



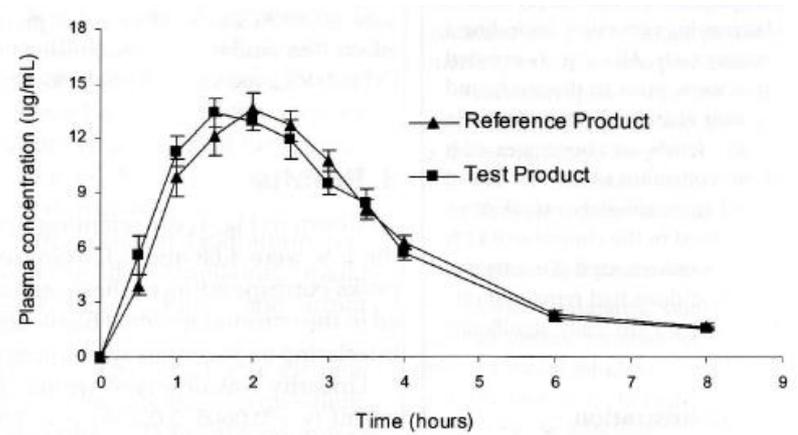
Biofarmacotécnica

Ensaio de Bioequivalência

Etapa Analítica



Introdução





Introdução

Técnicas de quantificação de fármacos em amostras biológicas:

- * cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, HPLC – *high performance liquid chromatography*);
- * cromatografia gasosa (GC – *gas chromatography*);
- * imunoenaios (radioimunoensaio, enzimaensaio).



Amostra biológicas

Tipos de amostras:

- * sangue;
- * plasma;
- * soro;
- * urina;
- * saliva;
- * ...



Amostras biológicas

Pontos críticos no processo de encaminhamento das amostras biológicas:

- * identificação (estudo, sujeito, fase, data e horário da coleta);
- * temperatura durante o transporte;
- * avaliação das condições das amostras no recebimento;
- * armazenamento no laboratório analítico.



Amostras biológicas

Pré-tratamento:

- * precipitação por proteínas;
- * extração líquido-líquido;
- * extração por fase sólida.



Técnicas cromatográficas

- * fase móvel/fase estacionária;
- * migração diferencial/separação;
- * detecção/cromatograma;
- * tempo de retenção/área de pico;
- * padrão interno;
- * CLAE/GC.



CLAE

- * fase móvel líquida;
- * tipos básicos:
 - * cromatografia líquido-líquido ou de partição;
 - * cromatografia líquido-sólido;
 - * cromatografia de troca iônica;
 - * cromatografia de exclusão.



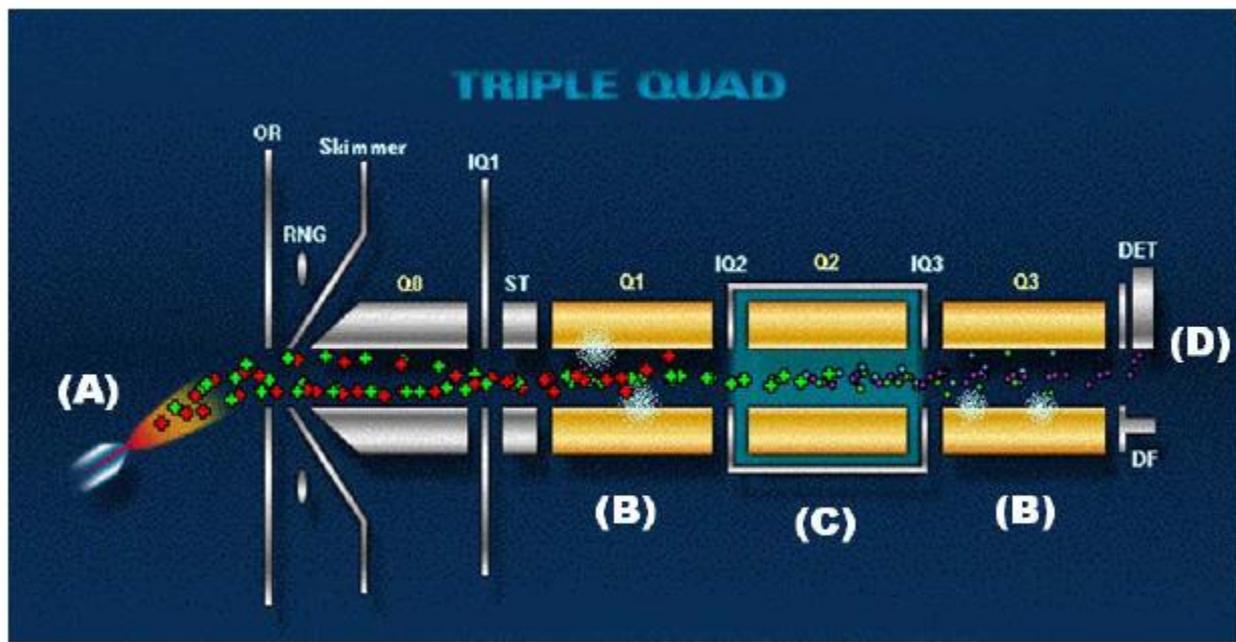
CLAE

Detectores:

- * absorvância no ultravioleta e visível (UV-VIS);
- * arranjo de diodos (DAD);
- * fluorescência;
- * espectrometria de massas (LC/MSMS).



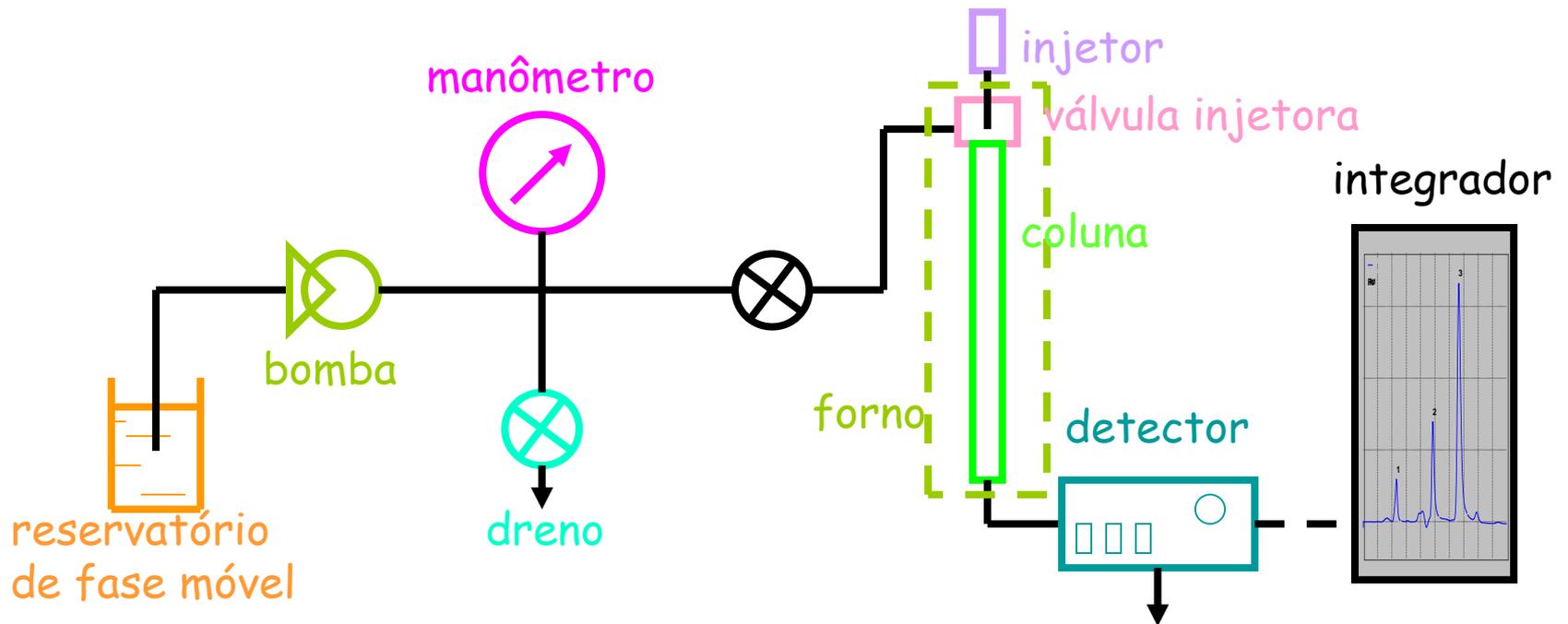
LC/MSMS





CLAE

A CLAE permite separação e quantificação dos componentes de uma amostra.



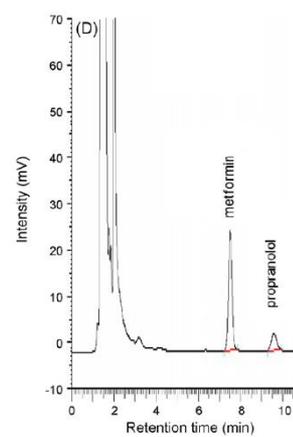
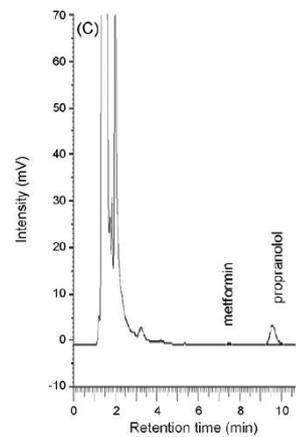
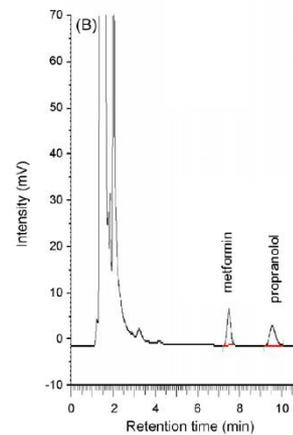
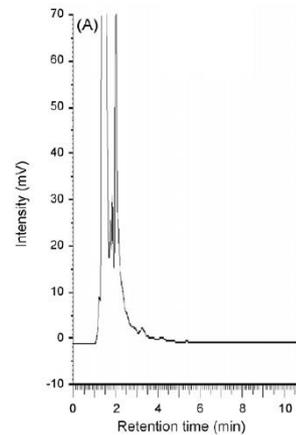


CLAE





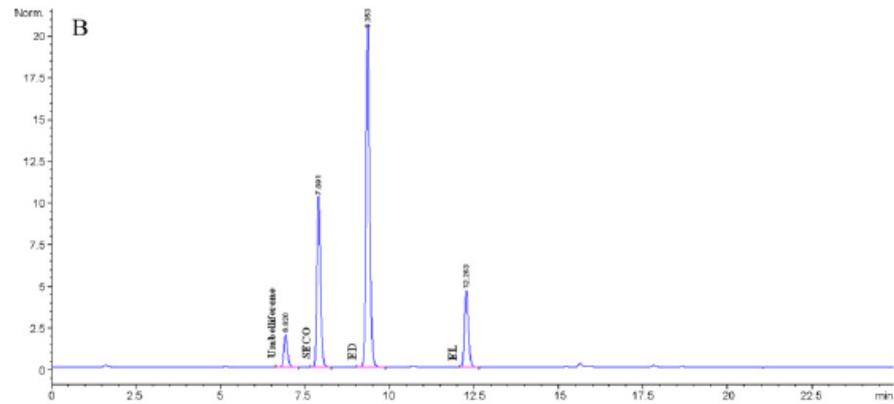
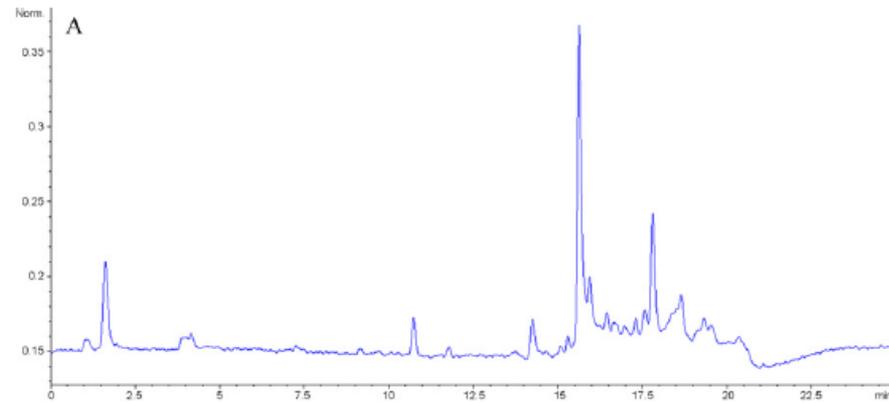
CLAE – Cromatogramas



UV-vis



CLAE – Cromatogramas

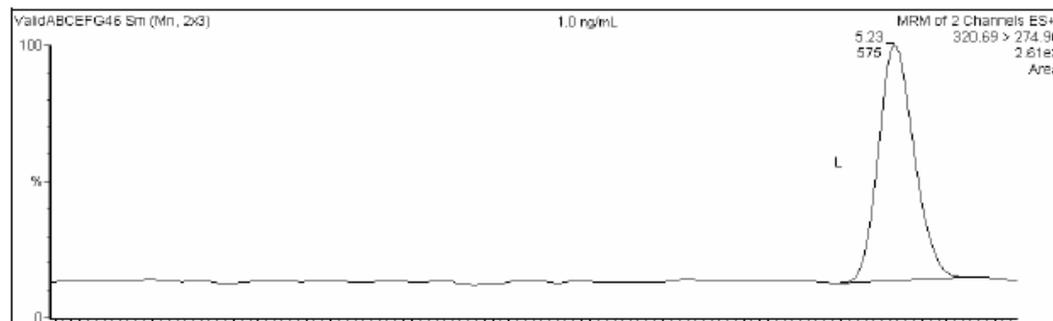


fluorescência

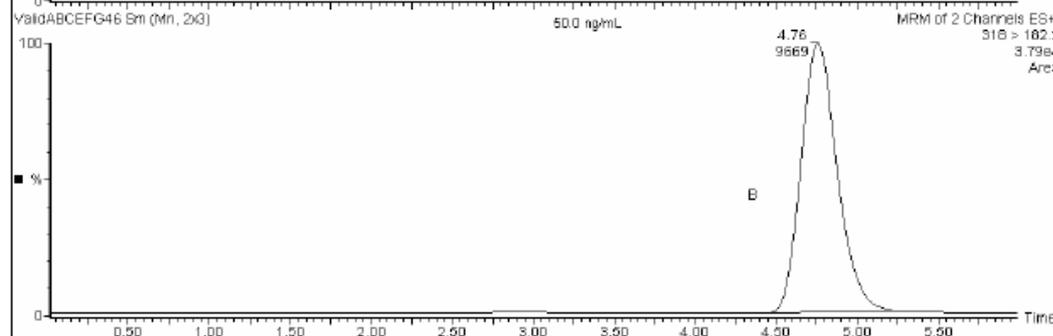


CLAE – Cromatogramas

lorazepam $m/z=321$
transição: 321>275



bromazepam $m/z=318$
transição: 318>102



LC-MSMS



Cromatografia gasosa

- * fase móvel gasosa;
- * fase estacionária líquida ou sólida;
- * volatilização da amostra;
- * amostras voláteis e termorresistentes.



Imunoensaios

- * EMIT (enzyme-multiplied immunoassay technique);
- * FPIA (fluorescence polarization immunoassay);
- * alta sensibilidade;
- * baixa seletividade;
- * fenobarbital, teofilina, digoxina, etc...



Desenvolvimento de métodos

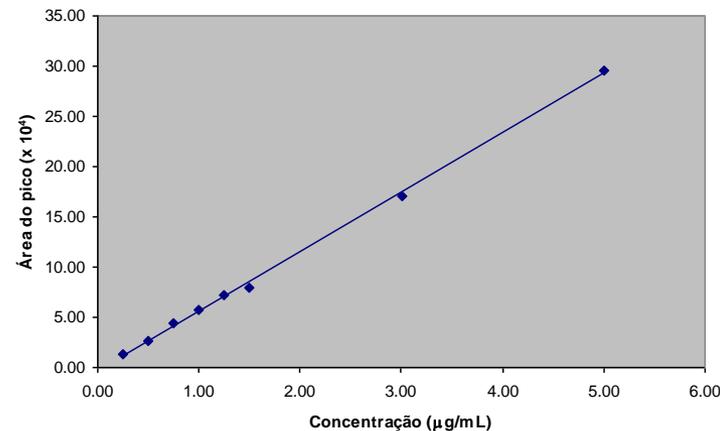
Parâmetros importantes:

- * faixa de linearidade e limite de quantificação;
- * complexidade do processo de pré-tratamento;
- * tempo de análise;
- * disponibilidade de padrão interno;
- * toxicidade dos solventes e demais reagentes.



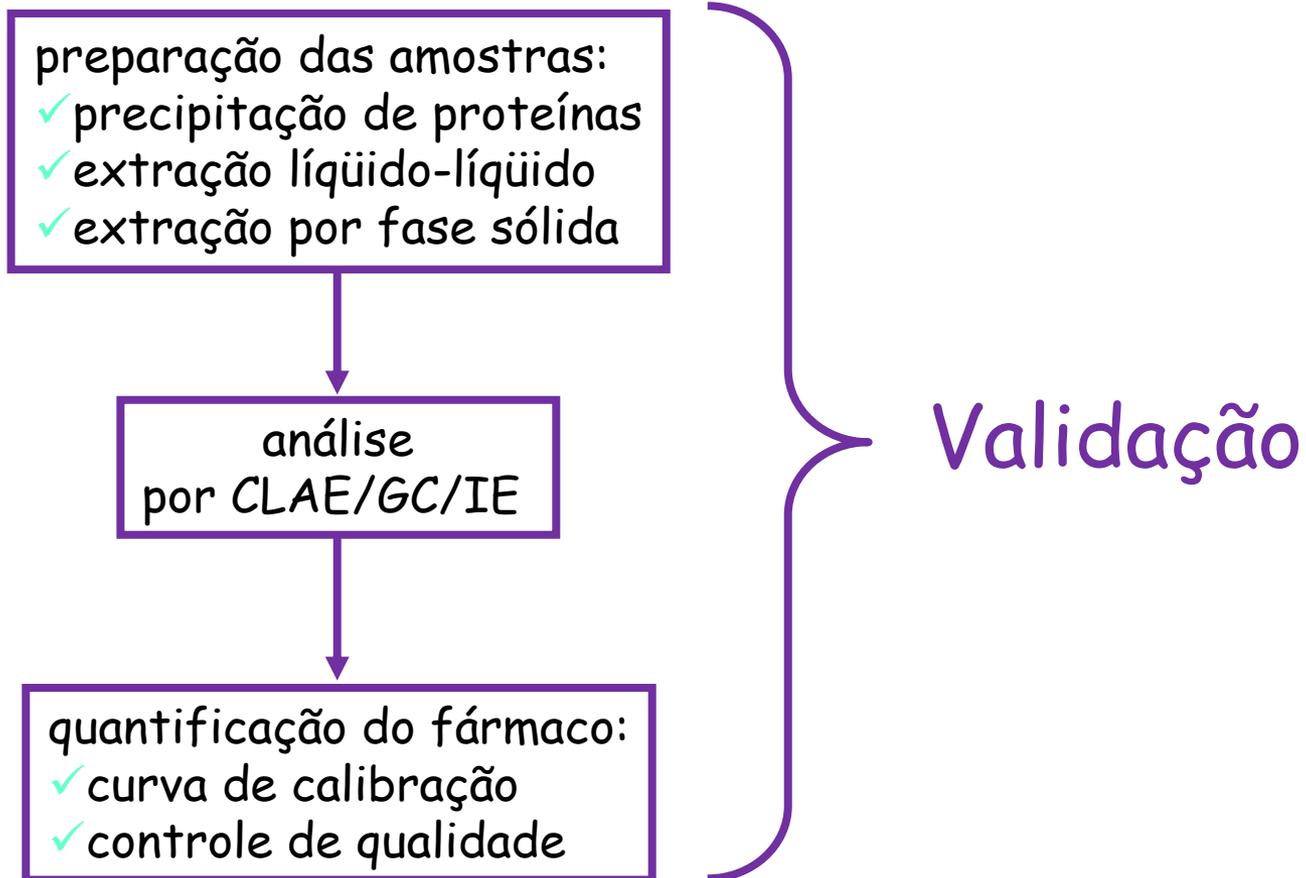
Quantificação do Fármaco

A quantificação do fármaco nas amostras biológicas é feita por meio de comparação com amostras padrão (curva de calibração) e controlada por meio de amostras de controle de qualidade.





Etapa Analítica - Resumo





Validação

A validação deve garantir que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

Abrange os seguintes itens (RDC 27/2012):

- * seletividade;
- * efeito residual;
- * efeito matriz;
- * curva de calibração;
- * precisão;
- * exatidão;
- * estabilidade.



Validação

Outros parâmetros (RE 899/03):

- *recuperação;
- *limites de detecção e quantificação;
- *robustez.



Seletividade

Capacidade do método de diferenciar e quantificar os analitos de interesse (fármaco e PI) na presença de outros componentes da amostra.

São investigados pela análise de amostras de plasma branco (quatro amostras normais, uma lipêmica, uma hemolisada) para verificação da existência de interferência por parte de componentes endógenos.

* 5% para PI

* 20% LIQ para analito



Efeito residual

Aparecimento ou aumento do sinal do analito ou PI causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente.

Devem ser realizadas, no mínimo, 3 (três) injeções da mesma amostra branco, sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma ou mais amostras processadas do LSQ.

* 5% para PI

* 20% LIQ para analito



Efeito matriz

Efeito na resposta do analito ou PI causado por componentes da matriz biológica.

Devem ser analisadas amostras de matrizes biológicas processadas (para plasma: 4 normais, 2 lipêmicas, 2 hemolisadas), posteriormente adicionadas de analito e PI, e soluções, nas mesmas concentrações das amostras de CQB e CQA.

Fator de matriz normalizado (FMN): $CV < 15\%$

$$FMN = \frac{\frac{\text{pico analito matriz}}{\text{pico PI matriz}}}{\frac{\text{pico analito solução}}{\text{pico PI solução}}}$$



Curva de Calibração

A curva de calibração indica a relação entre concentração de analito e resposta do método, representada, no caso da CLAE, pela razão de áreas dos picos cromatográficos de analito e PI.

É definida utilizando-se no mínimo seis concentrações de padrão em plasma e três repetições. Deve-se estabelecer correlação de preferência linear entre concentração, considerada variável independente (x) e área do pico, considerada variável dependente (y).



Precisão

A precisão de métodos bioanalíticos é uma medida de erro aleatório e é definida como concordância entre várias medidas da mesma amostra, sendo expressa como coeficiente de variação (C.V. %) dessas medidas:

- * precisão intracorrída: cinco replicatas
- * precisão intercorrídas (≥ 3 , dias distintos): cinco replicatas

Concentrações: LIQ, CQB, CQM, CQA, CQD.

Não deve ser superior a 15% (20% para LIQ).



Exatidão

A exatidão de métodos bioanalíticos é uma medida de erro sistemático e é definida como concordância entre o valor determinado e o valor real:

- * precisão intracorrída: cinco replicatas
- * precisão intercorrídas (≥ 3 , dias distintos): cinco replicatas

Concentrações: LIQ, CQB, CQM, CQA, CQD.

Não deve ser superior a 15% (20% para LIQ).



Estabilidade

Dados sobre estabilidade são necessários para garantir que a concentração da substância não sofre alteração entre a coleta da amostra e o momento da análise.

- * longa duração;
- * curta duração
- * ciclos de congelamento e descongelamento;
- * Pós-processamento;
- * soluções-padrão refrigeradas ou congeladas.

Concentrações: CQA e CQB



Recuperação

A recuperação corresponde ao resultado obtido após análise de amostra de plasma branco acrescida de padrão, submetida a pré-tratamento, expresso como porcentagem do resultado obtido após análise de padrão puro, não submetido a pré-tratamento.



Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção e quantificação expressam a capacidade do método analítico em determinar pequenas concentrações de analito:

- * **limite de detecção**: representa a menor concentração que pode ser diferenciada do nível de ruído;
- * **limite de quantificação**: deve apresentar resposta , no mínimo, duas vezes maior que a do limite de detecção, e representa a menor concentração que pode ser determinada com exatidão e precisão aceitáveis (20%).



Robustez

Avalia a suscetibilidade do método analítico a variações nas condições analíticas, tais como:

- * tempo de extração;
- * pH da fase móvel;
- * composição da fase móvel;
- * coluna;
- * temperatura;
- * fluxo.