farmacêutica-Bioquímica.

Maria Julia Lima Viviani
Graduanda
Prof.^a Dr.^a Thaís Borges César
Orientadora
Mestre Melaine Fidélis
Coorientadora

ARARAQUARA - SP

2017

Agradecimentos

Aos meus pais, Leticia e Tales, por sempre terem me encorajado e apoiado em todas as decisões, por me fornecerem todas as condições para trilhar a jornada acadêmica. Muito obrigada pelo apoio durante todos esses anos e dedico essa conquista a vocês.

À minha irmã, Helena, por todo o incentivo, amizade, companhia e amparo em todos os momentos.

Ao meu namorado, Victor, que caminhou ao meu lado durante essa jornada. Obrigada por me inspirar a buscar o melhor de mim e por me ensinar que sempre podemos alcançar tudo o que sonhamos se batalharmos muito para isso. Obrigada por me trazer paz e felicidade.

Às amigas, Leticia e Taísa, melhores amigas da faculdade que foram meu alicerce e braço direito durante os últimos seis anos. Muito obrigada pelas horas de estudo, pelos conselhos, pelo apoio e incentivo, pelos ensinamentos e por serem umas das melhores pessoas que conheço.

Ao Projeto Ciência Viva do Centro de Ciências de Araraquara – UNESP (CCA) que me proporcionou experiências incríveis ao longo de dois anos dedicados às atividades de monitoria. Em especial para os amigos Carla, Lu, Isabela, Rafael, Nicole, Rafaela, Marcos, Carol e aos tutores José Antonio Maruyama e Camila Silveira da Silva.

Aos colegas de faculdade membros da All Pharma Júnior, em especial para Leandro, Isabela, Ayumi e Alexandre pelo incentivo, acolhimento, união e determinação em todas as atividades e momentos compartilhados na diretoria de Marketing.

Aos colegas de faculdade Débora, Celina, Gabrielle e tantas outras pessoas que compartilharam e me ajudaram nessa jornada.

Às queridas irmãs de intercâmbio, Lia, Fernanda, Winnie e Mariana por todos os momentos de alegria, ensinamentos e união durante a morada em Leicester – Inglaterra.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Thais Borges César e minha coorientadora Mestre Melaine Fidélis, pelo acolhimento no seu grupo de pesquisa, pelos grandes ensinamentos no laboratório e pela oportunidade de desenvolver esse trabalho científico.

À Ana Lúcia Nasser Martiniano Nasser, ex-funcionária do Departamento de Alimentos e Nutrição pelos ensinamentos, pela paciência e pela dedicação durante o desenvolvimento desse trabalho.

“Reconhecer a verdade como verdade, e ao mesmo tempo como erro; viver os contrários, não os aceitando; sentir tudo de todas as maneiras, e não ser nada, no fim, senão o entendimento de tudo (...).”

Fernando Pessoa

Resumo

O consumo crônico de suco de laranja está relacionado a efeitos benéficos à saúde, estando principalmente associados com as flavanonas cítricas tais como hesperidina e naringina, que são degradadas na forma aglicona em hesperitina e naringenina, respectivamente por enterobactérias no intestino delgado. Alguns estudos sugerem que o consumo moderado de polifenóis de suco de laranja pode atuar modulando a microbiota intestinal exercendo efeito prébiótico, aumentando a biodisponibilidade das flavanonas e seus metabólitos. A cromatografia tornou-se no primeiro método de separação de espécies quimicamente muito semelhantes. Neste contexto, a aplicação da cromatografia líquida na quantificação de marcadores biológicos vem ganhando destaque. Este trabalho teve como objetivo realizar a transferência do método analítico por HPLC de quantificação de flavanonas totais em amostras de sangue e urina humanos desenvolvido por Kanaze et al (2004) para UPLC. Para isso, foi realizada avaliação das condições cromatográficas e dos parâmetros bioanalíticos da metodologia para quantificação de flavanonas totais em amostras biológicas. A preparação das amostras envolveu a hidrólise e extração das flavanonas cítricas de amostras biológicas previamente incubadas com a enzima β -glucuronidases/sulfatase. A metodologia se mostrou linear no intervalo de concentração 2,5 - 60 $\mu\text{g/mL}$ para naringenina ($R^2=0,9999$) e hesperetina ($R^2=0,9998$). A exatidão do método foi 99,3% para amostras de sangue e 98% para amostras de urina, enquanto a precisão para amostras de sangue variou de 0,23-1,91% para naringenina e de 0,26-1,17% para hesperitina enquanto que para amostras de urina as variações foram 0,42-1,62% e 0,47-2,51%, respectivamente. O método bioanalítico apresentou limites de confiança adequados para quantificação das substâncias de interesse.

Palavras-chave: flavanona, hesperitina, naringenina, método bioanalítico, UPLC.

Lista de abreviaturas

CG- Cromatografia Gasosa

CL- Cromatografia Líquida

CLAE- Cromatografia Líquida de Alta Pressão

EM- Espectrometria de Massas

FDA – Food and Drug Administration

HPLC- High Pressure Liquid Chromatography

HSP- hesperitina

Nm- nanômetro

NRG- naringenina

PI- Padrão Interno

PM- Peso molecular

PTFE- Politetrafluoretileno

RSD- Desvio padrão relativo

U- Unidade

UPLC- Ultra Pressure Liquid Chromatography

UV-Vis – Ultravioleta-visível

λ - Comprimento de onda

Lista de Ilustrações

Figura 1. Equação matemática da precisão.	12
Figura 2. Equação matemática da exatidão.	13
Figura 3. Estruturas químicas das flavanonas cítricas naringina e hesperidina (glicosídeos) e suas correspondentes agliconas naringenina e hesperetina e 7-etoxocumarina (PI).	16
Figura 4. Curva bioanalítica construída para NRG	27
Figura 5. Curva bioanalítica construída para HSP	27
Figura 6. Cromatograma em 288nm demonstrando o parâmetro seletividade.	30

Lista de Tabelas

Tabela 1. Condições cromatográficas de HPLC desenvolvidas por Kanaze et al (2004).....	21
Tabela 2. Condições cromatográficas de UPLC propostas para transferência analítica.....	22
Tabela 3. Tempos de eluição das substâncias de interesse no método HPLC versus a transferência proposta para UPLC.....	26
Tabela 4. Precisão e exatidão intra e inter-dia para naringenina e hesperitina em amostras de sangue incubadas com a enzima β -glucuronidase/sulfatase.....	28
Tabela 5. Precisão e exatidão intra e inter-dia para naringenina e hesperitina em amostras de urina incubadas com a enzima β -glucuronidase/sulfatase.	28

Sumário

1. Introdução	10
1.1 Princípios da cromatografia	10
1.2 Desenvolvimento e validação de metodologia bioanalítica	11
1.3 Transferência de metodologia bioanalítica	14
1.4 Flavanonas e o suco de laranja.....	14
1.5 Matrizes biológicas	15
2. Objetivos	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3. Materiais	18
3.1 Soluções padrões, soluções tampões, solventes, enzima, dispositivo, filtro e matriz biológica.....	18
3.2 Equipamentos.....	18
4. Métodos	20
4.1 Preparo das amostras.....	20
4.1.1 Plasma.....	20
4.1.2 Urina.....	20
4.2 Transferência do método bioanalítico	21
4.3 Parâmetros bioanalíticos	22
4.3.1 Linearidade	22
4.3.2 Precisão e Exatidão	22
4.3.4 Seletividade	23
5. Resultados e Discussão	24
5.1 Transferência do método bioanalítico	24
5.2 Curva de calibração	26
5.3 Precisão/exatidão	27
5.4 Seletividade	29
5.5 Limite inferior de detecção	30
5.6 Estabilidade	30
6. Conclusão	31
7. Bibliografia	32
ANEXOS	36

1. Introdução

1.1 Princípios da cromatografia

A cromatografia é uma técnica analítica de separação baseada no processo de migração de componentes no meio de uma fase móvel e uma fase estacionária. As interações físico-químicas entre os componentes, pertencentes a uma amostra, e as fases determinam a variação do deslocamento e a velocidade com que o fenômeno ocorre. A possibilidade de combinar diversas fases móveis, em concentrações variadas, com fases estacionárias de diferentes polaridades torna essa técnica extremamente versátil e aplicável para análises tanto qualitativas quanto quantitativas. (LOUGH, W.J. e WAINER, I.W, 1995).

O primeiro estudo publicado sobre cromatografia data de 1903 por um botânico russo, que buscava separação de pigmentos extraídos de folhas para estudar a clorofila e xantofila presente nos vegetais. Em sua experiência, o pesquisador preparou uma coluna preenchida com carbonato de cálcio na qual colocou um extrato de solventes de folhas seguido pela passagem de um solvente puro permitindo assim, que o extrato percorresse toda extensão da coluna pela força da gravidade. A conclusão do pesquisador foi que os pigmentos que ficaram mais tempo na coluna apresentavam maior interação com a fase estacionária (material adsorvente) ao passo que os pigmentos que percorreram mais rapidamente a coluna apresentavam maior interação com a fase móvel (solvente puro) desta forma, cada pigmento percorreu a coluna numa velocidade diferente sendo possível separá-los e identificá-los individualmente posteriormente (TSWEET, M., 1903; LANÇAS, 2009).

Ao longo das décadas, as técnicas cromatográficas foram evoluindo seguindo critérios metodológicos como o tipo de suporte, modo de separação, natureza e composição da fase móvel. Em particular, a natureza da fase móvel classifica as duas técnicas mais utilizadas nos últimos anos: a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida (CL). A CG é amplamente empregada na separação de compostos voláteis que são arrastados pelo gás que compõe a fase móvel. Já na CL, a fase móvel é composta por um ou mais líquidos que escoam ao longo da fase estacionária pela força da gravidade (baixa pressão)

ou pela força de uma bomba (alta pressão – HPLC) ;(ultra pressão – UPLC) (PORTO, H.S.M., 2014).

A Cromatografia Líquida De Alta Pressão (CLAE) ou *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC) é considerado o primeiro marco da “CL moderna” que permite maior eficiência na separação, identificação e quantificação de analitos. De forma semelhante, a Cromatografia Líquida de Ultra Pressão ou *Ultra Pressure Liquid Chromatography* (UPLC) foi desenvolvida devido a necessidade de um sistema mais potente de pressão, uma vez que, as partículas que compõe a fase estacionária são menores e apresentam maior grau de empacotamento o que oferece maior resistência à passagem da fase móvel, porém aumenta a performance de separação dos compostos (LANÇAS, 2009).

Um dos principais fatores na instrumentação da cromatografia líquida é o detector do cromatógrafo que é responsável por converter um sinal físico ou químico de uma substância eluída em um sinal elétrico, obtendo-se assim, a concentração do analito. Atualmente, os detectores mais empregados são baseados na região violeta e visível do espectro (UV-Vis); no espalhamento de luz; e no espectrômetro de massas (EM). O detector de escolha deve possuir compatibilidade com a amostra como é observado no caso de algumas substâncias, como por exemplo, flavonoides que apresentam uma unidade estrutural relacionada a transição eletrônica na espectroscopia no UV-Vis chamada grupo cromóforo que é, por sua vez responsável, pela absorção eletrônica (SNYDER, LLOYD and DOLAN, 2007).

1.2 Desenvolvimento e validação de metodologia bioanalítica

A validação de uma metodologia bioanalítica representa documentar, através do uso de investigações laboratoriais específicas, que as características de desempenho de um método desenvolvido são adequadas e confiáveis para as aplicações analíticas pretendidas. Métodos de análise desenvolvidos e validados podem sofrer alterações de acordo com os requisitos do laboratório que realiza o ensaio podendo haver a necessidade de realizar uma validação adicional.

Em 2013, o *Draft Guidance* do *Food and Drug Administration* (FDA) classificou métodos de validação em três níveis. O primeiro nível “Validação

completa” se aplica aos casos de desenvolvimento e implementação de um novo método bioanalítico e para análise de novos fármacos. O segundo nível “Validação parcial” diz respeito a modificações de métodos bioanalíticos previamente validados como, por exemplo, no caso de transferências de métodos bioanalíticos entre laboratórios ou analistas e mudança na metodologia analítica podendo envolver matriz biológica, espécie animal, instrumentos e plataformas de software. O terceiro nível “Validação cruzada” é uma comparação dos parâmetros de validação quando dois ou mais métodos bioanalíticos são usados para gerar dados no mesmo estudo ou em diferentes estudos.

Durante o desenvolvimento e validação de um método bioanalítico os principais parâmetros que podem ser demonstrados são (1) seletividade; (2) precisão, exatidão e recuperação; (3) linearidade; (4) limite inferior de detecção; e (5) estabilidade.

Seletividade

A seletividade corresponde a capacidade de um método analítico diferenciar e quantificar o analito sem interferência de outras substâncias presentes. Deve ser realizada a análise de alíquotas diferentes da mesma matriz pura e não deve haver picos interferentes nos tempos de retenção.

Precisão, exatidão e recuperação

A precisão verifica a proximidade e concordância entre as replicatas analisadas em condições de reprodutibilidade. Normalmente, a precisão é expressa através do desvio padrão relativo (RSD) de várias repetições. É calculado com base na relação entre o desvio padrão absoluto “S” e a média das determinações “X média”.

$$RSD = \frac{S}{X \text{ média}}$$

Figura 1. Equação matemática da precisão.

A exatidão verifica a proximidade do valor encontrado com o valor de referência, ou seja, a concentração nominal podendo ser calculada da seguinte forma:

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{valor quantificado}}{\text{valor real}} \times 100$$

Figura 2. Equação matemática da exatidão.

O cálculo da exatidão consiste na determinação de três leituras a cada uma das três concentrações diferentes definidas pelo método. O valor da exatidão é apresentado sob a forma de percentagem de recuperação.

A recuperação determina relação entre o analito após passar pelo procedimento extrativo e o analito puro em solução em uma concentração conhecida. Essa relação verifica a efetividade da extração adotada. A recuperação não precisa ser de 100%, mas deve ser consistente e precisa.

Linearidade

A linearidade é a capacidade do método de demonstrar a relação de proporcionalidade entre as concentrações do analito e a resposta instrumental. Este parâmetro pode ser avaliado através da realização da curva de calibração e tratamento estatístico. A curva deve apresentar no mínimo seis níveis de concentração e a equação da função deve apresentar um coeficiente de determinação satisfatório, no mínimo 0,98.

Limite inferior de detecção

O Limite inferior de detecção corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis, devendo apresentar uma resposta no mínimo cinco vezes superior a qualquer ruído da amostra branco no tempo de retenção do analito.

Estabilidade

A estabilidade refere-se ao tempo durante o qual as soluções-padrão podem ser utilizadas sem que haja decomposição. O critério de aceitação de uma solução estável é variação de até 10% na concentração do analito em relação à concentração média no tempo zero (quando atinge temperatura ambiente).

1.3 Transferência de metodologia bioanalítica

A transferência ou otimização de um método analítico de HPLC para UPLC é a primeira etapa no desenvolvimento de um novo método bioanalítico que posteriormente necessita ser validado novamente, segundo o FDA. As vantagens dessa transposição analítica envolvem a utilização de um menor volume de solventes na fase móvel, menor volume de amostra e obtenção de resultados em menor tempo. Dessa forma, ao final do processo, os resultados obtidos devem ser idênticos independente se o sistema cromatográfico operar em alta ou ultra pressão. (PORTO, H.S.M., 2014).

Como ponto de partida, existem diversos softwares que sugerem mudanças para um sistema UPLC a partir dos dados iniciais das condições cromatográficas de HPLC. Contudo, a transferência analítica pode ser um processo longo em que diversos parâmetros críticos devem ser avaliados cuidadosamente como o tipo de coluna; fluxo da fase móvel; temperatura da coluna; composição e proporção da fase móvel; volume de injeção (GUILLARME, D. et al, 2007).

1.4 Flavanonas e o suco de laranja

As flavononas são produtos do metabolismo secundário de plantas cítricas e pertencem a classe dos polifenóis. Esses compostos têm sido amplamente investigados devido aos efeitos benéficos como por exemplo atividade antioxidante, anti-inflamatória, efeitos na redução da hipercolesterolemia, da hipertensão e da obesidade (SANTOS *et al*, 2014).

Atribui-se a denominação flavonoides cítricos ao grupo de flavanonas naturalmente presentes em frutas cítricas como a laranja, com destaque, para a naringina e a hesperidina encontradas na forma glicosilada no fruto sendo posteriormente degradadas na forma aglicona no organismo dando origem a naringenina ($pm = 272.256 \text{ g/mol}$) e hesperitina ($pm = 302.282 \text{ g/mol}$) respectivamente. A absorção intestinal, a biodisponibilidade em outros tecidos e a taxa de excreção das flavanonas estão diretamente relacionadas com os efeitos benéficos bem como, a periodicidade do consumo desse tipo de alimento (MANACH *et al*, 2003).

Estima-se que uma dieta rica em frutas cítricas, demais frutas e vegetais proporcione o consumo diário de hesperidina e naringenina estimado em 132 mg/dia e 29 mg/dia, respectivamente (RAMÍREZ e HÜBSCHER, 2011). Por sua vez, no suco de laranja da espécie *Citrus Sinensis* são encontrados aproximadamente 200-590 mg/L de hesperidina e 16-84 mg/L de naringina, sendo também encontradas no fruto *in natura* em proporções similares (BRETT *et al*, 2008). As quantidades de flavanonas podem variar de acordo com a espécie, como por exemplo, a laranja azeda (*Citrus aurantium*) que apresenta 60-340 mg/L de naringina e apenas 0,00-0,047 mg/L de hesperitina (PETERSON *et al*, 2006).

Essas características do fruto e do suco de laranja deixam em evidência a capacidade intrínseca desse alimento ser capaz de fornecer quantidades biologicamente ativas para efeito benéfico na saúde humana.

1.5 Matrizes biológicas

Trabalhos anteriores relatam que após o consumo de uma dose de suco de laranja ou uma porção da própria fruta é possível encontrar produtos do metabolismo das flavanonas no soro e urina humana, sendo também já reportado a presença desses compostos nas fezes de animais tratados com flavanonas isoladas. Como já mencionado, as flavanonas glicosídeas dietéticas são encontradas nas matrizes biológicas na forma de glucoronídeo, sulfatados ou glucuronídeo-sulfatados conjugados como, por exemplo, hesperitina e naringenina devido a presença de enzimas como β -glucosidase e α -rhamnosidase presentes no trato gastro-intestinal, possibilitando assim a absorção desses metabólitos (BRETT *et al*, 2008; UNNO *et al*, 2015).

Apesar de vários métodos de quantificação analíticos seletivos estarem disponíveis, a identificação dos metabólitos conjugados é mais apropriada para sistema de detectores tipo EM sendo que, quando se dispõe somente do sistema de detecção tipo UV a principal alternativa é o tratamento enzimático das amostras para detecção das flavanonas totais. Outro aspecto é que a análise de metabólitos conjugados seria demasiadamente morosa considerando que para cada metabólito haveria a necessidade de definir padrões analíticos como limite de detecção e a elaboração de curva- padrão. Dessa forma, uma estratégia

amplamente empregada é a hidrólise desses compostos conjugados obtendo a forma aglicona do composto (Figura 3). Nesse contexto, a enzima é incubada junto com a amostra biológica sob condições específicas de temperatura, pH e tempo permitindo que opere na faixa de atividade ótima (DING *et al*, 2013).

Diversas pesquisas foram conduzidas para avaliação quantitativa de flavonoides cítricos em amostras biológicas humanas utilizando HPLC com detectores baseados na absorção de luz UV- VIS (FUHR *et al*, 1995; AMEER *et al*, 1996; ISHII *et al*, 1997; CHANG *et al*, 2002; KANAZE *et al*, 2004). Em particular, Kanaze *et al* (2004) foram responsáveis pela validação da metodologia cromatográfica utilizando extração de fase sólida em plasma e urina humanas através da determinação de diversos parâmetros para quantificação de naringenina e hesperetina garantindo desempenho adequado e confiável.

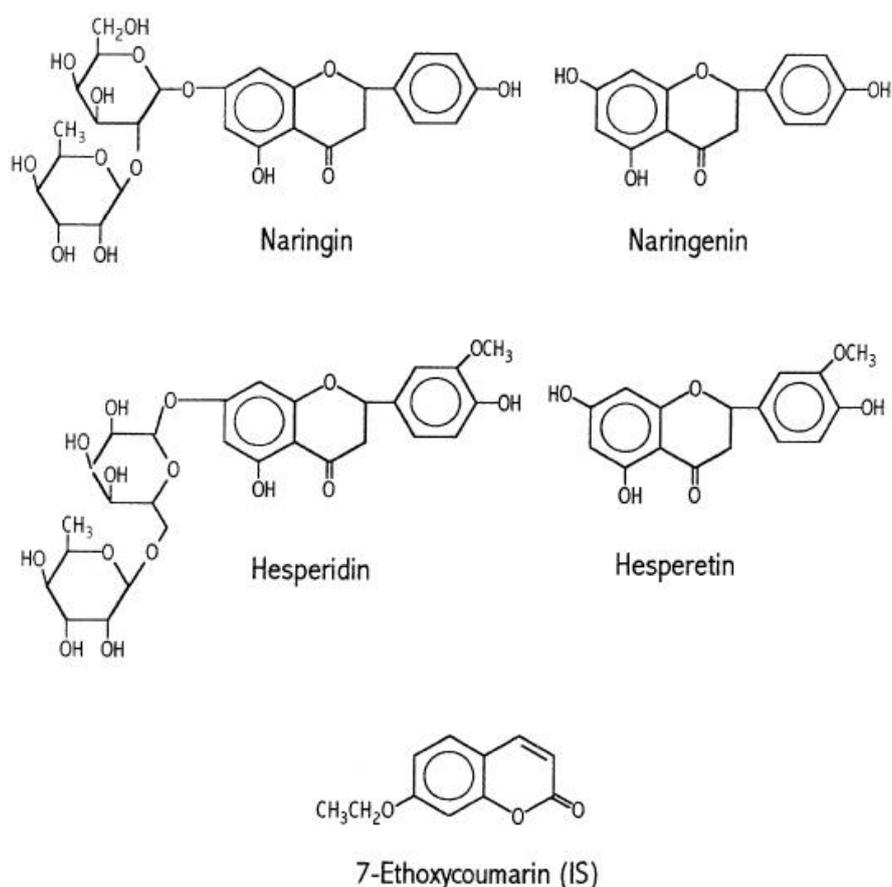


Figura 3. Estruturas químicas das flavanonas cítricas naringina e hesperidina (glicosídeos) e suas correspondentes agliconas naringenina e hesperetina e 7-etoxocumarina (PI).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Transferência do método analítico de HPLC para UPLC para quantificação de flavanonas totais em amostras biológicas de humanos.

2.2 Objetivos específicos

Avaliação dos parâmetros bioanalíticos da metodologia para quantificação de flavanonas totais em amostras de sangue e urina de humanos.

Avaliação da aplicabilidade do método de quantificação de flavanonas totais em amostras de sangue e urina de humanos.

3. Materiais

3.1 Soluções padrões, soluções tampões, solventes, enzima, dispositivo, filtro e matriz biológica

O padrão interno (PI) 7-etoxicumarina e os padrões naringenina e hesperitina utilizados foram obtidos da Sigma-Aldich®. As soluções estoques foram preparadas em metanol na concentração de 400 µg/mL sendo posteriormente diluídas em metanol na concentração de 25 µg/mL e 70 µg/mL para a obtenção das soluções de trabalho do PI nas amostras de plasma e urina respectivamente. Foram realizadas 6 diluições para a curva de calibração dos padrões de naringenina e hesperitina.

O acetado de sódio, fosfato monobásico, ácido clorídrico, ácido ascórbico e metanol (grau HPLC) utilizados foram obtidos da Sigma-Aldich®. As soluções foram preparadas a fim de obter solução tampão acetato de sódio 1 mol/L e pH 5.0; solução tampão fosfato 0,1 mol/L e pH 2,4; solução HCL 0,01 M; solução metanol a 10% em 0,01 M de HCL. A acetonitrila utilizada na extração foi obtido da Sigma-Aldich®.

A enzima β -glucuronidase/Sulfatase (G7017) utilizada para incubação foi adquirida da Sigma-Aldich®. O dispositivo Sep Pak C18 Strata® cartucho de 50 mg/1 mL empregado na extração foi obtido da Phenomenex. Os filtros de seringa de membrana de PTFE, poro 0,22 µm e diâmetro de 13 mm foram adquiridos da Allcrom®. As matrizes biológicas livre de flavanonas, plasma e urina, utilizados foram obtidos de indivíduos adultos que participavam de projeto de pesquisa já em andamento e foram armazenados e congelados a -80°C até o uso.

3.2 Equipamentos

- UPLC Shimadzu;
- Lavadora ultra-sônica digital, SoniClean 2pS, Sanders Medical ;
- Balança analítica, Mettler Toledo;
- Phmetro microprocessado, Quimis®;
- Centrífuga Excelsa Baby I®, Fanem®;

- SpeedVac Concentrator SVC 200H, Savant
- Banho Metabólico com Agitação Reciprocante, tipo Dubnoff, MA093/1C, Marconi
- Manifold a vácuo, Allcrom;
- Sistema Mili Q®

4. Métodos

4.1 Preparo das amostras

4.1.1 Plasma

A preparação empregada consiste na adição de 20 μL de 7-etoxicumarina (PI a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em 1 mL de plasma livre de flavanonas juntamente com as respectivas concentrações de naringenina e hesperitina (descritas no item 4.3.2). A mistura foi incubada com 100 μL de tampão de acetato de sódio (1 mol/L , pH 5) + 40 μL (4000 U) de β -glucuronidase/Sulfatase em banho maria durante 18h a 37°C. Todo o volume hidrolisado foi então diluído com 2 mL de tampão fosfato (0,1 mol/L , pH 2,4) e centrifugado por 10 minutos (3500 rpm).

Para a extração, todo o conteúdo foi injetado no cartucho Sep Pak C18 1 mL, 50 mg), pré-condicionado sucessivamente com 6 mL de metanol e 6 mL de HCL 0,01 M. O cartucho foi lavado sucessivamente com 5,0 mL de metanol a 10% em HCL (0,01 M), 3,0 mL de HCL (0,01 M) e foi injetado ar pelo cartucho com o intuito de retirar todo resíduo. Por fim, foi injetado 3 x 0,5 mL de acetonitrila no cartucho e o volume total foi coletado. Todas as injeções foram realizadas com auxílio do Manifold a vácuo.

As amostras foram evaporadas por completo até secura a 45°C em Speed Vack. O processo de ressuspensão ocorreu a partir da dissolução do resíduo em 100 μL de metanol. As amostras foram filtradas antes de serem injetadas e analisadas em UPLC.

4.1.2 Urina

A preparação empregada consiste de 1 mL de urina livre de flavanonas com adição de 20 μL de 7-etoxicumarina (PI a 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$) juntamente com as respectivas concentrações de naringenina e hesperitina (descritas no item 4.3.2). A mistura foi incubada com 100 μL de tampão de acetato de sódio (1 mol/L , pH 5), 100 μL de 0,1 M de ácido ascórbico + 40 μL (4000 U) de β -glucuronidase/Sulfatase em banho maria durante 18h a 37°C. Todo o volume

hidrolisado foi então diluído com 2 mL de tampão fosfato (0,1 mol/L, pH 2,4) e centrifugado por 10 minutos (3500 rpm).

Para a extração, todo o conteúdo foi injetado no cartucho Sep Pak C18 (1 mL, 50 mg), pré-condicionado sucessivamente com 6 mL de metanol e 6 mL de HCL 0,01 M. O cartucho foi lavado sucessivamente com 5,0 mL de metanol a 10% em HCL (0,01 M), 15 mL de água miliQ e foi injetado ar pelo cartucho com o intuito de retirar todo resíduo. Por fim, foi injetado 3 x 0,5 mL de acetonitrila no cartucho e o volume total foi coletado. Todas as injeções foram realizadas com auxílio do Manifold a vácuo.

As amostras foram evaporadas por completo até secura a 45°C em Speed Vack. O processo de ressuspensão ocorreu a partir da dissolução do resíduo em 100 µL de metanol. As amostras foram filtradas antes de serem injetadas e analisadas em UPLC.

4.2 Transferência do método bioanalítico

As condições cromatográficas correspondentes ao método original de quantificação de flavanonas totais por HPLC e a transferência das mesmas para UPLC encontram-se descritas nas tabelas apresentadas abaixo.

Tabela 1. Condições cromatográficas de HPLC desenvolvidas por Kanaze et al (2004)

Parâmetro	Descrição
Sistema HPLC	Duas bombas de alta pressão, injetor manual e detector UV-Vis
Coluna	C ₈ 250 mm × 4,6 mm x 5 µm
Fase móvel	Metanol/Água/Ácido acético (40:58:2, v/v/v)
Volume de injeção	20 µL
Fluxo	1 mL/min
Detector PDA UV – Vis	λ=288 nm
Temperatura da coluna	45°C
Gradiente	Isocrático
Solvente de dissolução	Fase móvel

Tabela 2. Condições cromatográficas de UPLC propostas para transferência analítica

Parâmetro	Descrição
Sistema UPLC	Duas bombas de alta pressão, injetor automático e detector UV-Vis
Coluna	C ₁₈ 200 mm x 2,0 mm x 2,2 µm
Fase móvel	Metanol/Água (40:60, v/v)
Volume de injeção	5 µL
Fluxo	0,4 ml/min
Detector PDA UV – Vis	λ=288 nm
Temperatura da coluna	45°C
Gradiente	Isocrático
Solvente de dissolução	Metanol

4.3 Parâmetros bioanalíticos

4.3.1 Linearidade

Preparação, por diluição, a partir de solução padrão de naringenina e hesperitina 400 µg/mL cada, de soluções de trabalho de 2,5; 3,75; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0 µg/LI. Foi injetado cada solução 3 vezes. O fator de correlação (R) foi de ≥0,99. Os limites de detecção e quantificação foram calculados.

4.3.2 Precisão e Exatidão

Preparação de amostras de controle de qualidade de hesperitina e naringenina nas concentrações nominais 2,5, 3,75 e 5 µg/mL incubadas com a enzima β-glucuronidase/Sulfatase utilizando matriz plasma e urina livre de flavanonas. Para a avaliação intra-dia, foi injetada cada solução controle seis vezes. Para a avaliação inter-dia, foi injetada em triplicada cada solução controle em três situações diferentes.

4.3.4 Seletividade

Para aumentar sensibilidade e a seletividade da análise foi escolhido o comprimento de onda (λ) 288 nm. Foi injetada a fase móvel, os padrões e o padrão interno. Não deve existir nenhum composto com o mesmo tempo de retenção do analito em questão, de forma a não comprometer o seu comportamento e o seu tempo de retenção em solução.

5. Resultados e Discussão

5.1 Transferência do método bioanalítico

A transferência de um método bioanalítico é um processo complexo cujo propósito é assegurar que o novo método atenda aos critérios exigidos. É a primeira etapa no processo do desenvolvimento de um novo método a partir de uma metodologia já existente.

Inicialmente, foram avaliadas as condições cromatográficas necessárias para a transposição da metodologia com destaque para a coluna cromatográfica, a composição da fase móvel e o volume de injeção.

Para isso, foram consideradas as características dos analitos que se pretendia identificar e quantificar. Ambas flavanonas apresentam baixo peso molecular e são altamente polares (PubChem, 2017). Desta forma, selecionou-se uma coluna mais densa, com partículas menores e com pouco espaço entre elas, comparativamente à análise de moléculas maiores. Como as operações de análise em UPLC apresentam pressões mais elevadas, optou-se pela utilização de partículas C₁₈ com diâmetro menor comparado ao método desenvolvido por Kanaze *et al* (2004), otimizando ainda mais a separação correta das moléculas. As condições cromatográficas encontram-se descritas nas tabelas 1 e 2.

A seleção da fase móvel, por sua vez, é feita com base no método de separação e na polaridade da partícula. Nesse caso, foi necessário compor uma fase móvel que operasse em fase reversa, ou seja, que fosse mais polar que a fase estacionária uma vez que os compostos de interesse são polares. Selecionou-se então, a fase móvel composta por metanol/água (40:60, v/v) e optou-se por não utilizar solução de ácido acético 2% que está presente na composição da fase móvel no método de Kanaze *et al* (2004) pois, durante os testes iniciais com a fase móvel, notou-se a obtenção de cromatograma assimétrico com picos com base larga.

Ainda na fase de testes, foi observado que o volume de injeção de 5 µL era suficiente para obter níveis aceitáveis de absorção e detecção dos compostos. Esse volume é 75% menor do que adotado por Kanaze *et al* (2004) apresentando uma melhora na diminuição na quantidade de amostra para

realizar a análise. Outro parâmetro alterado foi o fluxo, que no método de Kanaze *et al* (2004) era 1,0 mL/min. Com esse fluxo, a pressão era muito elevada não permitindo a operação no equipamento. Após alguns testes, estabeleceu-se um valor inferior de fluxo, de 0,4 mL/min, pressão suportada pelo equipamento e que não comprometia as análises.

Na etapa de preparação das amostras, Kanaze *et al* (2004) relataram que obtiveram cromatogramas com melhor performance quando a amostra seca foi ressuspensa utilizando 100 µL de uma solução composta por água e metanol (1:1, v/v). Contrariando esse relato, nesse trabalho identificamos que a presença da água nessa solução ocasionava a turvação da amostra ressuspensa enquanto que a ausência da água, ou seja, utilizando apenas 100 µL de metanol com alto nível de pureza como veículo de ressuspensão permitia a obtenção de um ressuspensa límpido. Não é recomendada a utilização de soluções de qualquer natureza que apresentem aspecto turvo ou contenham partículas sólidas suspensas para não comprometer a integridade do aparelho de HPLC/UPLC e/ou evitar obtenção de cromatogramas inadequados. Desta forma, as amostras analisadas foram ressuspensas somente com metanol não havendo prejuízos nas análises das substâncias de interesse.

Uma das principais melhorias pretendidas nesse estudo era a otimização do tempo de análise. Como demonstrado na Tabela 3, o tempo de eluição dos analitos registrado por Kanaze *et al* (2004) é similar ao tempo de eluição proposto na transferência analítica, porém, com característica distinta. No método original, em HPLC, a sequência de eluição dos analitos é naringenina, hesperetina e PI, do menor ao maior tempo respectivamente. Durante o processo de transferência para UPLC a sequência de eluição dos analitos foi naringenina, PI e hesperetina do menor ao maior tempo respectivamente. Suspeita-se que a eluição do PI tenha ocorrido em menor tempo no método por UPLC devido ao tipo de coluna adotada, composta por partículas com menor diâmetro e mais justapostas. O contrário foi observado para as flavanonas ao passo que ambas apresentaram tempo de eluição superior em UPLC comparado ao método por HPLC. Novamente esse fenômeno é explicado pela mudança da coluna cromatográfica que, nesse caso, apresentou maior grau de interação entre as partículas e os analitos.

Tabela 3. Tempos de eluição das substâncias de interesse no método HPLC versus a transferência proposta para UPLC.

Metodologia	Tempo de Eluição do Analito (min)		
	Hesperitina	Naringenina	7-etoxicumarina (PI)
HPLC Kanaze <i>et al</i> (2004)	16,1	13,1	19,2
UPLC Transferência	17,7	13,1	15,9

Além disso, nesse trabalho de transferência bioanalítica optou-se por não alterar radicalmente a composição da fase móvel para diminuir o tempo de corrida. A única mudança, como já relatado, foi a exclusão do ácido acético 2%. Essa decisão é justificada pelo resultado insatisfatório das tentativas em alterar composição da fase móvel que culminou em efeitos negativos para identificação das substâncias de interesse. Os cromatogramas não eram limpos, a linha de base não permanecia estável e o tempo de eluição dos analitos apresentava muita variação. Embora essas mudanças tenham sido observadas, não houve prejuízos experimentais na identificação e quantificação das substâncias de interesse, porém, não foi possível diminuir o tempo de corrida, sendo foi fixado em 30 minutos.

5.2 Curva de calibração

A linearidade foi avaliada a partir da construção de uma curva analítica com intervalo de 2,5-60 µg/mL, com exatidão entre 94% e 104% para naringenina e entre 86% e 104% para hesperitina, sendo esses valores aceitáveis, uma vez que o intervalo desejável é entre 85 e 115%. A curva, representada abaixo, resultou em um coeficiente de correlação de 0,99 para ambos os casos gerando as seguintes equações da reta: $y = 27492x - 6931,1$ e $y = 32349x - 10060$ para naringenina e hesperitina respectivamente.

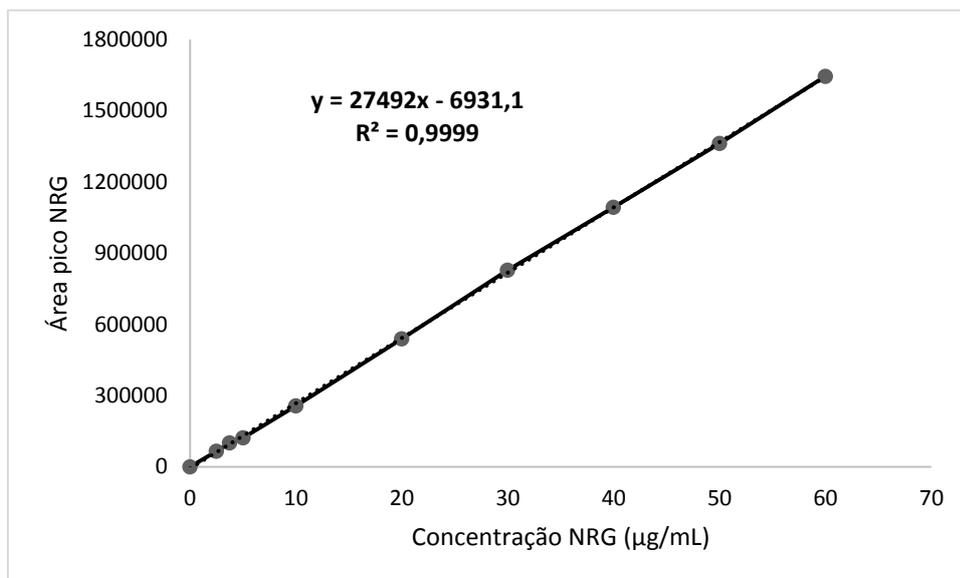


Figura 4. Curva bioanalítica construída para naringenina

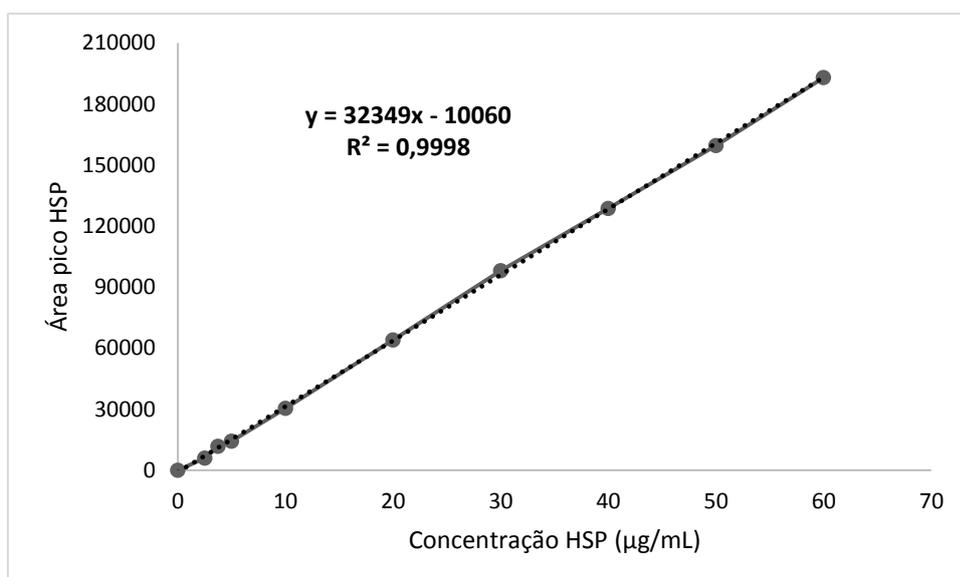


Figura 5. Curva bioanalítica construída para hesperitina

5.3 Precisão/exatidão

Os parâmetros de precisão e exatidão foram avaliados individualmente para cada matriz, utilizando as concentrações mais baixas obtidas nas respectivas curvas de calibração. Para aprovação, os valores de precisão devem se encontrar entre 0 e 15% e os de exatidão entre 85 e 115%. Os resultados encontram-se apresentados nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Precisão e exatidão intra e inter-dia para naringenina e hesperitina em amostras de sangue incubadas com a enzima β -glucuronidase/sulfatase.

Concentração Nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração encontrada ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão^a (RSD,%)	Exatidão^b (%)
Naringenina intra-dia^c			
2,5	2,63	1,91	103,2
3,75	3,83	1,02	101,3
5	4,86	0,82	96,6
Inter-dia^d			
2,5	2,60	0,50	98,85
3,75	3,83	0,41	100,3
5	4,83	0,23	100
Hesperitina intra-dia^c			
2,5	2,39	1,17	94,4
3,75	3,78	0,82	101
5	4,84	0,43	96,2
Inter-dia^d			
2,5	2,36	0,67	99,2
3,75	3,75	0,40	99,7
5	4,83	0,26	100,4

^a RSD: desvio padrão relativo

^b Exatidão: concentração encontrada expressa em % da concentração nominal

^c n=6

^d n=9

Tabela 5. Precisão e exatidão intra e inter-dia para naringenina e hesperitina em amostras de urina incubadas com a enzima β -glucuronidase/sulfatase.

Concentração Nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração encontrada ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão^a (RSD %)	Exatidão^b (%)
Naringenina intra-dia^c			
2,5	2,68	1,62	104,8
3,75	3,86	1,29	104
5	4,72	0,48	94,4
Inter-dia^d			
2,5	2,7	0,73	108,4
3,75	3,87	0,61	103,2
5	4,76	0,42	93,8
Hesperitina intra-dia^c			
2,5	2,20	1,26	86
3,75	3,80	2,51	104,8
5	4,84	1,72	94,6
Inter-dia^d			
2,5	2,20	1,74	87,2
3,75	3,74	0,47	99,7
5	4,82	0,52	95,8

^a RSD: desvio padrão relativo

^b Exatidão: concentração encontrada expressa em % da concentração nominal

^c n=6

^d n=9

Todas as concentrações apresentaram resultados dentro do preconizado. Para amostras de sangue a precisão variou de 0,23-1,91% para naringenina e de 0,26-1,17% para hesperitina enquanto que para amostras de urina as variações foram 0,42-1,62% e 0,47-2,51%, respectivamente. Já a exatidão, apresentou intervalos ainda menores 96,2-103,2% para amostras de sangue e 86-108,4% para amostras de urina englobando as duas flavanonas. Além disso, pelos resultados, podemos certificar que a extração fase-sólida se mostrou eficaz permitindo alto rendimento na extração das substâncias de interesse presentes na matriz biológica.

O desempenho dos parâmetros precisão/exatidão foi muito satisfatório pois, como o limite de quantificação foi relativamente elevado, a quantificação dos analitos foi bastante consistente entre as replicatas.

5.4 Seletividade

A seletividade foi comprovada com a ausência de sobreposição de picos entre os padrões das substâncias em estudo (60 µg/mL cada) e o PI (70 µg/mL) como demonstrado na figura 6 abaixo. O tempo de retenção foi 13,1 minutos para naringenina, 15,9 minutos para 7-etoxicumarina (PI) e 17,7 minutos para hesperitina (Tabela 3).

O comprimento de onda utilizado, 288 nm, permitiu maior absorbância das substâncias de interesse em detrimento a outros solutos. Não é possível verificar o pico do solvente, metanol, pois o detector UV identifica essa substância abaixo de 210 nm (SILVERSTEIN,1998).

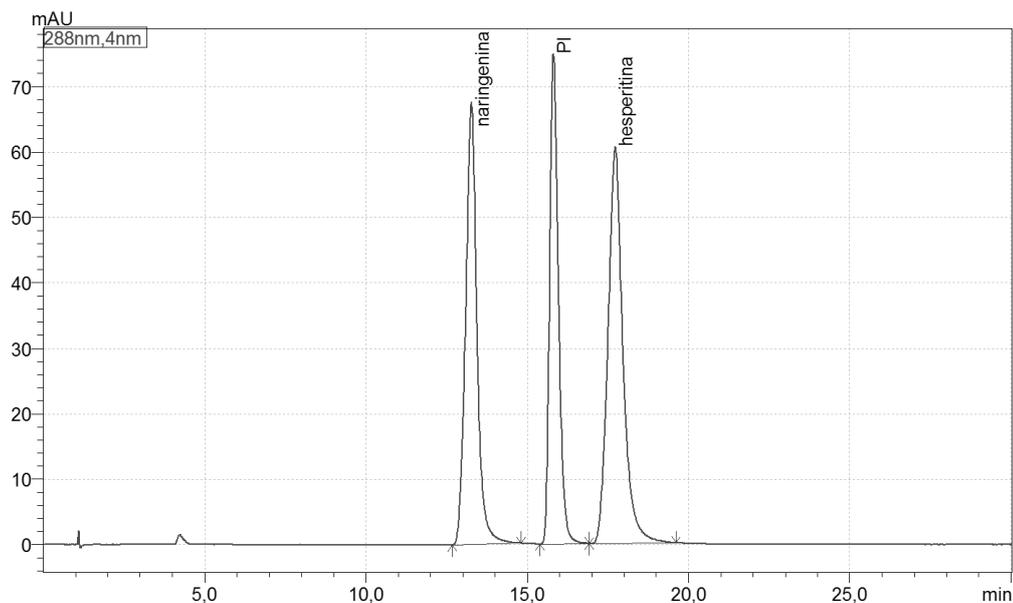


Figura 6. Cromatograma em 288 nm demonstrando o parâmetro seletividade.

5.5 Limite inferior de detecção

O limite inferior de detecção foi definido como a concentração mais baixa quantificável da curva de calibração, sendo então considerado 2,5 µg tanto para a naringenina quanto para a hesperitina. Ambos apresentaram uma resposta no mínimo cinco vezes superior a qualquer ruído da amostra.

5.6 Estabilidade

Ensaio realizados por Kanaze *et al* (2004) revelaram que a estabilidade de curto período (24h) e a estabilidade de congelamento – descongelamento (3 ciclos) apresentam um erro aceitável conforme o critério de aceitação estabelecido pelo FDA, que é de 10%. As porcentagens de erro nas análises de estabilidade foram de -1,8 a -3,6% e de -1,0 a -3,0% para hesperetina e naringenina, respectivamente. Desta forma, essa análise não foi realizada no presente estudo uma vez que foi considerada mínima a chance de erro na estabilidade das amostras realizadas já que todo o processamento e armazenamento foi executado igual ao método original.

6. Conclusão

O presente estudo teve como principal objetivo a transferência de um método analítico de HPLC para UPLC e a avaliação dos parâmetros da mesma, compondo a pré validação. Todas as análises foram executadas em um sistema de cromatografia líquida de ultra pressão (UPLC) e com um método analítico destinado à quantificação de flavanonas totais (hesperitina e naringenina) em amostras biológicas de humanos. Assim sendo, os ensaios realizados foram essenciais para certificação de que a transferência bioanalítica proposta é adequada para o fim a que se destina.

A transferência do método bioanalítico foi um processo extenso no qual primeiramente foi testado as condições cromatográficas, como por exemplo, o tipo de coluna e a composição da fase móvel seguindo posteriormente para a avaliação dos parâmetros bioanalíticos, como por exemplo, linearidade e seletividade. A obtenção de resultados satisfatórios indicou a possibilidade de realizar a transferência do método.

Com isso, as etapas de hidrólise, extração e transferência bioanalítica são adequadas para a determinação quantitativa do total (livre e conjugado) dos biomarcadores hesperetina e naringenina em amostras biológicas utilizadas na realização de estudos farmacocinéticos em seres humanos.

7. Bibliografia

_____. Food and Drug Administration (FDA). **Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, Draft Guidance**. Rockville: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). p.34, 2013.

AMEER, B., WEINTRAUB, R. A., JOHNSON, J. V., YOST, R. A., & ROUSEFF, R. L. **Flavanone absorption after naringin, hesperidin, and citrus administration**. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 60, n. 1, p. 34-40, 1996

BRETT, G. M., HOLLANDS, W., NEEDS, P. W., TEUCHER, B., DAINTY, J. R., DAVIS, B. D. & KROON, P. A. **Absorption, metabolism and excretion of flavanones from single portions of orange fruit and juice and effects of anthropometric variables and contraceptive pill use on flavanone excretion**. *British Journal of Nutrition*, v. 101, n. 5, p. 664-675, 2008.

CHANG, C. C., YANG, M. H., WEN, H. M., & CHERN, J. C. **Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods**. *Journal of food and drug analysis*, v. 10, n. 3, 2002.

DING Y.; PENG M.; ZHANG T.; TAO J. S.; CAI Z. Z. & ZHANG Y. **Quantification of conjugated metabolites of drugs in biological matrices after the hydrolysis with β -glucuronidase and sulfatase: a review of bio-analytical methods**. *Biomed Chromatography*, v. 10, p. 1280-1295, 2013.

FUHR, U.; KUMMERT, A. L. **The fate of naringin in humans: A key to grapefruit juice-drug interactions?** *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 58, n. 4, p. 365-373, 1995.

GUILLARME, D., NGUYEN, D. T. T., RUDAZ, S., & VEUTHEY, J. L. **Recent developments in liquid chromatography— impact on qualitative and quantitative performance.** Journal of Chromatography A, v. 1149, n. 1, p. 20-29, 2007.

ISHII, K.; FURUTA, T.; KASUYA, Y. **Determination of naringin and naringenin in human urine by high-performance liquid chromatography utilizing solid-phase extraction.** Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, v. 704, n. 1, p. 299-305, 1997.

KANAZE, F. I., KOKKALOU, E., GEORGARAKIS, M., & NIOPAS, I. **A validated solid-phase extraction HPLC method for the simultaneous determination of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin in urine.** Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, v. 36, n. 1, p. 175-181, 2004.

KANAZE, F. I., KOKKALOU, E., GEORGARAKIS, M., & NIOPAS, I. **Validated high-performance liquid chromatographic method utilizing solid-phase extraction for the simultaneous determination of naringenin and hesperetin in human plasma.** Journal of Chromatography B, v. 801, n. 2, p. 363-367, 2004.

LANÇAS, F. M.. **Cromatografia líquida moderna - hplc/clae.** 1ªEd. Campinas: **Atomo,2009. ISBN 9788576701231**

LOUGH, J. W.; WAINER, I. W. (Ed.). **High performance liquid chromatography: fundamental principles and practice.** CRC Press, 1995

MANACH, C., MORAND, C., GIL-IZQUIERDO, A., BOUTELOUP-DEMANGE, C., & REMESY, C. **Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice.** European journal of clinical nutrition, v. 57, n. 2, p. 235, 2003.

PETERSON, J. J., DWYER, J. T., BEECHER, G. R., BHAGWAT, S. A., GEBHARDT, S. E., HAYTOWITZ, D. B., & HOLDEN, J. M. **Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature.** Journal of Food Composition and Analysis, v. 19, p. S66-S73, 2006.

PORTO, H. S. M. **HPLC versus UPLC: avaliação de aspetos críticos à transferência e validação de métodos analíticos.** 2014. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica) - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Coimbra.

RAMIREZ, E. J. A.; HÜBSCHER, G. H. **Laranja: em defesa de seu uso como alimento funcional.** Nutrire Rev. Soc. Bras. Aliment. Nutr, v. 36, n. 3, 2011.

SANTOS, A. C., COSTA, G., VEIGA, F., FIGUEIREDO, I. V., BATISTA, M. T., & RIBEIRO, A. J. **Advance in methods studying the pharmacokinetics of polyphenols.** Current drug metabolism, v. 15, n. 1, p. 96-115, 2014.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F.X.; **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 6th ed., Editora Livros Técnicos e Científicos: Rio de Janeiro, 1998.

SNYDER, R. L.; DOLAN, J.W. **High-performance gradient elution: the practical application of the linear-solvent-strength model.** John Wiley & Sons, 2007.

TSWETT, M. S. **O novoi kategorii adsorbtsionnykh yavlenii io primenenii ikh k biokhimicheskomu analizu (On a new category of adsorption phenomena and their application to biochemical analysis).** Lecture at the March, v. 8, p. 20-39, 1903

UNNO, T.; HISADA, T.; TAKAHASHI, S. **Hesperetin modifies the composition of fecal microbiota and increases cecal levels of short-chain fatty acids in rats.** *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 63, n. 36, p. 7952-7957, 2015.

ANEXOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INFLUÊNCIA DO EFEITO PREBIÓTICO DO SUCO DE LARANJA NA BIODISPONIBILIDADE DAS FLAVANONAS APÓS INGESTÃO CRÔNICA DE SUCO DE LARANJA

Pesquisador: Melaine Priscila Fidélis

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 53228116.9.0000.5426

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.644.906

Apresentação do Projeto:

O projeto está bem redigido e as revisões solicitadas já foram executadas.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo está claramente apresentado e não há observações a serem adicionadas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Foram realizadas de acordo com a legislação vigente e as solicitações do Comitê de Ética em Pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é interessante e pode trazer benefícios para a comunidade caso os resultados estejam de acordo com o esperado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos obrigatórios foram apresentados e estão em conformidade com o que pede este Comitê.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovo, "ad referendum" do Comitê de Ética em Pesquisa, o projeto de pesquisa ora apresentado.

Endereço: Rodovia Araraquara Jaú, km 1

Bairro: Campus Universitário

CEP: 14.801-902

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-8897

E-mail: sta@fctar.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.644.906

Os relatórios parciais deverão ser entregues em 1) FEVEREIRO de 2017 e 2) AGOSTO de 2017; e o Relatório Final junto aos Termos de Consentimento Livre Esclarecido (originais e assinados em todas as folhas) deverão ser entregues em JANEIRO de 2018.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_658689.pdf	20/07/2016 11:43:29		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP_Versao3.doc	20/07/2016 11:43:08	Melaine Priscila Fidélix	Aceito
Cronograma	Cronograma_Versao3.docx	20/07/2016 11:42:05	Melaine Priscila Fidélix	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_preenchido.doc	04/02/2016 12:12:12	Melaine Priscila Fidélix	Aceito
Orçamento	Orcamento.docx	03/02/2016 16:12:30	Melaine Priscila Fidélix	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Pesquisador.docx	03/02/2016 16:12:13	Melaine Priscila Fidélix	Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rosto_Melaine.pdf	03/02/2016 15:53:02	Melaine Priscila Fidélix	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARARAQUARA, 22 de Julho de 2016

Assinado por:
Adriano Mondini
(Coordenador)

Endereço: Rodovia Araraquara Jaú, km 1
Bairro: Campus Universitário CEP: 14.801-902
UF: SP Município: ARARAQUARA
Telefone: (16)3301-6897 E-mail: sta@fcfar.unesp.br