

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO
Programa de Pós Graduação Stricto Sensu em Ciências da
Saúde
Área de Farmacologia Clínica e Geral

DETERMINAÇÃO DE EFAVIRENZ EM PLASMA HUMANO
UTILIZANDO CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA ACOPLADA A
ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Flávio Marcio Macedo Mendes

Bragança Paulista

2009

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO
Programa de Pós Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde
Área de Farmacologia Clínica e Geral

DETERMINAÇÃO DE EFAVIRENZ EM PLASMA HUMANO
UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A
ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade São Francisco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de Concentração: Farmacologia Clínica e Geral.

ORIENTADOR: PROF. Dr. EDUARDO C. MEURER

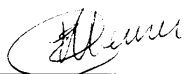
Bragança Paulista

2009

QV 38 M491d	<p>Mendes, Flávio Márcio Macedo. Determinação de Efavirenz em plasma humano utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa / Flávio Márcio Macedo Mendes. -- Bragança Paulista, 2009. 46p.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação <i>Stricto Sensu</i> em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco. Orientação de: Eduardo César Meuer.</p> <p>1. Aids. 2. HIV - Efavirens. 3. Medicamentos genéricos. 4. Equivalência terapêutica. 5. Cromatografia líquida. 6. Espectrometria de massa. I. Título. II. Meuer, Eduardo Cesar.</p>
----------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------



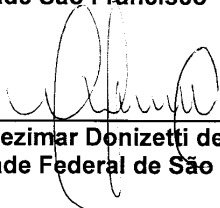
MENDES, Flávio Marcio Macedo . “Determinação de Efavirenz no Plasma Humano Utilizando Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas”. Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em sete de Julho de 2009 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Eduardo César Meurer - Orientador e Presidente
Universidade São Francisco



Prof^a. Dr^a. Silvana Aparecida Calafatti
Universidade São Francisco



Prof. Dr. Gezimar Donizetti de Souza
Universidade Federal de São Carlos

DETERMINAÇÃO DE EFAVIRENZ EM PLASMA HUMANO UTILIZANDO CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em ciências da saúde e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Orientador: _____

Prof. Dr. Eduardo C. Meurer, USF

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Silvana Calafatti Carandina, USF
Doutora pela UFSCAR – São Carlos, Brasil

Dr. Gezimari Donizetti de Souza
Doutor pela UFSCAR – São Carlos, Brasil

Prof. Dr. Luiz Alberto Heraldo de Moraes, USP-RP
Doutor pela UNICAMP – Campinas – SP, Brasil

Prof. Dr. Rodrigo Catharino, UNICAMP
Doutor pela UNICAMP – Campinas, Brasil

Bragança Paulista

2009

AGRADECIMENTOS

Agradeço minha família, em especial meu pai Antonio Carlos Mendes, minha mãe Elcyvânia Macedo Mendes, aos meus Avós Antonio Theodoro Mendes e Almerinda de Faria Mendes, minha irmã Cristiane Macedo Mendes entre outros, por sempre participar de todos os momentos de minha vida.

Prof^o Dr. Eduardo C. Meurer, meu orientador, que me apoiou na construção do saber científico, através de seus ensinamentos.

A Unifag, através do Dr. Pedrazzoli, Dra. Silvana Calafatti, pela oportunidade de vivenciar toda a rotina de um centro de bioequivalência.

Aos funcionários da Unifag, meu agradecimento a todos vocês por terem colaborado na minha pesquisa científica, fazendo do ambiente de trabalho diário um ambiente tranquilo e alegre.

Dr. Fabio Barros, do centro de bioequivalência "CORE" por compartilhar seus conhecimentos, e sua amizade.

Colegas de pós-graduação, em especial ao Gilvan, por termos juntos vencido mais essa etapa de nossas vidas.

E principalmente a Deus, por se fazer sempre presente, dando-me força para enfrentar todos os momentos dessa caminhada.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
ASC	Área sob a curva da concentração plasmática em relação ao tempo.
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AZT	Zidovudina
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência.
CMV	Citomegalovírus
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Cmax	Concentração plasmática máxima.
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EBV	Epstein-Barr
ESI	Ionização por electrospray.
FDA	Food and Drug Administration
GC	Cromatografia gasosa.
HIV	<i>Immunodeficiency Vírus</i>
MRM	Monitoramento de reações múltiplas
MS/MS	Espectrometria de massas
LAV	Linfadenopatia
LOD	limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
LC	Cromatografia líquida de alta eficiência.
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
m/z	Razão massa por carga
Rpm	Rotação por minuto
SK	<i>Sarcoma de Kaposi</i>
PPC	<i>Pneunocistis carinii</i>
Tmax	Tempo para obtenção do Cmax.
IS	Padrão interno
RNA	Acido ribonucleico
UV	Ultravioleta
v/v	Volume por volume

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Ciclo de Replicação do HIV	2
Figura 2:	Estruturas químicas de fármacos inibidores da transcriptase reversa	4
Figura 3:	Fosforilação intracelular do AZT	4
Figura 4:	Estrutura química de fármacos inibidores da transcriptase reversa não nucleosídeos	6
Figura 5:	Esquema da espectrometria de massas	11
Figura 6:	Espectrômetro de massas sequencial acoplado ao CLAE	12
Figura 7:	JOHN B. FENN - Inventor da técnica de electrospray	12
Figura 8:	Fundamento do Electrospray	14
Figura 9:	Analizador de Massas Quadrupolar	15
Figura 10:	Esquema demonstrando o caminho percorrido por uma amostra ate a sua chegada nos quadropolos: a amostra e inserida no probe, sofrendo a ação de gases nebulizadores e disolvatadores, passa pelo cone e vai de encontro ao cone de extração passando por um sistema de lentes e seguindo em direção ao analisador	21
Figura 11:	Estrutura do Efavirens e Loratadina	23
Figura 12:	Espectro de massas na função MS para Efavirenz	24
Figura 13:	Espectro de MS/MS para o Efavirenz.	24
Figura 14:	Espectro de Massas função MS operando em modo negativo para Efavirenz	25
Figura 15:	Espectro de MS/MS para Efavirenz em modo negativo	25
Figura 16:	Espectro de massas na função MS para Loratadina (Padrão Interno).	26
Figura 17:	Espectro de MS/MS para Loratadina	26
Figura 18:	Proposta de fragmentação para efavirenz (es-)	28
Figura 19:	Proposta de fragmentação para loratadina (es+)	28
Figura 20:	Plasma branco normal lote indivíduo 01. a) cromatograma referente ao branco do analito. b) cromatograma referente ao branco do padrão interno. plasma branco normal lote indivíduo 02. c) cromatograma referente ao branco do analito. d) cromatograma referente ao branco do padrão interno	31
Figura 21:	Plasma branco normal indivíduo 03. a) cromatograma referente ao branco do analito. b) cromatograma referente ao branco do padrão interno. plasma branco normal indivíduo 04 c) cromatograma referente ao branco do analito. d)	32

- cromatograma referente ao branco do padrão interno
- Figura 22:** Plasma branco lipêmico indivíduo 05. **a)** cromatograma referente ao branco do analito. **b)** cromatograma referente ao branco do padrão interno. plasma branco hemolisado indivíduo 06. **c)** cromatograma referente ao branco do analito. **d)** cromatograma referente ao branco do padrão interno 33
- Figura 23:** Cromatograma referente a Solução de Efavirenz 10,0 ng/mL (LQ). **B)** 34
Cromatograma referente a Solução de Loratadina 10,87 ng/mL

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Preparo da Curva de Calibração para o Efavirenz	18
Tabela 2:	Preparo dos Controles de Qualidade	19
Tabela 3:	Curva de calibração de Efavirenz	35
Tabela 4:	Resultados das análises intra-lote do controle de qualidade LQ	36
Tabela 5:	Resultados das análise intra-lote dos controles de qualidade CQB, CQM E CQA	37
Tabela 6:	Resultados das análises intra-lote dos controles de qualidade de Efavirenz em plasmas lipêmico e hemolisado	37
Tabela 7:	Resultados inter-lotes do controle de qualidade LQ	38
Tabela 8:	Análise inter-lotes dos controles de qualidade CQB, CQM E CQA	38
Tabela 9:	Media dos controles de qualidade CQD1, CQD2 E CQD3 diluídos com plasma branco (fd=4), intra-lote	39
Tabela 10:	Média dos controles de qualidade CQD1, CQD2 E CQD3 (fd=4)	39
Tabela 11:	Porcentagem de recuperação do fármaco	39
Tabela 12:	Porcentagem de recuperação do padrão interno	40
Tabela 13:	Resultados obtidos no estudo de estabilidade no auto-injetor	40
Tabela 14:	Resultados dos valores obtidos na estabilidade de Efavirenz em plasma submetido a três ciclos de congelamento e degelo	41
Tabela 15:	Resultados da estabilidade de plasma dopado com solução padrão de Efavirenz	41
Tabela 16:	Varição das médias dos controles de qualidade para as soluções padrão mantidas 6 horas à temperatura ambiente e soluções padrão depois e 27 dias sob refrigeração em relação às médias das soluções recém-preparadas	42

RESUMO

Foi desenvolvido e validado um método de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) para quantificação de Efavirenz (Inibidor da Transcriptase Reversa Não Nucleosídeos) em plasma humano o qual se mostrou ser exato, sensível e seletivo. Foi adicionado Loratadina como padrão interno e acetonitrila nas amostras de plasma para precipitação das proteínas. Ambos compostos foram analisados utilizando uma coluna C-18 ,5 μ , (150 x 4,6 mm) e uma fase móvel composta de acetonitrila , água e ácido fórmico na proporção de (70:30:0,1%; v/v/v). Os compostos foram monitorados utilizando Electrospray nos modos negativo para Efavirenz e no modo positivo para Loratadina. As análises eram realizadas por monitoramento de reações múltiplas (SRM) usando a molécula desprotonada combinada com o fragmento iônico de m/z 314,2 > 68,41 (Efavirenz) e m/z 383,11 > 337,3 (Loratadina). A resposta foi calculada pela área do pico do analito pela área do padrão para quantificação do Efavirenz. O limite de quantificação alcançado foi de 10,0 ng/mL. O estudo exibiu um intervalo dinâmico de 10,0 a 5000,0 ng/mL com um coeficiente de correlação (r^2) de pelo menos 0,98. Os resultados da validação demonstrados na linearidade, especificidade, precisão, exatidão e estabilidade das amostras analisadas demonstraram a aplicabilidade deste método analítico para estudos de bioequivalência.

ABSTRACT

An accurate, selective, and sensitive method for the determination of Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) Efavirenz (I) in human plasma, using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Plasma samples were spiked with internal standard Loratadine (II) and precipitated with 900 μ L acetonitrile. Both I and II (internal standard) were analyzed using a C-18 column (5 μ , 150 x 4,6 mm) and a mobile-phase composed of acetonitrile:water: formic acid (70:30:0,1; v/v/v). Eluted compounds were monitored using negative and positive mode electrospray (ES) tandem mass spectrometry to Efavirenz and Loratadine, respectively. Analyses were carried out by selected reaction monitoring (SRM) using the protonated molecule to ionic fragment combinations of m/z 314.2 > 68.41 (Efavirenz) and m/z 383.11 > 337.3 (Loratadine). The peak areas ratio (response) of the analyte and IS were used for quantification of I. The achieved limit of quantification (LOQ) was 10.0 ng/mL; the assay exhibited a linear dynamic range of 10.0-5000.0 ng/mL with a determination coefficient (r^2) of at least 0,98. Validation results on linearity, specificity, accuracy, precision and stability, as well as on application to the analysis of the samples taken, were performed. The study was performed according to FDA resolution demonstrating the applicability to bioequivalence studies.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. AIDS	1
1.1.1. Transmissão	2
1.1.2. Tratamento	2
1.1.3. Inibidores da Transcriptase Reversa	4
1.2. Políticas de Medicamentos e Genéricos	7
1.3. Estudos de Bioequivalência	8
1.4. Equipamentos e Técnicas Utilizadas Para Realização de Estudos de Bioequivalência	9
1.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	9
1.4.2. Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas CLAE-EM/EM	10
1.4.3. Ionização por Eletrospray (ESI)	12
2. OBJETIVO	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1. Equipamentos e Materiais	17
3.1.1. Material Biológico	17
3.1.2. Preparo das Soluções Usadas na Validação	17
3.1.3. Fase Móvel	17
3.1.4. Preparo dos Padrões de Calibração	18
3.1.5. Preparo Controle de Qualidade	18
4. RESULTADO E DISCUSSÃO	20
4.1. Desenvolvimento Padrão	20
4.1.1 Testes Realizados Para o Desenvolvimento de Método Para Quantificação de Efavirenz em Plasma	23
4.2. Resultado da Metodologia Analítica	28
4.2.1. Princípio do Método	28
4.2.2. Extração das Amostras	28
4.2.3. Condições Cromatográficas	29
4.2.4. Condições de detecção no espectrômetro de massas no modo MS/MS	29
4.3. Validação	29
4.3.1. Validação do Método Bioanalítico	29
4.3.1.1. Especificidade	29

4.3.1.2.	Curva de Calibração	35
4.3.1.3.	Determinação do limite de quantificação	35
4.3.1.4.	Linearidade	35
4.3.1.5.	Precisão e exatidão	36
4.3.1.6.	Determinação das concentrações dos controles de qualidade	36
4.3.1.7.	Validação intra-lote	36
4.3.1.8.	Validação inter-lotes	37
4.3.1.9.	Validação da Diluição	38
4.3.1.10.	Recuperação	39
4.4.	Resultados das estabilidades	40
4.4.1.	Estabilidade do fármaco em ciclos de congelamento e degelo	40
4.4.2.	Estabilidade das amostras de plasma não processadas	41
4.4.3.	Estabilidade de soluções padrão	42
5.	CONCLUSÃO	43
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
7.	ANEXO	47

1. INTRODUÇÃO

1.1. AIDS

A AIDS é uma doença que se manifesta após a infecção do organismo humano pelo Vírus da Imunodeficiência Humana, mais conhecido como HIV. Esta sigla é proveniente do inglês - *Human Immunodeficiency Virus*. Também do inglês deriva a sigla AIDS, *Acquired Immune Deficiency Syndrome*, que em português quer dizer Síndrome da Imunodeficiência Adquirida ⁽¹⁾.

Os primeiros casos de AIDS foram reconhecidos devido à aglomeração de casos de Sarcoma de Kaposi (SK) e Pneumonia pelo *Pneumocystis carinii* (PPC) em pacientes homossexuais masculinos, procedentes de grandes cidades norte-americanas (Nova York, Los Angeles e São Francisco). Embora já reconhecidas anteriormente, essas doenças apresentam características próprias (a pneumocistose, por exemplo, ocorria em pacientes com câncer em estágios avançados, já o SK era bem conhecido em indivíduos idosos, procedentes da bacia do mediterrâneo) ⁽²⁾.

Como muitos dos pacientes inicialmente diagnosticados eram homossexuais houve a suspeita de que a doença estivesse de alguma forma ligada a este estilo de vida. Logo se percebeu, entretanto, que havia casos entre heterossexuais e crianças recém nascidas. Ainda assim, certas características epidemiológicas permaneciam sugerindo uma etiologia infecciosa, transmitida por via sexual, vertical e parenteral ⁽²⁾.

Muitos estudos foram iniciados na tentativa de identificar-se o agente etiológico da AIDS, possivelmente um vírus, já que parecia pouco provável que outro tipo de microorganismo pudesse causar uma doença com essas características sem ser identificado. O Citomegalovírus (CMV), o vírus Epstein-Barr (EBV) e o vírus da hepatite B encabeçaram a lista dos suspeitos inicialmente. Todavia, esses já eram vírus conhecidos, e a doença sob investigação era nova, o que indicava que um vírus até então desconhecido fosse o agente etiológico da doença ⁽²⁾.

Segundo Pinel & Inglesi 1984, dois grupos de cientistas reclamaram para si a descoberta de um retrovírus que seria o agente etiológico da AIDS. O primeiro grupo do Instituto Pasteur de Paris, chefiado pelo Dr. Luc Montagnier; e o segundo nos Estados Unidos, chefiado pelo Dr. Robert Gallo. Inicialmente o agente etiológico da AIDS foi denominado HTLV - 3, pelos americanos, e os franceses preferiam chamá-lo LAV de vírus associado à Linfadenopatia, e posteriormente se chegou a um consenso de denominá-lo HIV, vírus da imunodeficiência humana.

O vírus HIV é um retrovírus também conhecido como RNA vírus, que formam a família dos Retroviridae que se caracterizam por ter um genoma constituído por RNA simples, o ciclo vital do HIV está representado na Figura 1.

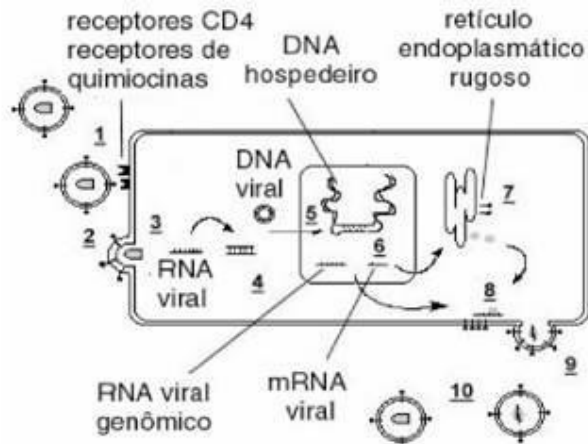


Figura 1 – Ciclo de Replicação do HIV

O ciclo vital do HIV na célula humana ocorre com a adesão do vírus ao linfócito TCD4 através da interação da GP 120 viral à proteína CD4. Com a fusão do envelope viral à membrana do linfócito TCD4 através da GP 41 o genoma viral entra na célula hospedeira. Para que ocorra a integração do DNA viral ao DNA da célula hospedeira é necessário a transcrição do RNA viral em DNA viral, através da transcriptase reversa. Com a integração ocorre a replicação do genoma viral e síntese de proteínas virais precursoras que através das proteases que formam proteínas virais funcionais conforme a figura acima ^(3,4).

O linfócito TCD4, percebendo sua deficiência funcional, produz a endonuclease que degrada seu DNA, causando a apoptose celular. Com a diminuição dos linfócitos TCD4, o indivíduo se torna imunodeficiente ⁽⁵⁾.

Quando o número de linfócitos TCD4 situa-se abaixo de 200 células por milímetro cúbico de sangue, considera-se que o indivíduo tem AIDS, de acordo com a definição americana. Nesses pacientes, podem se manifestar várias doenças, incluindo tipos específicos de infecção denominadas "oportunistas" e outras doenças relacionadas à AIDS ⁽⁴⁾.

1.1.1. Transmissão

A principal via de transmissão do HIV é representada pelos fluídos biológicos. A concentração do vírus varia em cada tipo de fluído. Aqueles particularmente infectantes são o sangue, o sêmen e as secreções cervico vaginais ⁽⁶⁾.

1.1.2. Tratamento

No período entre 1982 a 1989, a sobrevivência mediana no Brasil dos pacientes com AIDS maiores de 12 anos era de apenas 5,1 meses, após o diagnóstico da primeira infecção

oportunista, cerca de 50% dos pacientes morriam em menos de seis meses. Era o período crítico da epidemia. Muito pouco se sabia sobre a doença e a medicina se deparava estarrecida e impotente com um número de mortes cada vez maior ⁽⁷⁾.

A mudança deste cenário ocorreu em 1989 com a descoberta da Zidovudina- (AZT), que se mostrou eficaz inicialmente, mas que não alterava o tempo de sobrevivência. Anos depois, surgiram novas substâncias que, associadas ao AZT, aumentaram discretamente a sobrevivência das pessoas afetadas, chamada na época terapia dupla ⁽⁸⁾.

O avanço nas pesquisas científicas possibilitou o aparecimento, em 1996, de uma proposta terapêutica que demonstrou um aumento da sobrevivência, ficando popularmente conhecida como coquetel. Era a terapia anti-retroviral de alta potência. Essa terapia trouxe avanços inestimáveis, propiciando o esclarecimento de aspectos fundamentais da doença. A AIDS passaria a ser uma enfermidade crônica, compatível com sobrevivência e com preservação da qualidade de vida ⁽⁹⁾.

No Brasil, desde 1995, garantiu-se o acesso universal aos anti-retrovirais e a partir de 1996, frente ao ótimo resultado do “coquetel”, os medicamentos que o compõe são garantidos por lei federal. Atualmente, há 17 drogas que compõem o arsenal contra o HIV. Durante bastante tempo o AZT (lançado em 1987) foi o único remédio disponível para o controle do vírus ⁽⁷⁾.

O coquetel do dia seguinte: os medicamentos anti-retrovirais usados após a exposição accidental da pessoa ao vírus. No Brasil é preconizado após acidentes de trabalho, quando médicos ou pessoal da enfermagem se ferem com uma agulha ou objeto cortante contaminado; ou em vítimas de estupros ⁽⁷⁾.

Embora ainda não haja cura para a infecção pelo HIV e para a AIDS, uma das mais promissoras alternativas para ajudar as pessoas infectadas pelo HIV a conviver com a doença representada pelos medicamentos novos e mais potentes. O surgimento de novos agentes anti-retrovirais tem permitido avanços sem precedentes no combate ao HIV ⁽¹⁰⁾.

A ênfase do tratamento desviou-se da monoterapia para o uso de associações potentes de agentes anti-retrovirais. O objetivo da terapia anti-retroviral altamente ativa ("HAART") é reduzir a carga viral para níveis abaixo dos limites de detecção pelos testes mais sensíveis disponíveis, e manter esse efeito pelo maior tempo possível, no maior número de pessoas. A supressão da replicação viral permite a restauração do sistema imunológico, retarda a progressão da doença e melhora a saúde e o bem-estar das pessoas que convivem com o HIV ou a AIDS ⁽⁵⁾.

1.1.3. Inibidores da transcriptase reversa

Estes medicamentos : zidovudina (AZT), didanosina (ddl), zalcitabina (ddC), stavudina (d4T), lamivudina (3TC) e abacavir atuam inibindo a transcriptase reversa, enzima responsável pela conversão do RNA do HIV em DNA. Estes fármacos precisam sofrer fosforilação intracelular que os converte e sua forma 5'-trifosfato, a qual atua como um inibidor competitivo ou um substrato alternativo da RT. Se o inibidor for incorporado à cadeia de DNA, torna-se impossível a continuidade do crescimento desta. Assim, os NRTIs atuam como terminadores de cadeia, conforme Figura 2⁽¹¹⁾.

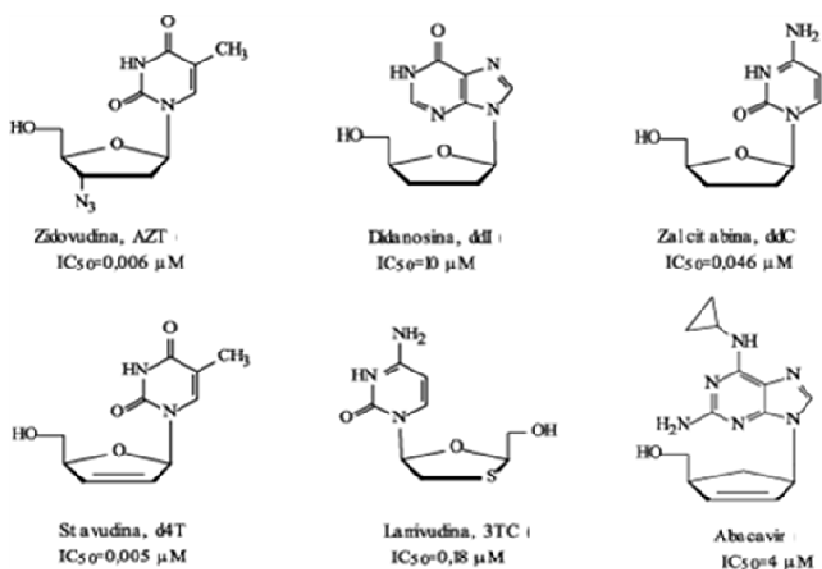


Figura 2 – Estruturas químicas de fármacos inibidores da transcriptase reversa

O ponto chave para a atividade anti-HIV dos análogos de nucleosídeos é a etapa inicial de fosforilação por cisases, conforme demonstrado na Figura 3⁽¹²⁾.

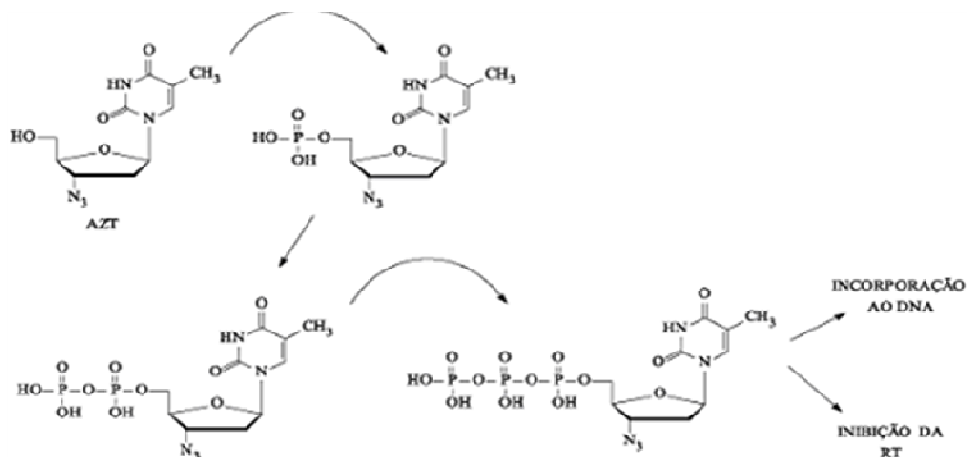


Figura 3 – Fosforilação intracelular do AZT

Os inibidores da transcriptase reversa foram os primeiros medicamentos a serem desenvolvidos contra o HIV e foram seguidos pelo desenvolvimento de outra classe, os inibidores da transcriptase reversa não-nucleosídeos (ITRNNs: Efavirenz, Nevirapina e Delavirdina). Embora atuem de formas diferentes, todos dificultam a atividade da transcriptase reversa ⁽¹²⁾.

No final da década de oitenta, dois compostos, HEPT e TIBO foram identificados como potentes protótipos anti-HIV em programas de seleção em cultura de células infectadas ⁽¹³⁾.

Posteriormente, foi verificada a alta potência e especificidade destes compostos na inibição da RT de HIV-1 ^(14,15). A descoberta destes novos inibidores estimulou o rastreamento de novos compostos com atividade semelhante, o que resultou na identificação da nevirapina ⁽¹⁶⁾ piridinonas como L-697,661 ⁽¹⁷⁾, bis(heteroaril), piperazinas (BHAP) como U-90152 delavirdina ⁽¹⁸⁾, TSAO-m³T ⁽¹⁹⁾, loviride ⁽²⁰⁾, além de compostos estruturalmente derivados de HEPT e TIBO, como MKC-442 ⁽²¹⁾ e tivirapina ⁽²²⁾, respectivamente. Estes derivados foram qualificados como inibidores de transcriptase reversa não nucleosídicos (NNRTI), com base em sua capacidade de interação específica com a RT de HIV-1. Atualmente, mais de trinta classes distintas de compostos, apresentando esta atividade farmacológica, foram identificadas. Três destes compostos, nevirapina, delavirdina e efavirenz, foram aprovados para o tratamento da infecção por HIV estão demonstrados na Figura 4 as estruturas químicas dos fármacos NNRTI ⁽²³⁾.

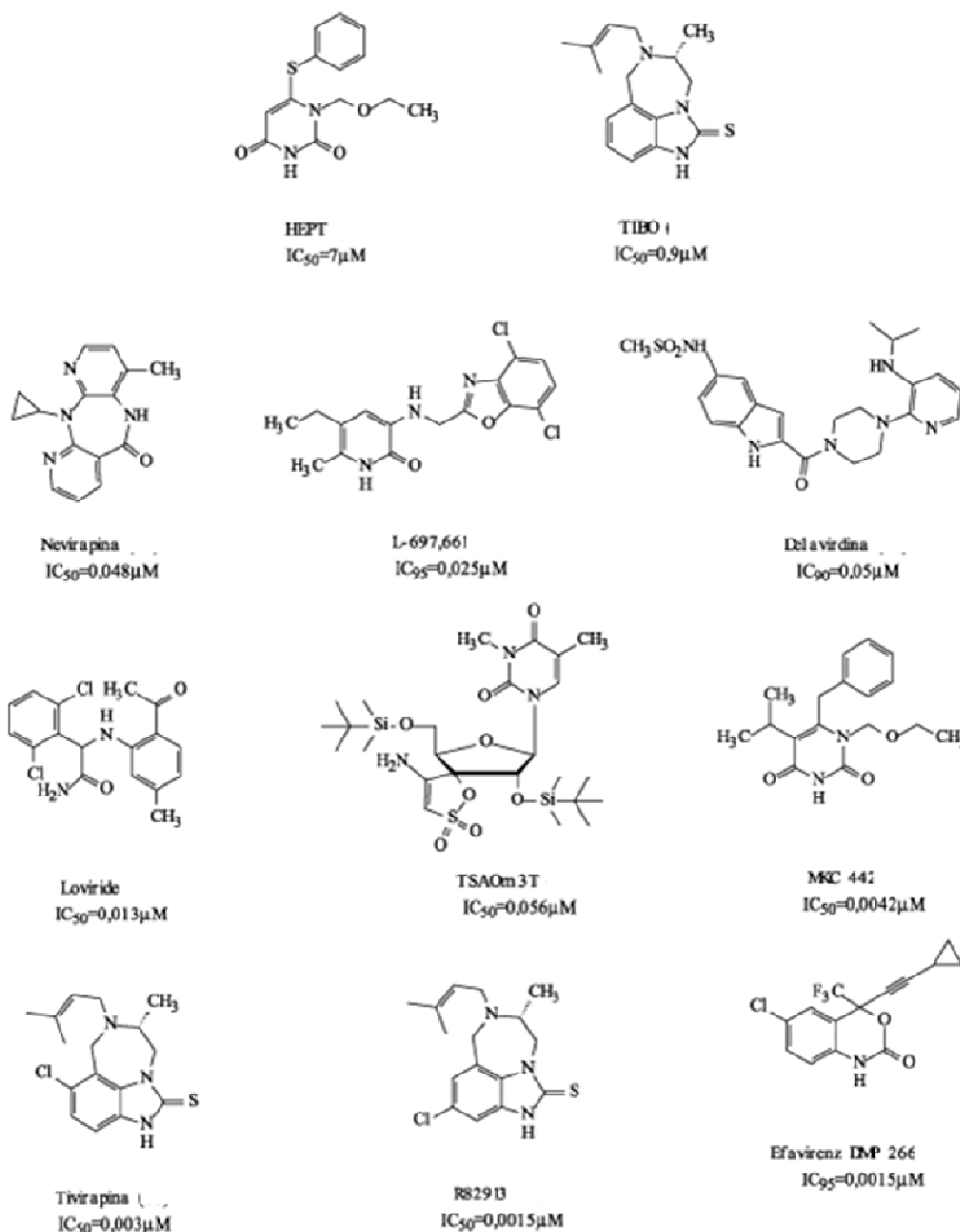


Figura 4 – Estrutura química de fármacos inibidores da transcriptase reversa não nucleosídios

A principal vantagem dos NNRTI sobre os inibidores nucleosídicos da RT é que não necessitam de uma etapa inicial de ativação intracelular, a fosforilação. Os NNRTIs não interagem com o sítio ativo da RT, mas sim com um sítio de ligação alostérico localizado a aproximadamente 10000pm de distância do sítio catalítico ⁽²⁴⁾.

1.2. POLÍTICAS DE MEDICAMENTOS E GENÉRICOS

No Brasil, é responsabilidade do Estado à formulação e execução de políticas econômicas e sociais que visem, entre outros, estabelecer condições que assegurem acesso universal às ações e serviços para promoção, proteção e recuperação da saúde. Em 1999 foi criada a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) um órgão vinculado ao Ministério da Saúde que tem por objetivo proteger e promover a saúde, garantindo a segurança sanitária de produtos e serviços. Assegurar a toda a população o acesso a produtos farmacêuticos de qualidade, que sejam eficazes, seguros, prescritos e usados racionalmente e a custos razoáveis, o que tem sido um desafio permanente em todos os países, especialmente os do terceiro mundo. A implantação de qualquer política para o setor passa, necessariamente, por ações de vigilância sanitária, destacando-se a fiscalização da qualidade de medicamentos, bem como da propaganda desses produtos ⁽²⁵⁾.

Disposto a enfrentar esse desafio, em 1998 o Ministério da Saúde promoveu a discussão sobre os genéricos e, em fevereiro de 1999, entrou em vigor a Lei dos Medicamentos Genéricos (Lei nº 9.787, de 10 de fevereiro de 1999). Os objetivos desta Lei: estimular a concorrência e a variedade de oferta no mercado de remédios, melhorar a qualidade de todos os medicamentos, reduzir os preços e facilitar o acesso da população aos tratamentos ⁽²⁶⁾.

Genérico é um medicamento que tem a mesma fórmula e produz os mesmos efeitos no organismo que um medicamento de referência (conhecido pela marca comercial). É muito fácil identificar um genérico: ele vem com uma tarja amarela, contendo uma grande letra G e a inscrição Medicamento Genérico ⁽²⁷⁾.

O medicamento genérico não tem nome comercial, é identificado apenas pelo princípio ativo da fórmula. Para serem registrados, os genéricos são submetidos a um rígido controle de qualidade, que assegura que o consumidor terá resultados exatamente iguais aos do medicamento de referência. Como reproduzem uma fórmula já bastante conhecida e não tem nome comercial, os genéricos dispensam investimento no desenvolvimento de novas fórmulas e principalmente em publicidade. Por isso custam mais barato que os medicamentos de referência ⁽²⁶⁾.

Quem avalia a qualidade dos remédios genéricos é a mesma instituição que verifica a qualidade e autoriza o comércio dos medicamentos de referência a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão do Governo Federal. Para garantir a qualidade do genérico, a ANVISA avalia os resultados do teste de bioequivalência ⁽²⁶⁾.

A bioequivalência é um estudo comparativo entre as biodisponibilidades do medicamento de referência e do genérico correspondente. Se não houver diferença entre a

velocidade e extensão de absorção dos dois medicamentos, isto quer dizer que eles são intercambiáveis ⁽²⁶⁾.

Todas as normas técnicas para a realização dos testes com os medicamentos foram regulamentadas pela ANVISA, Resolução-RDC nº 10, de 2 de janeiro de 2001 ⁽²⁸⁾.

Intercambialidade significa a possibilidade de troca de um medicamento por outro, obtendo exatamente o mesmo resultado terapêutico. Os medicamentos de referência são intercambiáveis com os genéricos ⁽²⁶⁾.

Para registrar e produzir um medicamento Genérico o laboratório apresenta para a ANVISA um projeto detalhado propondo a produção de um medicamento genérico correspondente a uma marca de referência. Se o projeto for aprovado, a empresa deve fabricar e apresentar à ANVISA três lotes preliminares do medicamento. Essa amostra será utilizada para os testes de qualidade necessários. Caso sejam preenchidas todas as exigências legais da empresa (licença de funcionamento, certificado de responsabilidade técnica, registro das matérias-primas, boas práticas de fabricação, entre outras) e do medicamento (descrição detalhada de todos os componentes e características físicas, químicas e de utilização, bioequivalência comprovada em relação ao medicamento de marca), o registro do medicamento genérico é aprovado pela ANVISA e publicado no Diário Oficial da União. A partir da data de publicação no Diário Oficial, o laboratório pode começar a produzir o genérico ⁽²⁶⁾.

Os medicamentos similares, tal como os genéricos, têm o mesmo princípio ativo do medicamento de referência. Entretanto, no registro dos similares não são exigidos os testes de bioequivalência ⁽²⁶⁾.

1.3. ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA

É o estudo que visa comparar as biodisponibilidades relativas de dois ou mais medicamentos administrados pela mesma via extravascular. São verificados a população de voluntários que participou do estudo (faixa etária, sexo, exames clínicos laboratoriais), os medicamentos utilizados (fabricante, dosagem, validade), o responsável clínico e o local do estudo, os resultados obtidos na etapa analítica (dosagem do fármaco no fluido biológico) e estatística (cálculo dos parâmetros farmacocinéticos e análise estatística dos valores obtidos), a adequação geral da metodologia, resultados e conclusão ⁽²⁶⁾.

Além disso, são observados os resultados obtidos na validação do método analítico, o que garante análise precisa e exata; a consonância do estudo em relação a outros conduzidos com o mesmo fármaco e publicados em revistas especializadas; a adequação da etapa clínica com a legislação pertinente e da etapa estatística ao desenho do estudo ⁽²⁹⁾.

Também são conferidos os resultados analíticos (por amostragem), recalculados os parâmetros farmacocinéticos, refazendo-se a análise estatística, quando necessário. Quando os resultados dos testes não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre os dados referentes à quantidade absorvida e a velocidade de absorção, obtidos a partir da administração de cada produto, sob condições idênticas, então os dois produtos são considerados bioequivalentes de acordo com ANVISA, Resolução nº 1.170 ⁽³⁰⁾.

Segundo o FDA, produtos bioequivalentes são equivalentes farmacêuticos ou alternativas farmacêuticas que, ao serem administrados na mesma dose molar e nas mesmas condições experimentais, não demonstram diferenças significativas na quantidade de fármaco absorvido e na velocidade do processo de absorção ⁽³¹⁾.

Os testes são realizados em voluntários sadios e consiste de três etapas, na etapa clínica ocorre à administração do medicamento genérico e de referência em períodos distintos, com a coleta de amostras de sangue ou urina em tempos determinados. Na etapa analítica ocorre a quantificação do fármaco nas amostras por meio de método específico e na etapa estatística, cálculo dos parâmetros farmacocinéticos e análise estatística para determinar a bioequivalência ou bioinequivalência ⁽³¹⁾.

Os testes de bioequivalência são realizados em centros habilitados e fiscalizados pela ANVISA, que, além de analisar os resultados dos testes, sempre orienta e verifica se os estudos estão sendo conduzidos de acordo com os requisitos estabelecidos pela legislação ⁽³²⁾.

A validação de um método analítico é um processo que fornece uma evidência documentada de que o método é confiável ao que se aplica. A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados ⁽³³⁾.

A ANVISA determinou a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bionalíticos” com o título de Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 do órgão emissor ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária, publicado no D.O.U – Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 02 de junho de 2003 (A Resolução 899 é a definição, segundo Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de como se deve realizar uma validação de um método bioanalítico ⁽²⁶⁾.

1.4. EQUIPAMENTOS E TÉCNICAS UTILIZADAS PARA REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA

1.4.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia é um método físico-químico de separação a qual uma mistura de compostos é eluída através de uma coluna cromatográfica ao qual cada componente da

mistura sai da coluna em tempos diferentes, devido 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 cromatografia uma técnica extremamente versátil e de vasta aplicação ⁽³⁴⁾.

A maior parte das purificações orgânicas é feita por cromatografia, uma técnica de separação que remonta ao trabalho do químico russo Tswett em 1903. Tswett descreveu a separação dos pigmentos de folhas verdes dissolvendo o extrato das folhas em um solvente orgânico e fazendo com que a solução escorresse por um tubo de vidro vertical cheio de pó de giz. Os pigmentos desciam a coluna em velocidade diferente, deixando uma série de bandas coloridas sobre a coluna branca de giz ⁽³⁵⁾.

A cromatografia líquida é talvez, o método cromatográfico utilizado com maior frequência. Assim como experimentos originais de Tswett, a mistura de compostos orgânicos dissolvida em um solvente adequado é adsorvida em uma fase estacionária, como a alumina (Al_2O_3) ou sílica gel (SiO_2 hidratado), em uma coluna de vidro. Deixa-se, então, passar mais solvente pela coluna e eluem-se os compostos diferentes em tempos diferentes ⁽³⁵⁾.

O tempo que um composto é eluído é fortemente influenciado por sua polaridade ⁽³⁶⁾.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma variação da técnica simples da coluna, baseado na descoberta de que as separações cromatográficas são muito melhoradas se a fase estacionária for feita de partículas esféricas muito pequenas e de tamanho uniforme. Um tamanho pequeno para as partículas garante uma grande área superficial para melhor absorção, e a forma esférica uniforme permite um empacotamento apertado e uniforme. Na prática, em geral se usam micro esferas de sílicas especialmente preparadas e revestidas, com tamanho de 10 a 25 μm . Apenas 15g destas micro esferas possuem área superficial igual à de um campo de futebol ⁽³⁶⁾.

São necessárias bombas de alta pressão para forçar o solvente através de uma coluna empacotada de CLAE e usam-se detectores sofisticados para monitorar a eluição do material da coluna ⁽³⁶⁾.

1.4.2. Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas CLAE-EM/EM

Uma das técnicas analíticas que alcançou extrema importância no elenco de técnicas disponíveis para a indústria farmacêutica foi a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial ⁽³⁷⁾.

A aplicação da espectrometria de massas à análise de compostos orgânicos já tem sido bastante utilizada nas indústrias. Faz mais de 70 anos desde sua primeira aplicação e mais de 30 anos desde o surgimento do primeiro sistema comercial que acoplava a espectrometria de massas à cromatografia gasosa (utilizando colunas capilares) ⁽³⁸⁾.

As características ideais para um “detector” (analisador de massas) em qualquer sistema cromatográfico é possuir alta sensibilidade assim como alta seletividade, boa resposta a um grande número de classes de compostos e habilidade na detecção de misturas complexas permitindo um elevado número de análise. É também indispensável que o detector possa ser utilizado em análises quantitativas. Todas essas características são encontradas no analisador por espectrometria de massas ⁽³⁹⁾.

O desenvolvimento de técnicas de ionização à pressão atmosférica, tais como a ionização química à pressão atmosférica ("APCI") e a ionização por eletronebulização ("*electrospray*, ESI") possibilitaram a união viável e efetiva de duas poderosas ferramentas analíticas, a espectrometria de massas (EM) com a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), tornando-as um método (CLAE-EM) robusto e aplicável a uma grande variedade de matrizes ⁽³⁸⁾.

No Brasil, segmento que vem ganhando cada vez mais importância econômica, inclusive trazendo divisas com a prestação de serviços na área de química analítica, é a análise de fármacos em amostras de plasma utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (CLAE-EM/EM, Figura 1) para desenvolvimento de medicamentos genéricos. O impacto e a velocidade de crescimento da CLAE-EM/EM são tão grandes que, mesmo para moléculas tradicionalmente analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), como é o caso dos esteróides, a CLAE-EM/EM apresenta enormes vantagens, principalmente em relação à simplicidade da preparação da amostra (na maioria dos casos não necessita a execução de uma etapa de derivação) e tempo de análise, normalmente inferior a 5 min, o esquema da espectrometria de massas esta demonstrada na Figura 5 e ilustrado na Figura 6 ⁽³⁷⁾.

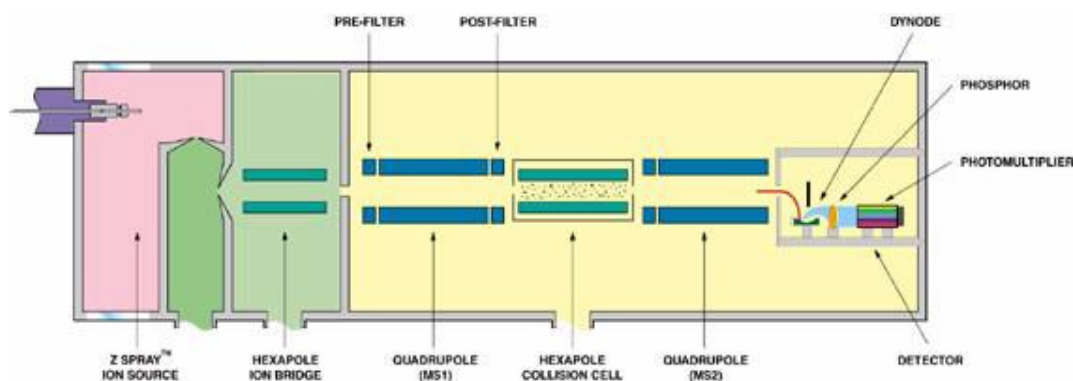


Figura 5: Esquema da espectrometria de massas



Figura 6: Espectrômetro de massas sequencial acoplado ao CLAE

1.4.3. Ionização por *Electrospray* (ESI)

A ionização por *electrospray* (ESI) é um tipo de ionização a pressão atmosférica (API) vastamente utilizada para a análise de fármacos. Este tipo de ionização compreende três etapas: ionização em solução, separação de cargas e transferência de íons das gotas carregadas para fase gasosa ⁽³⁷⁾.

A ESI foi baseada em um conceito desenvolvido inicialmente por M. Dole, mas foi J.B Fenn que demonstrou sua aplicabilidade para pequenas moléculas e proteínas desenvolvendo a fonte de ESI. Em 1988 John Fenn recebeu o Prêmio Nobel em Química de 2003 sendo ele o inventor da técnica de *electrospray*, a fotografia de J.B. Fenn está apresentada na Figura 7 ⁽³⁹⁾.

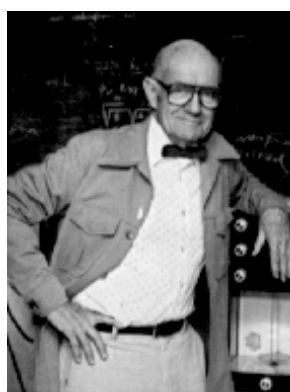


Figura 7: JOHN B. FENN - Inventor da técnica de *electrospray*

A ESI transfere para a fase gasosa moléculas polares de pequenas até grandes massas moleculares, que frequentemente são termicamente instáveis, permitindo a análise por espectrometria de massas de biomoléculas como proteínas. Isto era impossível utilizando fontes de ionização clássicas como ionização por elétrons (EI, ionização por elétrons) onde somente compostos previamente volatilizados poderiam ser ionizados. Como EI é um processo de ionização mais enérgico, geralmente as moléculas se fragmentam e às vezes o íon molecular não é observado no espectro. A técnica de ESI por ser um método brando de ionização, permite a análise de moléculas pequenas (~600 Daltons) observadas principalmente na sua forma mono-carregada, permitindo a visualização de íons intactos mesmo em misturas complexas. Íons multi-carregados podem ser observados em casos de moléculas maiores ⁽³⁹⁾.

Por trabalhar com moléculas em solução e ser compatível com os solventes mais frequentemente usados em CLAE por fase reversa (metanol, água e acetonitrila), a ESI pode ser utilizada como interface entre separações por CLAE e identificação dos compostos por espectrometria de massas simples (EM) ou EM/EM. Para facilitar a protonação de sítios básicos ou a desprotonação de sítios ácidos, é comum adicionar um modificadores orgânicos (ácido fórmico, hidróxido de amônio, acetato de amônio) à solução. Para analisar moléculas com sítios básicos é adicionado mais ou menos 0,1 % de ácido fórmico a solução e para sítios ácidos adiciona-se mais ou menos 0,1 % de hidróxido de amônio ⁽³⁹⁾.

A ionização através da técnica de ESI ocorre em solução, após esta ionização em solução o sal formado passa por um capilar com alto potencial (positivo se o analito estiver protonado e negativo se o analito estiver desprotonado), assim as cargas são separadas devido a oxidação de ânions (analito positivo atravessa o capilar sem alteração) e redução de cátions (analito negativo atravessa o capilar sem alteração) ⁽³⁹⁾.

Após a separação de cargas vão se formar gotas por nebulização que tem excesso de cargas positivas (ESI+) ou excesso de cargas negativas (ESI-). Para tentar explicar o fenômeno de transferência destes íons dentro das gotas para fase gasosa existem dois modelos: modelo de evaporação de íons (IEM) e modelo do resíduo carregado (CRM) ⁽³⁹⁾.

Em Sawaya ⁽³⁹⁾ descreve o processo da seguinte forma: a solução com o analito ionizado de uma bomba seringa ou de um sistema de CLAE, numa dada vazão é inserida na capilar ao qual é aplicado um alto potencial positivo para promover a separação de cargas (ionização em modo positivo) ou negativo para desprotonação (ionização em modo negativo). O nitrogênio é normalmente usado como gás de nebulização. Através da divisão e evaporação das gotas contendo em excesso de carga (positivas ou negativas dependendo do modo de aquisição) os íons são transferidos para fase gasosa e atraídos para dentro do espectrômetro de massas por um gradiente de potenciais. Uma contra corrente de nitrogênio é aplicada para evitar a formação de agregados de íons (clusters) e entrada de moléculas neutras para o espectrômetro de massas.

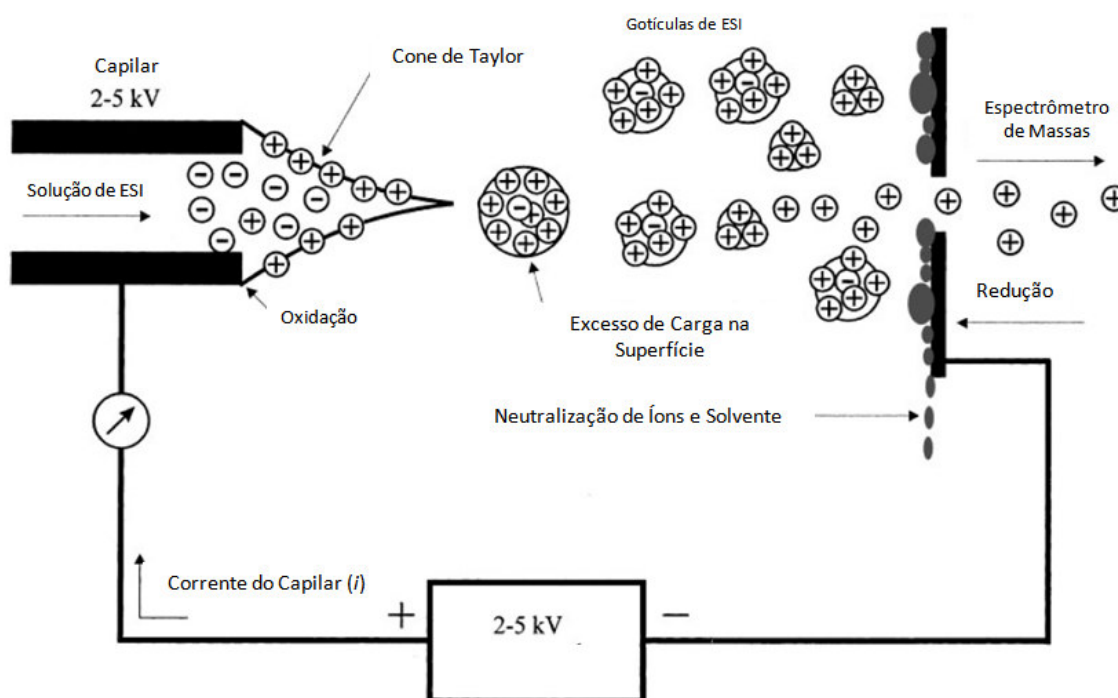


Figura 8: Fundamento do *Electrospray*

A Figura 8 mostra uma solução da amostra em pH ácido ou básico (ou “neutra” de um sal) submetida a um spray eletrolítico sob pressão atmosférica. Um fino spray (aerosol) se forma (cone de Taylor) na presença de um alto campo elétrico de +4000V (ou – 4000V). O contra-íon é oxidado (ou reduzido) e formam-se gotas com excesso de carga positiva (ou negativa). O solvente evapora, e o volume das gotas é reduzido, e as gotas se subdividem. Eventualmente, devido a alta repulsão entre os íons de mesma carga, ou se formam gotas contendo apenas um íon (modelo CRM) ou íons evaporam (são “ejetados”) das gotas para a fase gasosa (modelo IEM de evaporação) ⁽⁴⁰⁾.

Os íons vão para dentro do espectrômetro de massas onde se encontra um analisador de massas quadrupolar. Os analisadores de massas quadrupolar (Q) são compostos de quatro barras paralelas e cilíndricas de aço inox. As barras opostas são conectadas eletricamente, as barras adjacentes aplicam-se uma voltagem (DC) e uma radio frequência (RF), que leva os íons a oscilar dentro dos quadrupolos. Dependendo da voltagem DC e RF e frequência da voltagem RF aplicadas, apenas uma relação massa carga (m/z) apresenta trajetória estável dentro do quadrupolo, atingindo o detector. Esta relação pode ser fixa (para selecionar e permitir a passagem de somente uma m/z) ou pode variar permitindo a varredura e subsequente detecção de todos os íons no quadrupolo. Quadrupolos com voltagem RF somente (Q) permitem a passagem de todos os íons acima de uma m/z definida e podem ser usados como focalizadores de íons ou como câmaras de colisão, para dissociação induzida por colisão (CID), por exemplo. É comum o uso de vários quadrupolos em seqüência (Q-q-Q) ou o uso de quadrupolos em espectrômetros de massa híbridos (Q-q-Tempo de Vôo(TOF)), com a finalidade de primeiro selecionar um íon, depois dissociar e finalmente analisar os fragmentos produzidos, na Figura 9 está demonstrando uma analisador de massas quadrupolar ⁽³⁶⁾.

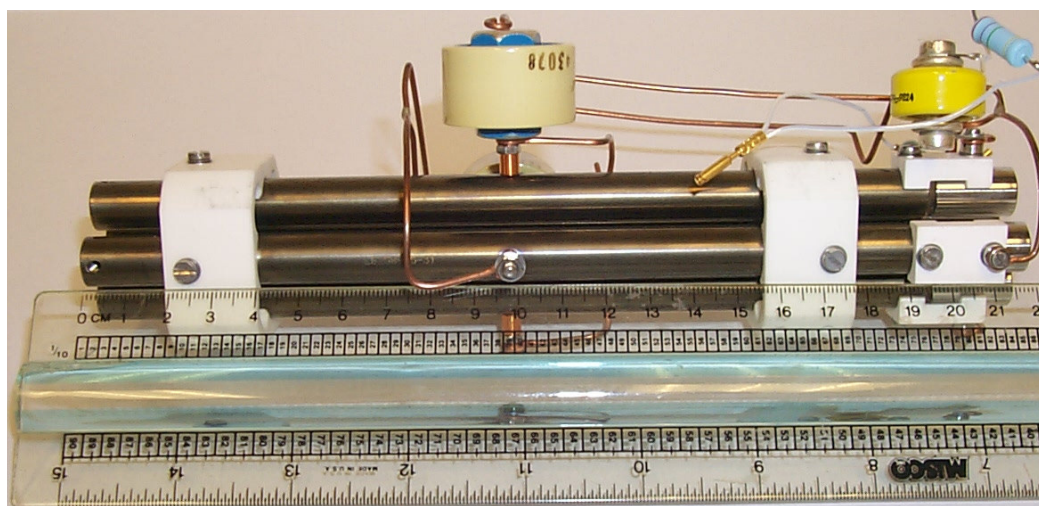


Figura 9: Analisador de Massas Quadrupolar

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método bioanalítico para Determinação de Efavirenz em plasma humano por Cromatografia Líquida, acoplado à Espectrometria de Massas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

Os equipamentos e materiais utilizados foram: pipetas de volume variável da marca Gilson originada da França; ponteiras de pipeta descartáveis da marca Axygen originada dos Estados Unidos; mesa agitadora da marca Fine PCR originada da Coréia; misturador (Vortex) da marca Phoenix originada dos Estados Unidos; balança analítica da marca Precisa 40 SM-200^a originada da Alemanha; espectrômetro de massas da marca Micromass® de modelo Quatro Micro; bomba analítica da marca Shimadzu e de modelo LC 20 AT; auto-Injetor da marca Shimadzu e modelo Sil 20 AC; controladora da marca Shimadzu de modelo SCL 10 a VP; programa Micromass versão Masslynx 4.0; degaseificador da marca Shimadzu e de modelo DGU 20A.

3.1.1 Materiais Biológicos

Os materiais biológicos necessários foram coletados de indivíduos diferentes, para preparar os padrões da curva de calibração e as amostras de controle de qualidade. Foram coletados plasma humano normal, plasma humano lipêmico e plasma humano hemolisado.

3.1.2 Preparo de Soluções

Todas as soluções preparadas foram transferidas para frascos de vidro rotulados, com batoque e tampa de rosca, armazenadas em geladeira à 4^o C e substituídas de acordo com os prazos de validade pré-determinados. Para o Efavirenz uma massa correspondente a 0,01248 g de padrão Efavirenz (100% de teor) foi pesada, colocada em um balão volumétrico (25,0 mL) e preparada em acetonitrila obtendo uma solução de concentração 499,2 µg/mL de Efavirenz e para Loratadina uma massa correspondente a 0,00509 g de padrão Loratadina (teor: 99,9%) foi pesada, colocada em um balão volumétrico (50,0 mL) e preparada em acetonitrila a obtendo uma solução de concentração 101,6 µg/mL de Loratadina.

3.1.3. Fase Móvel

Em um proveta 1000 mL mediu-se 700 mL de acetonitrila, em outra proveta mediu-se 300 mL de água Milli-Q. Transferiu-se ambos os volumes para um erlenmeyer, e adicionou-se 1 mL de ácido fórmico. Após a mistura e homogeneização das soluções, a mesma foi filtrada e, antes do uso, degaseificada.

3.1.4. Preparo da curva de calibração

A curva de calibração inclui a análise de uma amostra branco (matriz biológica isenta de padrão do fármaco e do padrão interno), uma amostra zero (matriz biológica com adição de padrão interno) e de amostras contendo padrão do fármaco e padrão interno, contemplando a faixa prevista de concentrações que se pretende analisar. A curva de calibração foi preparada adicionando-se o analito a ser analisado ao plasma humano. Foram utilizadas duas mães em plasma no preparo da curva de calibração uma de concentração de 50000 ng/mL que foi utilizada para preparo dos pontos de maior concentração e uma outra de concentração 500 ng/mL para os dois primeiros pontos da curva de concentração baixa, foram preparados 10 mL de cada ponto de curva. Os dados referentes ao preparo dos padrões da curva de calibração estão apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 - Preparo da Curva de Calibração para o Efavirenz

Nível	Amostra	Concentração no Plasma (ng/mL)	Volume Pipetado (mL)	Concentração da solução de Efavirenz utilizada (ng/mL)
B	BRANCO	-	-	
Z	ZERO	-	-	
1	Efavirenz	10,00	0,2	500,0
2	Efavirenz	50,00	1,0	500,0
3	Efavirenz	500,00	0,1	50000
4	Efavirenz	1000,00	0,2	50000
5	Efavirenz	1500,00	0,3	50000
6	Efavirenz	2000,00	0,4	50000
7	Efavirenz	3000,00	0,6	50000
8	Efavirenz	5000,00	1,0	50000

3.1.5. Preparo dos controles de qualidade

Foi preparado o controle LQ utilizado para determinar o Limite de Quantificação (LQ) do método analítico. E os controles de qualidade baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA) para monitorar a precisão e exatidão do método analítico. Foram preparados 10 mL de cada controle. Os dados referentes ao preparo dos controles de qualidade estão apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 - Preparo dos Controles de Qualidade

CQ	Analito	Concentração No Plasma (ng/mL)	Concentração da solução de efavirenz utilizada (ng/mL)
LQ	Efavirenz	10,00	500,0
CQB	Efavirenz	30,00	500,0
CQM	Efavirenz	1900,00	5000,0
CQA	Efavirenz	3800,00	5000,0

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1. DESENVOLVIMENTO PADRÃO

O desenvolvimento iniciou-se na pesquisa bibliográfica, onde obteve-se o maior número de informações do fármaco, como concentração máxima do fármaco no plasma (C_{max}), o tempo onde ocorre a maior concentração (T_{max}), o tempo de meia vida, além da solubilidade e polaridade.

A Técnica de Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de massas sequencial, é complexa e cada desenvolvimento de metodologia tem sua particularidade, além da sintonia de todos os parâmetros do equipamento, como voltagem do capilar, modo de ionização, temperaturas, resolução entre outros, precisamos escolher os solventes para preparo de soluções, a coluna cromatográfica, fase móvel e fluxo.

A primeira etapa do desenvolvimento se dá através da escolha do solvente de preparo da solução onde deve ser observada sua solubilidade. Preparadas as soluções inicia o desenvolvimento diretamente no equipamento, onde através de uma bomba de infusão manual num fluxo de 10 a 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ de uma solução que pode variar de 100 a 1000 ng/mL são infundidos no equipamento. O fluxo não deve ser superior ao citado acima, pois nesta fase ainda não temos fase móvel e a solução é infundida diretamente no equipamento o que pode ocasionar em contaminação, dificultando o desenvolvimento, assim como a concentração também não deve ser superior. O fluxo e as concentrações também não devem ser inferiores a faixa acima pois o fluxo muito baixo e concentrações muito baixas pode ocasionar baixa sensibilidade necessária para o início do desenvolvimento.

O primeiro passo para o início dos trabalhos no espectrômetro de massas é a confirmação de massa teórica do composto de interesse contida na solução infundida utilizando a função de scan MS, selecionando uma faixa de massas que compreenda a massa nominal, obtendo assim o espectro de MS. Com a confirmação da Massa teórica é realizado uma pré-otimização das condições de equipamento, onde é variado valores do capilar, cone, RF, temperatura do bloco, temperatura de dessolvatação, gás do cone.. O caminho percorrido pela amostra até a chegada ao quadrupolo está demonstrado na Figura 10.

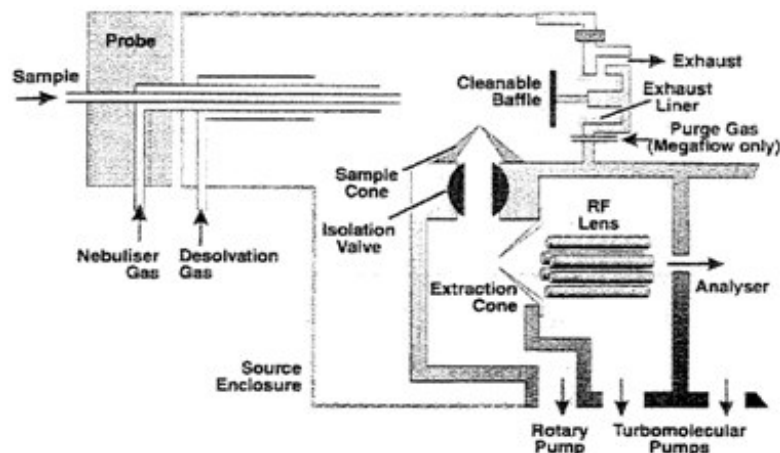


Figura 10 - Esquema demonstrando o caminho percorrido por uma amostra até a sua chegada nos quadropolos: a amostra é inserida na probe, sofrendo a ação de gases nebulizadores e dessolvatores, passa pelo cone e vai de encontro ao cone de extração passando por um sistema de lentes e seguindo em direção ao analisador.

A segunda etapa do desenvolvimento compreende a obtenção do espectro de MS/MS. Com a massa do “íon Precursor” selecionada no primeiro quadropolo, abriu-se o gás de colisão, geralmente o argônio, para fragmentação da molécula que ocorre no segundo quadropolo, no terceiro quadropolo é feita uma varredura de massas a fim de selecionar os fragmentos mais intensos do “íon precursor”, o objetivo de selecionarmos o íon precursor e em seguida seu fragmento é obter a função SRM.

Todo procedimento feito para o fármaco ou analito deverá ser repetido para o padrão interno que tem como função corrigir algum erro que possa ocorrer durante a extração, como tem sempre a mesma concentração e está em canal diferente, conseguimos observar se ocorreu algum problema observando seu desvio padrão, pois nosso método de quantificação é através da razão droga por padrão interno que nos gera uma concentração, se ocorrer algum problema de extração pode-se observar a concentração e analisar se o padrão interno corrigiu ou não tal erro. O padrão interno deve ser escolhido de acordo com sua solubilidade, função orgânica, polaridade que deverão ser parecidas com as características do analito.

A terceira etapa é a função SRM, onde com a massa selecionada para o íon precursor no primeiro quadropolo e o fragmento selecionado, otimiza-se a energia do cone e a energia de colisão.

Deve-se fazer três funções SRM onde foi variado os fragmentos mais intensos para o analito e para o padrão interno, com o objetivo de aumentar a seletividade do equipamento, onde será escolhido o melhor entre eles, o que obtiver maior sensibilidade e com menor número de interferentes.

A quarta etapa envolve o CLAE e não mais infusão manual, e tem por objetivo a otimização da fase móvel e estacionária. Para otimização da coluna inicia-se os teste, geralmente com uma Coluna C-18 em fase reversa de menores diâmetros possíveis onde serão avaliadas as separações cromatográficas e a simetria das bandas. Se não for possível a utilização da C-18, testa-se a C-8, Fenil, Sílica entre outras para serem utilizadas como fase estacionária. Nesta etapa também otimizamos a fase móvel, onde variou-se as proporções de solvente orgânico e aquoso.

Iniciou-se os testes com 100% de solvente orgânico, onde foi escolhido o melhor observando o tempo de retenção, altura da linha base, altura da banda, área, após a escolha do solvente, foi variada as proporções de solvente aquoso, sempre observando os parâmetros citados acima. Após a escolha das proporções de solventes orgânicos e aquoso foi adicionado um modificador orgânico de acordo com as características ácido-base dos fármacos, onde para fármacos básicos adicionamos como modificador orgânico ácido fórmico (AcF), ácido tricloroacético (TCA), ácido trifluoroacético (TFA) e para fármacos ácidos adiciona-se acetato de amônio (AcNH₄), hidróxido de amônio (NH₄OH) .O intuito de adicionar os modificadores orgânicos é facilitar a protonação de sítios básicos ou a desprotonação de sítios ácidos. Após a escolha da fase móvel e estacionaria, utilizando o auto-injetor, injetou-se as soluções para sintonia fina das condições do espectrômetro de massas.

Com os equipamentos otimizados fez-se os testes de contaminação cruzada onde injetou-se soluções do analito e do padrão interno a fim de verificar se existe interferente de padrão interno no canal do analito e do analito no canal do padrão interno.

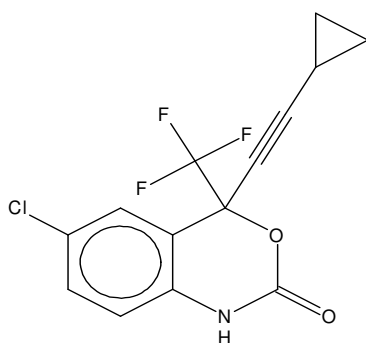
Com os equipamentos otimizados e com os testes de contaminação realizados iniciou-se os testes de extração onde foram testados vários solventes e avaliado o melhor de acordo com a sua recuperação. Nas extrações líquido-líquido seguem-se os seguintes passos: alíquota da matriz com adição de fármaco, a alíquota geralmente varia de 100 a 500 µL , pois se acima de 500 µL pode-se ocorrer problemas na extração, onde precisa-se de maior quantidade de solvente, e muita agitação e se as alíquotas forem menor, poderemos ter problemas pra extrair o fármaco do plasma, adicionar uma alíquota de Padrão Interno preparado em solução onde esta alíquota também deve ser controlada, geralmente de 25 uL a 150 uL, pois se tratando de Padrão Interno sua concentração é alta e podemos alíquotar um volume menor, ao contrário do analito, que partimos de concentrações baixas então foi aumentando, homogeniza-se em mesa agitadora para realização da reação ácido base, homogeniza-se e adiciona-se o solvente (Acetato de Etila, Hexano, Clorofórmio, Éter, Diclorometano, misturas de solventes como por exemplo hexano/acetato de etila (na proporção 50:50 v/v), agita-se, centrifuga-se para separação das

fases orgânica e aquosa, transfere-se a fase orgânica, seca-se sob fluxo de Nitrogênio e ressuspende-se no solvente de preparo da solução, homogeniza-se transfere-se pra insert e faz-se a injeção no equipamento. Após a escolha dos solventes, dos modificadores de reação ácido-base do solvente, faz-se a sintonia fina da extração onde varia-se os volumes das alíquotas de matriz, varia-se os tempos de agitação, a concentração dos modificadores de reações, volume do solvente, temperatura da centrífuga para obter melhor separação das fases.

Nas precipitações inicia-se com uma alíquota de matriz com fármaco (plasma) onde a alíquota deve ser baixa variando de 25 a 100 uL para facilitar a precipitação, adiciona-se padrão interno preparado em solvente e adiciona-se o solvente para precipitação, homogeniza-se, centrifuga-se para separação das fases, transfere-se a fase orgânica ou superior para insert e injeta-se. A mesma otimização da extração líquido-líquido deve ser feita para extrções do tipo.

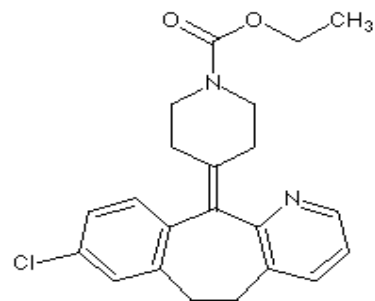
4.1.1. Testes realizados para o desenvolvimento de método para quantificação de Efavirenz em plasma humano.

Na primeira etapa preparou-se as soluções de Efavirenz (analito) e Loratadina (Padrão Interno) no solvente acetonitrila na concentração de 100 µg/mL e diluiu-se para 1 µg/mL. Iniciou-se então a infusão diretamente no Equipamento com o objetivo de confirmação da massa nominal utilizando a função scan MS. Operando o espectrômetro de massas em modo positivo obteve-se o espectro de massa do efavirenz e Loratadina , segue na Figura 11 as estruturas químicas de ambos e nas Figuras 12 e 13 o espectro de MS e MS/MS respectivamente para o analito.



a) Efavirenz

Massa Molecular : 315 g/mol



b) Loratadina

Massa Molecular: 382 g/mol

Figura 11 – Estrutura do (a) Efavirenz e (b) Loratadina

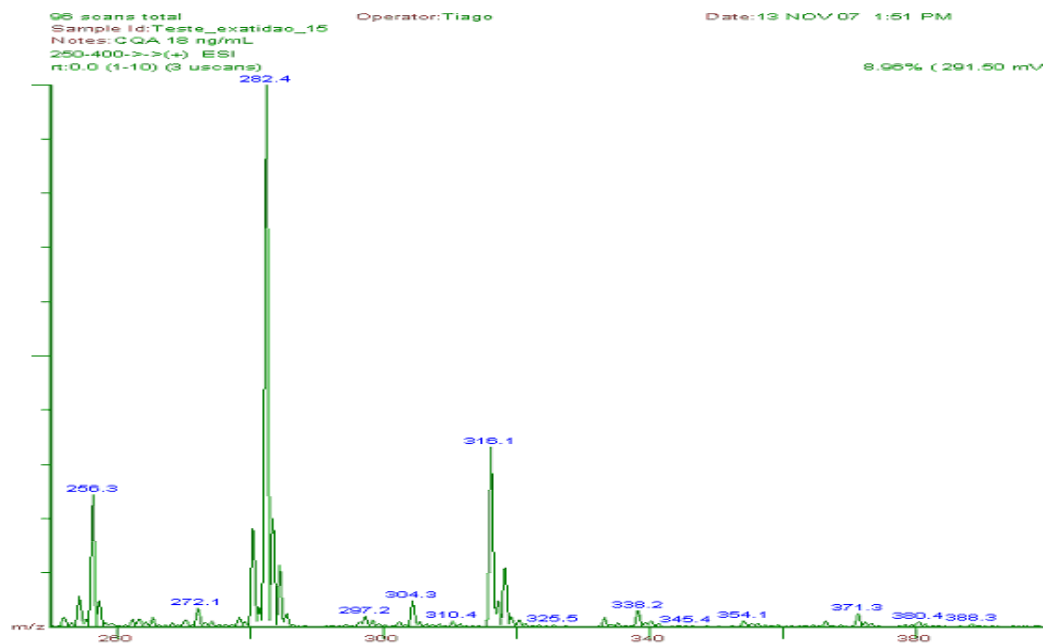


Figura 12 - Espectro de massas na função MS para Efavirenz.

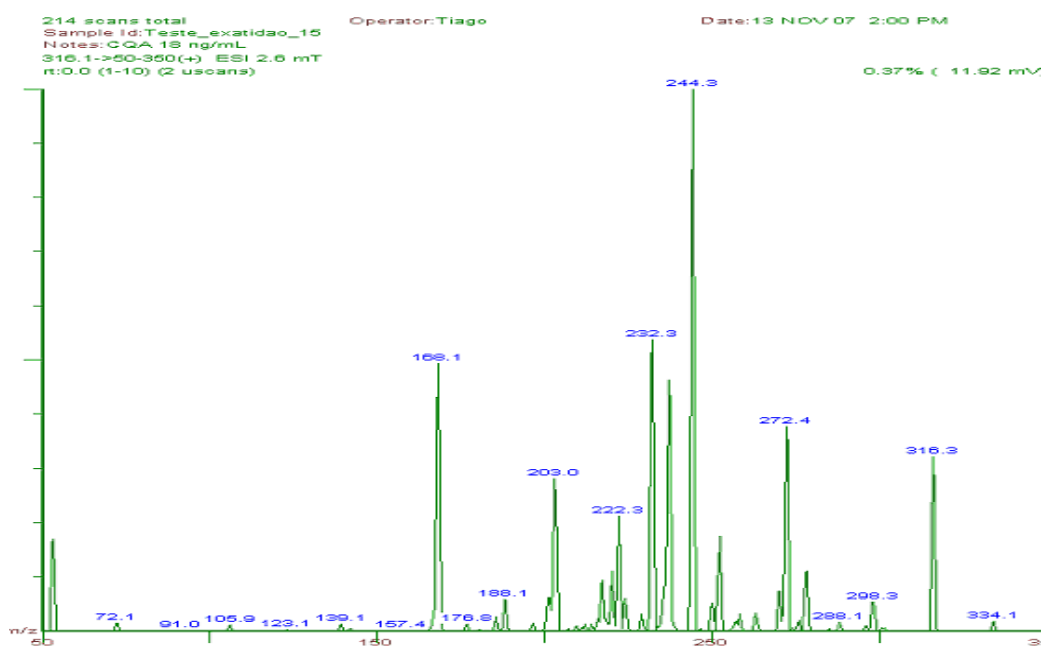


Figura 13 - Espectro de MS/MS para o Efavirenz.

Por ser de caráter anfótero o Efavirenz pode ionizar tanto em modo positivo como também em modo negativo, por esse motivo obteve-se também os espectros de MS e MS/MS com o equipamento operando em modo negativo, segue nas Figuras 14,15,16,17 os espectros de MS e MS/MS para efavirenz e para loratadina respectivamente.

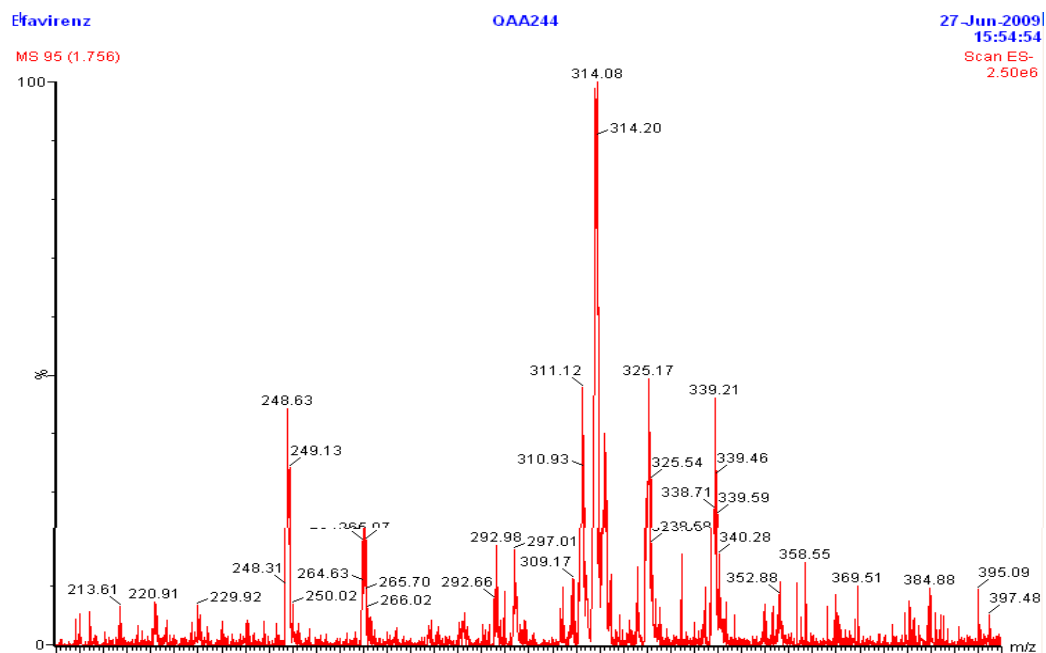


Figura 14 - Espectro de Massas função MS operando em modo negativo para Efavirenz.

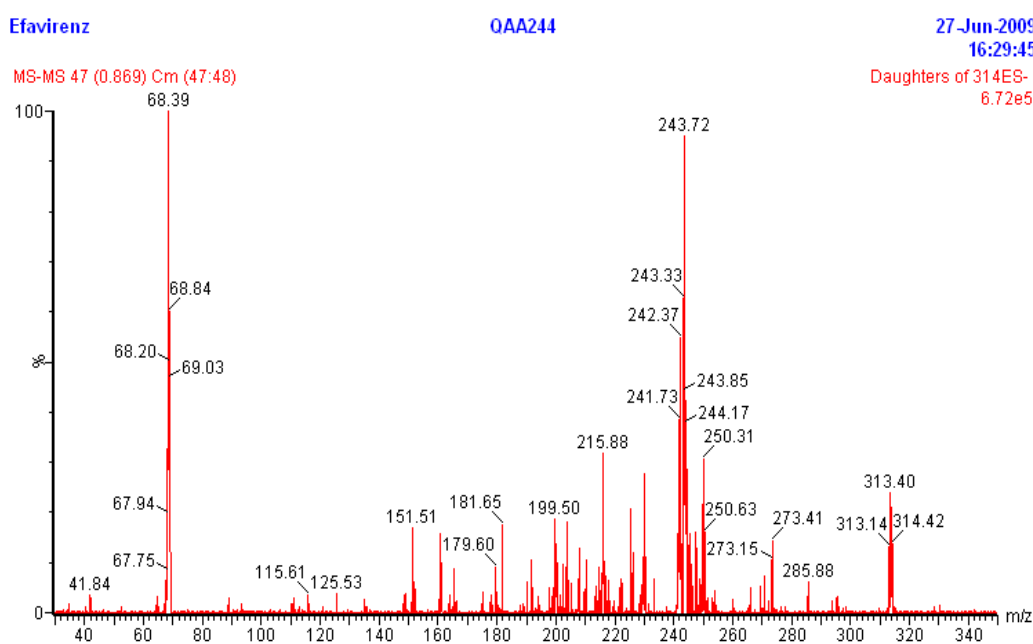


Figura 15 - Espectro de MS/MS para Efavirenz em modo negativo.

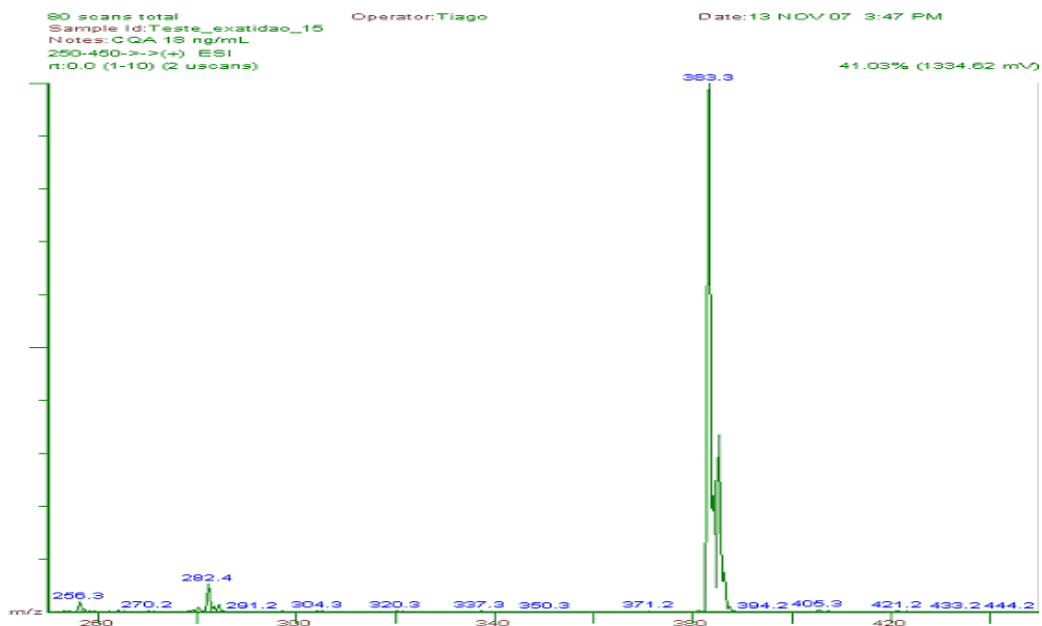


Figura 16 - Espectro de massas na função MS para Loratadina (Padrão Interno).

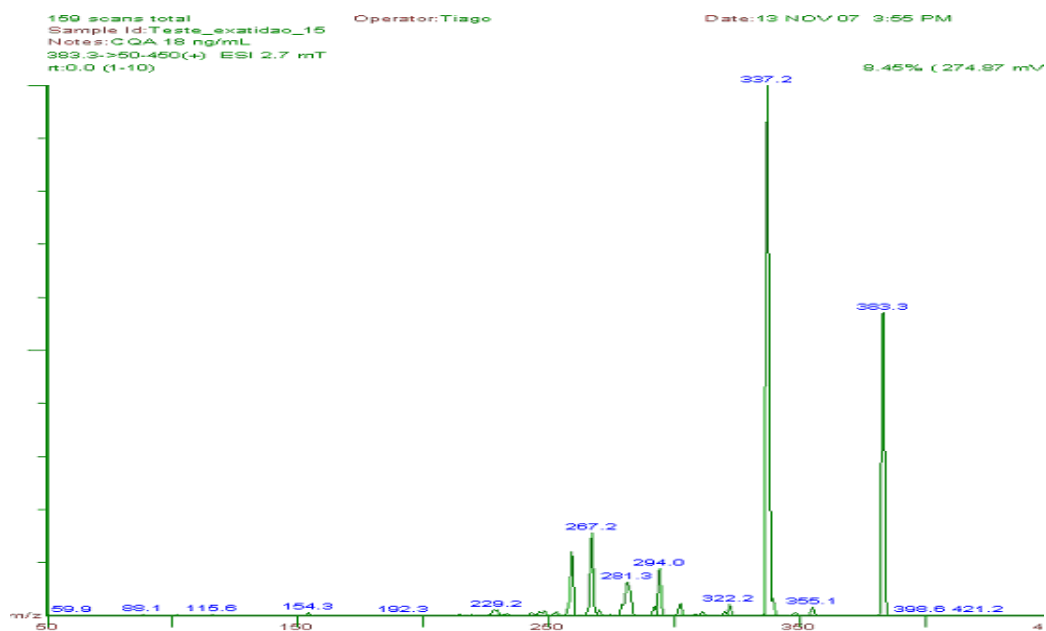


Figura 17 - Espectro de MS/MS para Loratadina (PI) .

Após a função MRM montada e com o equipamento pré-otimizado, iniciou-se os testes de fase móvel e estacionária utilizando como fase estacionária a coluna Luna C-18 (5 μ , 150 x 4,6 mm).

Para a otimização da fase móvel utiliza-se uma solução de Efavirenz 1 μ g/mL, os testes foram feitos com uma fase móvel de metanol 100% e logo em seguida injetou-se a

mesma solução com uma fase móvel de acetonitrila 100%. Observando a intensidade do sinal obtido a as bandas do pico, decidiu-se utilizar acetonitrila, pois obteve-se um pico mais simétrico e de maior intensidade. Variou-se então a proporção dos solventes, acetonitrila e água, nas proporções de 9 para 1, 8 para 2, 7 para 3, 6 para 4, e 1 para 1. Observando o tempo de retenção, altura da linha base, intensidade de sinal, simetria dos picos escolheu-se então a proporção 7 partes de acetonitrila para 3 partes de água. Com as proporções de solventes definidas testamos então os modificadores orgânicos com o intuito de facilitar a ionização, adicionou-se na fase móvel 0,1% e 0,5% de ácido fórmico respectivamente, 5 e 10 mM de acetato de amônio, 0,1% de ácido trifluoracético. Então a fase móvel definida foi acetonitrila 7 partes, água 3 partes e 0,1% de ácido fórmico, onde obtivemos maior intensidade de sinal. Observou-se que fase estacionária utilizada, coluna C-18 em fase reversa se mostrou muito eficiente. Variou-se então o tamanho da coluna e o fluxo, utilizou-se uma coluna C-18 de 5 cm, 10 cm, 15 cm e 25 cm respectivamente. A melhor coluna foi a Luna C18 5µm, (150 x 4,6 mm), com um fluxo de 2 mL/min, com utilização de splitter onde 0,3 mL/min é direcionado para o equipamento.

Iniciou-se os testes de extração com as extrações Líquido-Líquido onde utilizamos como agente extrator, hexano, acetato de etila, diclorometano éter e as misturas de hexano com acetato na proporção de 1 para 1, o melhor resultado foi na mistura de solventes hexano com acetato de etila na proporção 1 para 1. Testou-se então a precipitação com acetonitrila, e metanol, pois tinha-se um limite de quantificação relativamente alto 20 ng/mL e o equipamento está operando com um fluxo alto de solvente o que dificulta a sujeira do equipamento, observando os resultados optou-se pela precipitação com acetonitrila onde obteve-se uma recuperação por volta de 80%, e por possuir o menor custo que a extração líquido-líquido. A função MRM escolhida foi (ES-) 314,2 > 68,41 e (ES+) 383,11 > 337,3 para monitoramento do efavirenz e da loratadina respectivamente onde esta função se mostrou eficiente tanto em sensibilidade como também em seletividade, diferentemente da função em modo positivo, onde existia um interferente endógeno no mesmo tempo de retenção. De acordo com a função MRM escolhida para o Efavirenz e para Loratadina, as Figuras 18 e 19 mostram as possíveis propostas de fragmentação para Efavirenz e Loratadina, respectivamente.

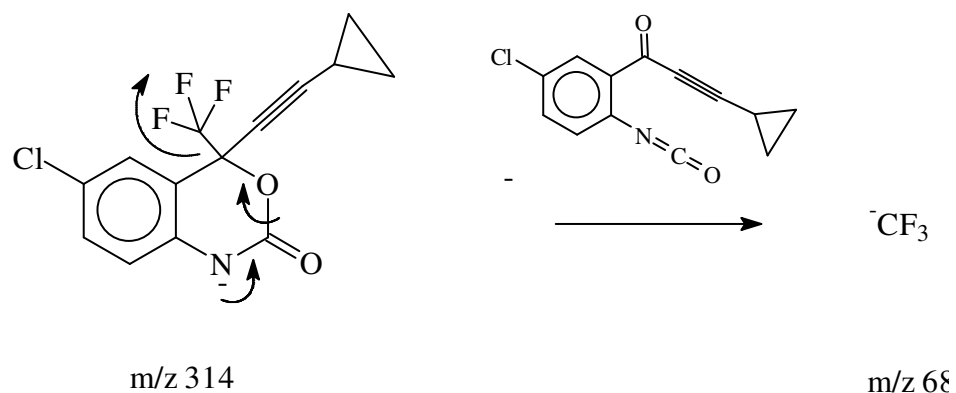


Figura 18 – Proposta de fragmentação para Efavirenz (ES-)

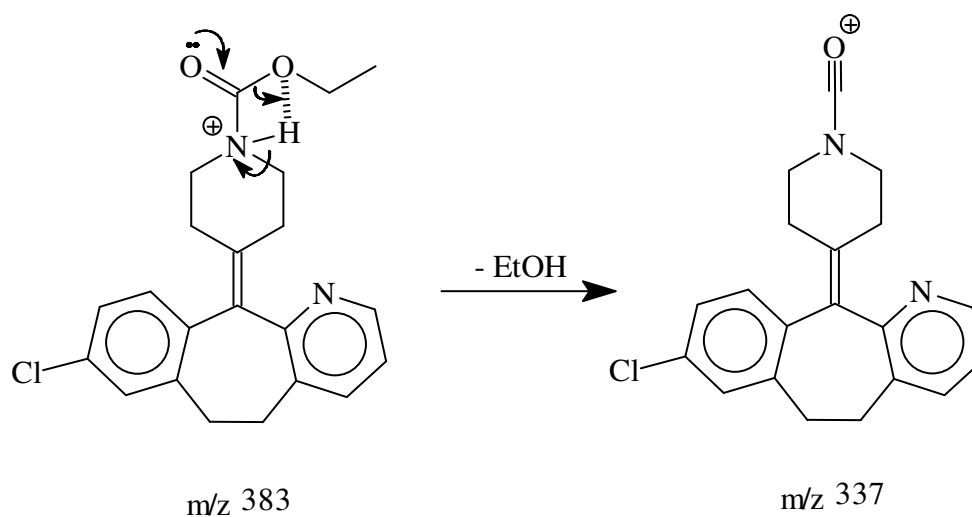


Figura 19 – Proposta de fragmentação para loratadina (ES+)

4.2. RESULTADO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

4.2.1. Princípios do Método

Para a análise de Efavirenz e o padrão interno Loratadina foram extraídos do plasma humano por meio de desproteínização utilizando acetonitrila gelada, após a extração o sobrenadante foi transferido para *inserts* e injetado no sistema cromatográfico. Aliquotas foram analisadas por Cromatografia Líquida acoplado à Espectrometria de Massas no modo MS/MS.

4.2.2. Extração das amostras

Para a extração do analito (Efavirenz) e do padrão interno (Loratadina) das amostras biológicas, colocou-se em tubos eppendorff 200 µL de plasma humano e 50 µL da solução de Loratadina 250 ng/mL preparada em acetonitrila, adicionou-se 900,0 µL de acetonitrila gelada e agitou-se por 5 minutos em mesa agitadora, centrifugou-se durante 10 minutos à 14.000 rpm à 4º C, transferiu-se sobrenadante para *insert* e injetou-se.

4.2.3. Condições Cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando-se uma coluna analítica Luna C18 (5 u, 150 x 4,6 mm), mantida à temperatura ambiente (~20 °c).

O Cromatógrafo Líquido com detecção por Espectrometria de Massas no modo MS/MS foi programado para operar com fluxo de 2 mL/min, volume de injeção de 50 µl à temperatura ambiente (~20ºc) e o tempo total de corrida foi ajustado para 2,80 min. Os tempos de retenção característicos do analito e do padrão interno foram respectivamente 2,13 minutos para o Efavirenz (Analito) e 0,78 minutos para Loratadina (Padrão Interno)

4.2.4. Condições de detecção no espectrômetro de massas no modo MS/MS

Os parâmetros do equipamento utilizados foram: fonte de ionização por *electrospray* operando em modo (ES-) mrm 314,2 > 68,41 e (ES+) 383,11 > 337,3 para monitoramento do Efavirenz e da Loratadina, respectivamente embora as características químicas sejam semelhantes a Loratadina ionizou-se melhor protonando seus sítios básicos e o Efavirenz desprotonando seus sítios ácidos . A temperatura da fonte foi de 110º c e dessolvatação de 400º c. O fluxo dos gases do cone e dessolvatação foram de 0 e 500, respectivamente. Os valores de voltagem do capilar, cone e energia de colisão foram, respectivamente, 0,40 kV, 30,0 V e 20,0 eV para o Efavirenz e 2,0 kV, 30,0 V e 25,0 eV para a Loratadina.

4.3. VALIDAÇÃO

Para Validar-se a metodologia e as corridas analíticas foi seguida a Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003 D.O.U. 02/06/2003.

4.3.1. Validação do Método Bioanalítico

Validação dos procedimentos experimentais para a determinação de Efavirenz em plasma humano utilizando Loratadina como padrão interno.

Estão apresentados os procedimentos laboratoriais utilizados para demonstrar que o método analítico é adequado e confiável.

4.3.1.1. Especificidade ou Seletividade

Para confirmar a especificidade do método, foram analisadas amostras branco de plasma humano obtidas de seis indivíduos onde em quatro o plasma foi normal , um o plasma foi lipêmico e no outro o plasma foi hemolisado..

Nas Figuras 20, 21 e 22 estão apresentadas as amostras de plasma branco testadas utilizando-se os procedimentos de extração e as condições cromatográficas propostas, para avaliar interferência no tempo de retenção do Efavirenz (2,13 min.) e do padrão interno (0,78 min.) e os resultados foram comparados com aqueles obtidos com uma solução aquosa de efavirenz a ser analisado em concentração próxima ao LQ (Figura 23) como pode-se observar nos cromatogramas apresentados, não foram encontradas interferências nos respectivos tempo de retenção do fármaco e padrão interno.

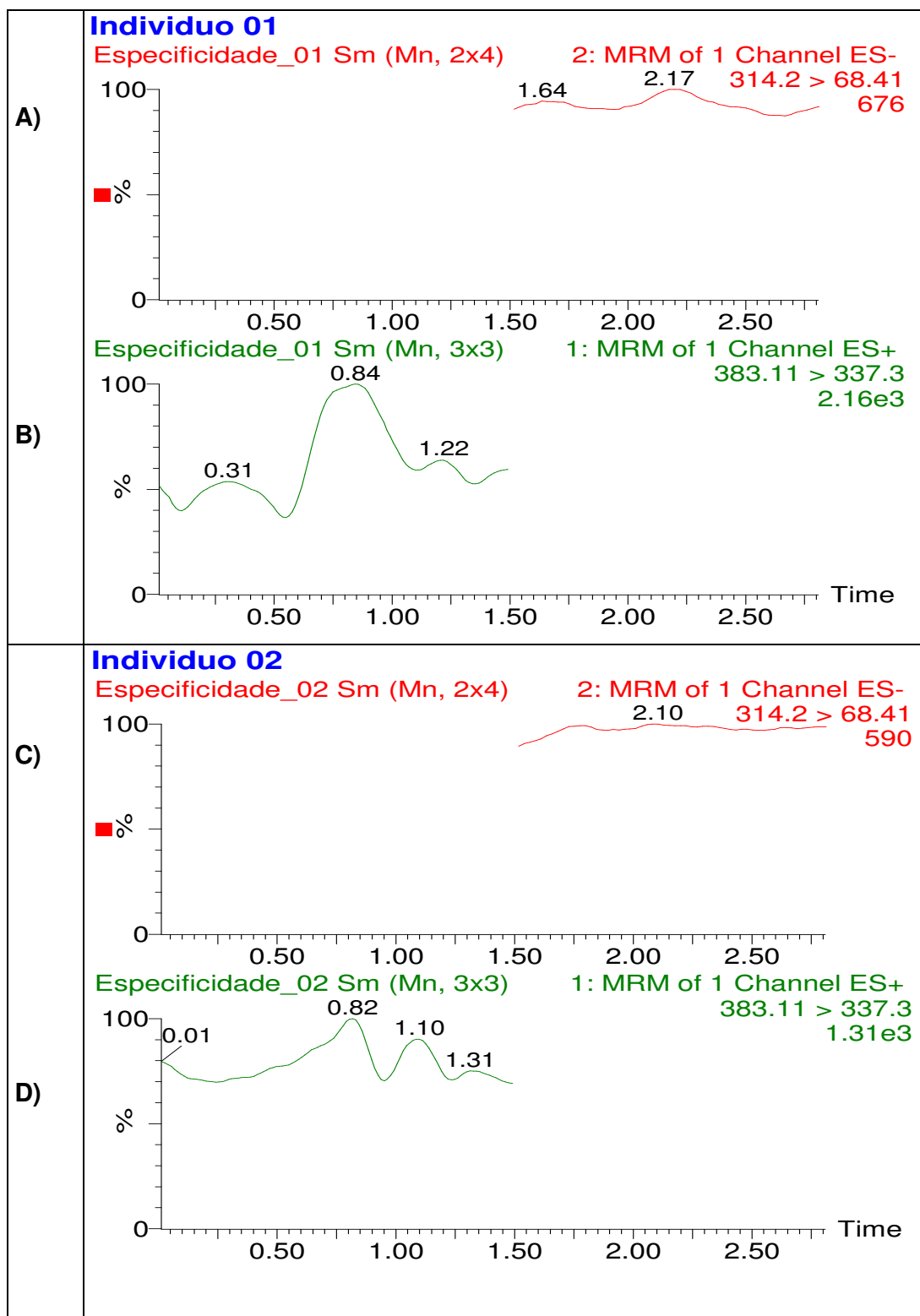


Figura 20: Plasma branco normal lote indivíduo 01. **a)** cromatograma referente ao branco do analito. **b)** cromatograma referente ao branco do padrão interno. plasma branco normal lote indivíduo 02. **c)** cromatograma referente ao branco do analito. **d)** cromatograma referente ao branco do padrão interno.

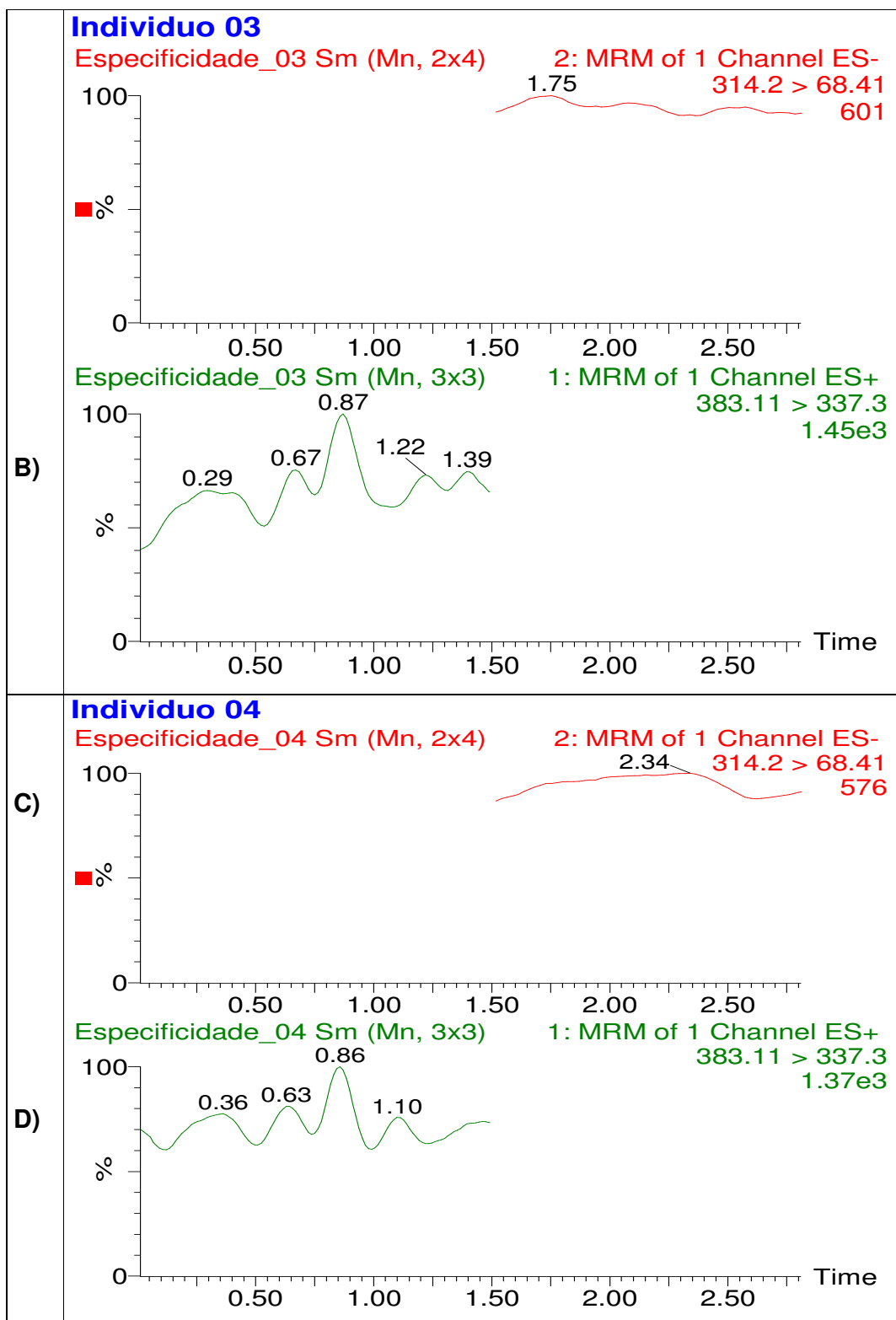


Figura 21: Plasma branco normal indivíduo 03. **a)** cromatograma referente ao branco do analito. **b)** cromatograma referente ao branco do padrão interno. plasma branco normal indivíduo 04 **c)** cromatograma referente ao branco do analito. **d)** cromatograma referente ao branco do padrão interno.

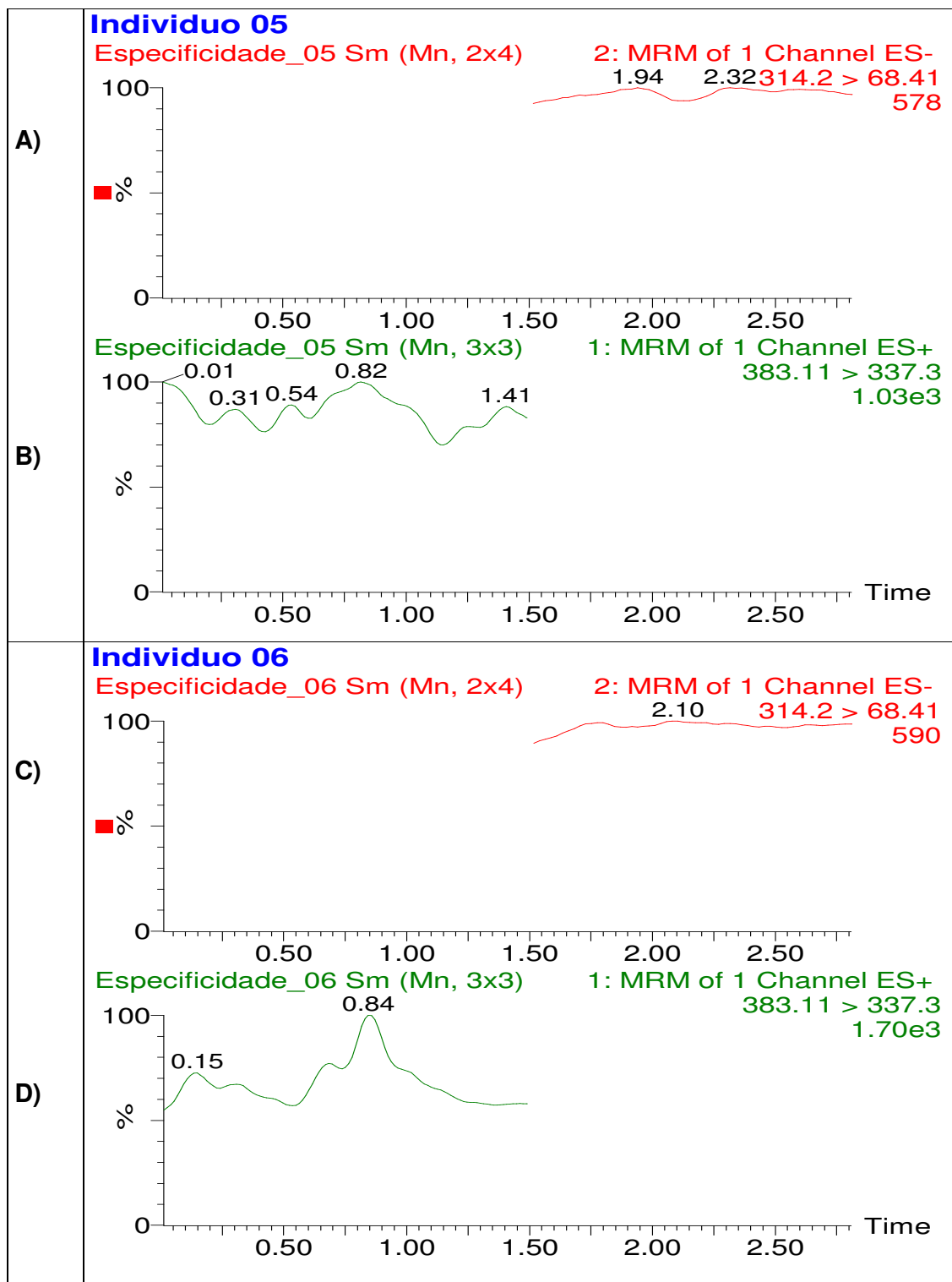


Figura 22: Plasma branco lipêmico indivíduo 05. **a)** cromatograma referente ao branco do analito. **b)** cromatograma referente ao branco do padrão interno. Plasma branco hemolisado indivíduo 06. **c)** cromatograma referente ao branco do analito. **d)** cromatograma referente ao branco do padrão interno.

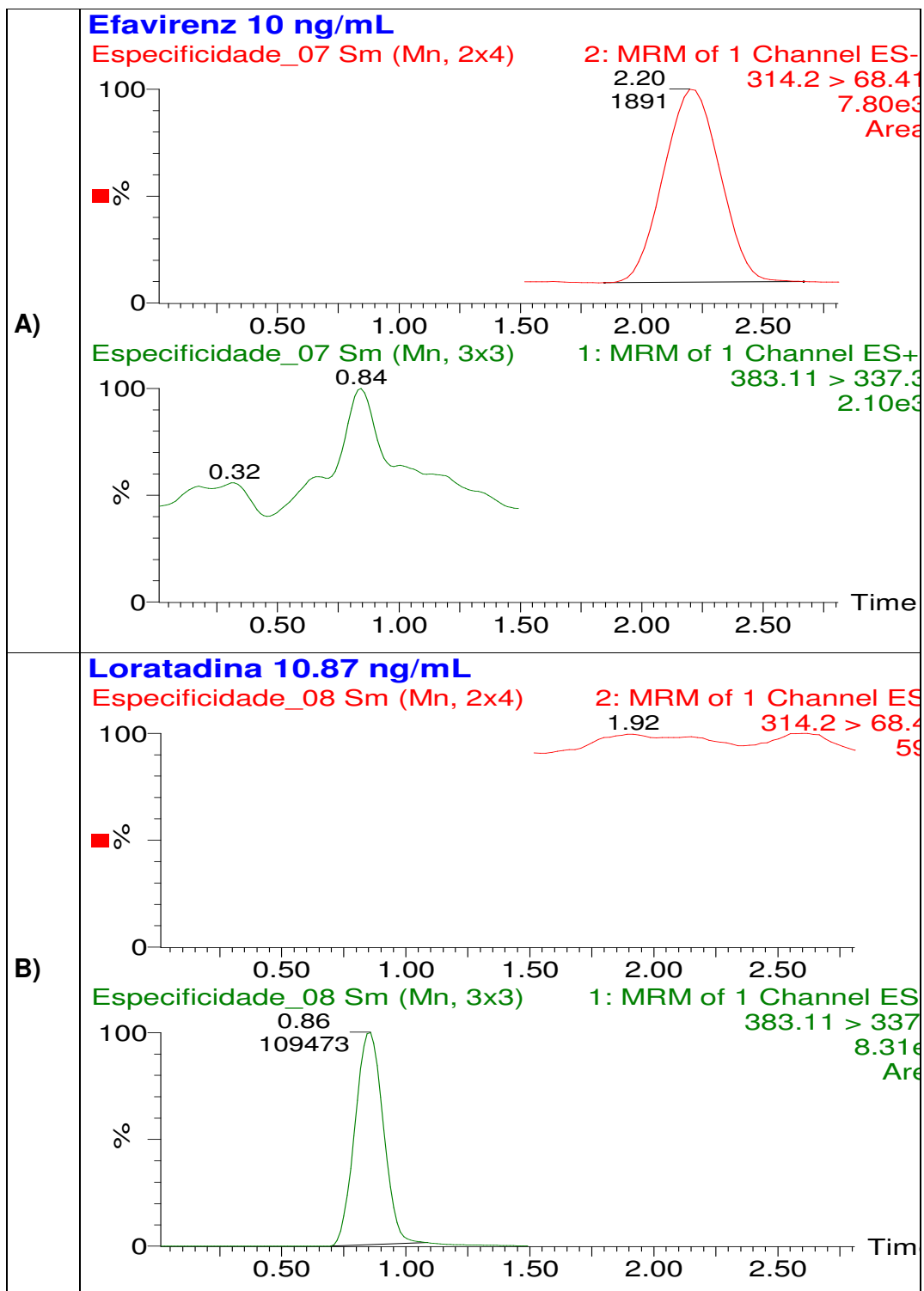


Figura 23: A) Cromatograma referente a Solução de Efavirenz 10,0 ng/mL (LQ).
B) Cromatograma referente a Solução de Loratadina 10,87 ng/mL.

4.3.1.2. Curva de Calibração

As concentrações dos padrões foram definidas em testes preliminares, incluindo a primeira quantificação de amostras, levando-se em consideração a sensibilidade do método e a faixa prevista das concentrações das amostras a serem determinadas. Para definir a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito, foi gerada uma curva de calibração com seis padrões contendo o fármaco e padrão interno.

4.3.1.3. Determinação do limite de quantificação

A resposta de pico para o LQ deve ser, no mínimo, 5 vezes maior que qualquer interferência na amostra branco no tempo de retenção do fármaco. O pico de resposta do fármaco no LQ deve ser identificável e reprodutível com precisão de 20% e exatidão entre 80-120% em relação à concentração nominal do padrão, através da análise de, no mínimo, cinco amostras de padrões.

4.3.1.4. Linearidade

Na linearidade para o LQ o desvio deve menor ou igual a 20% em relação a concentração nominal em pelo menos duas das triplicatas. Para as outras concentrações da curva de calibração o desvio deve ser menor ou igual a 15% em relação a concentração nominal, em pelo menos duas das triplicatas. O coeficiente de correlação será aceito se for igual ou maior do que 0,98. Os dados da curva de calibração estão apresentados na Tabela 3.

TABELA 3 - Curva de Calibração

Padrão	Concentração nominal (ng/mL)	Concentração experimental (ng/mL)	CV (%)	Exatidão (%)
Efavirenz	10,0	9.859	1,53	98,38
Efavirenz	50,0	54,16	7,34	108,33
Efavirenz	500,0	499.60	3,06	99,94
Efavirenz	1000,0	978.11	1,66	97,81
Efavirenz	1500,0	1463.66	1,98	97,53
Efavirenz	2000,0	1973.03	4,28	98,65
Efavirenz	3000,0	3059.26	3,08	101,98
Efavirenz	5000,0	4869.14	2,39	97,38

Equação da curva de calibração 1: $y = 4,69248e-5 x + 0,000115959$ ($r = 0,996029$)

Equação da curva de calibração 2: $y = 4,87027e-5 x + 8,93179e-5$ ($r = 0,996728$)

Equação da curva de calibração 3: $y = 4,45030e-5 x + 9,32779e-5$ ($r = 0,999353$)

4.3.1.5. Precisão e exatidão

Para avaliar a precisão e exatidão do método, quatro concentrações distintas, na faixa esperada de concentrações foram analisadas, utilizando-se determinações por concentração. A precisão e exatidão foram determinadas em um mesmo lote (precisão e exatidão intra-lote) e em lotes diferentes (precisão e exatidão inter-lotes).

4.3.1.6. Determinação das concentrações dos controles de qualidade

As concentrações das amostras controle de qualidade foram definidas da seguinte maneira, para o controle de qualidade LQ foi utilizada a mesma concentração do LQ no valor definido de 10 ng/mL, para o controle de qualidade baixo (CQB), deve ser menor ou igual a 3 vezes o valor do LQ, definido 30 ng/mL, para o controle de qualidade médio (CQM) deve ser aproximadamente a média entre o controle de qualidade baixo definido em 1900 ng/mL e o controle de qualidade alto (CQA), deve variar entre 75 a 90 % da maior concentração da curva de calibração definido em 3800 ng/mL.

4.3.1.7. Validação intra-lote

A precisão e exatidão intra-lote foram determinadas utilizando-se um lote contendo uma curva de calibração, cinco amostras de cada controle de qualidade definido acima. Para avaliar a precisão dos controles CQB, CQM e CQA o coeficiente de variação (cv) não deveria exceder 15% e para o LQ, admitiu-se valores menores ou iguais a 20% e para avaliar a exatidão para as amostras CQB, CQM e CQA dentro do desvio de $\pm 15\%$ do valor nominal e para o LQ, admitiu-se desvios menores ou iguais a 20%.

Os resultados das análises intra-lote estão apresentados nas Tabelas 4 e 5:.

TABELA 4 - Resultados das análises intra-lote do controle de qualidade LQ

	LQ (Lote 1)	LQ (Lote 2)	LQ (Lote 3)
Média	9,804	9,847	9,745
DP	1,243	0,859	0,906
CV (%)	12,68	8,72	9,30
Exatidão(%)	98,04	98,47	97,45

Concentração nominal: LQ= 10,0 ng/mL, DP= desvio padrão e CV= coeficiente de variação

TABELA 5 - Resultados das análises intra-lote dos controles de qualidade CQB, CQM E CQA

	CQB	CQM	CQA
Média	31,242	1920,167	3765,058
DP	2,66	128,08	64,78
CV (%)	8,51	6,67	1,72
Exatidão(%)	104,14	101,06	99,08

Concentração nominal: CQB= 30,0 ng/mL, CQM= 1900,0 ng/mL e CQA= 3800,0 ng/mL, DP= desvio padrão e CV= coeficiente de variação.

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados dos ensaios realizados para avaliar a precisão e exatidão do método analítico utilizando-se plasmas lipêmico e hemolisado.

TABELA 6 - Resultados das análises intra-lote dos controles de qualidade de Efavirenz em plasmas lipêmico e hemolisado

Réplicas	Plasma Lipêmico			Plasma Hemolisado		
	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
Média	28,686	1776,196	3449,256	29,031	1767,557	3526,347
DP	2,47	50,74	83,73	2,56	63,15	165,34
CV(%)	8,60	2,86	2,43	8,81	3,57	4,69
Exatidão(%)	95,62	93,48	90,77	96,77	93,03	92,80

Concentração nominal: CQB= 30,0 ng/mL, CQM= 1900,0 ng/mL e CQA= 3800,0 ng/mL, DP= desvio padrão e CV= coeficiente de variação.

4.3.1.8. Validação inter-lotes

Os seguintes critérios foram seguidos para considerar a precisão e exatidão inter-lotes. Para a precisão: dos controles CQB, CQM e CQA, o CV obtido não deveria exceder 15% e para o LQ, admitiu-se valores menores ou iguais a 20% e para a exatidão das amostras CQB, CQM e CQA dentro do desvio de $\pm 15\%$ do valor nominal e para o LQ, admitiu-se desvios menores ou iguais a 20%.

Os dados da validação inter-lotes são apresentados nas Tabelas 7 e 8.

TABELA 7 - Resultados inter-lotes do controle de qualidade LQ

	LQ 1	LQ 2	LQ 3
Réplicas¹	9,804	9,847	9,745
Média		9,799	
DP		0,051	
CV (%)		0,52	
Exatidão (%)		97,99	

Concentração nominal: LQ= 10,0 ng/mL, DP= desvio padrão e CV= coeficiente de variação média das réplicas interlotes de LQ1, LQ2 e LQ3

TABELA 8 - Análise inter-lotes dos controles de qualidade CQB, CQM e CQA

Réplicas	CQB (lote 1)	CQB (lote 2)	CQB (lote 3)	CQM (lote 1)	CQM (lote 2)	CQM (lote 3)	CQA (lote 1)	CQA (lote 2)	CQA (lote 3)
1	33,204	31,415	31,004	1737,590	1940,982	1915,084	3693,129	3576,747	3671,439
2	31,821	30,586	28,744	1889,102	1999,427	1912,134	3726,325	3846,838	3565,514
3	34,028	31,050	32,053	1922,745	1927,578	1893,485	3837,209	3565,071	3895,832
4	29,613	32,063	28,384	1958,470	2046,436	1999,819	3829,939	3831,075	3634,928
5	27,546	30,746	31,058	2092,926	1978,274	1889,475	3738,687	3808,203	3700,233
Média	31,242	31,172	30,249	1920,167	1978,539	1921,999	3765,058	3725,587	3693,589
DP	2,66	0,59	1,60	128,08	47,58	44,92	64,78	141,93	123,78
CV (%)	8,51	1,89	5,28	6,67	2,40	2,34	1,72	3,81	3,35
Exatidão (%)	104,14	103,91	100,83	101,06	104,13	101,16	99,08	98,04	97,20
	CQB			CQM			CQA		
Média	30,888			1940,235			3728,078		
DP	0,55			33,19			35,80		
CV (%)	1,80			1,71			0,96		
Exatidão (%)	102,96			102,12			98,11		

Concentração nominal: CQB= 30,0 ng/mL, CQM= 1900,0 ng/mL e CQA= 3800,0 ng/mL, DP= desvio padrão e CV= coeficiente de variação.

4.3.1.9. Validação da Diluição

O objetivo da validação da diluição foi garantir que as possíveis diluições de pontos acima do limite superior da curva de calibração apresentassem resultados precisos e exatos. Para avaliação da exatidão e precisão os controles de qualidade de diluição (CQD) foram diluídos com plasma branco na proporção de 1:3.

Os resultados de exatidão intra e inter lotes estão apresentados nas Tabelas 9 e 10.

Através dos resultados pôde-se verificar que os mesmos estão dentro dos critérios de aceitação.

TABELA 9 - Média dos controles de qualidade CQD1, CQD2 e CQD3 diluídos com plasma branco (fd=4), intra-lote

	CQD1	CQD2	CQD3
Média	2122,453	2211,665	2159,137
DP	45,44	94,12	63,09
CV (%)	2,14	4,26	2,92
Exatidão(%)	99,88	104,08	101,61

Concentração nominal diluída: CQD= 2125,0 ng/mL, DP= desvio padrão e CV= coeficiente de variação.

Para aplicar o fator de diluição utilizou-se de uma concentração superior a 70 % acima do último ponto da curva de calibração.

TABELA 10 - Média dos controles de qualidade CQD1, CQD2 E CQD3 (fd=4)

	CQD		
Média x Fd	8489,812	8846,658	8636,549
Exatidão	99,88	104,08	101,61

Concentração nominal= 8500,0 ng/mL.

4.3.1.10. Recuperação

Nas Tabela 11 e 12 estão apresentados os resultados das análises de recuperação do efavirenz e da loratadina. Os cálculos da recuperação são feitos comparando-se as áreas dos picos de Efavirenz e loratadina (controles baixo, médio e alto) das amostras extraídas do plasma com as áreas dos picos de Efavirenz e Loratadina preparada em solução.

TABELA 11 - Percentagem de recuperação do fármaco

	Área Solução/Efavirenz			Área Plasma/Efavirenz		
	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
Média	340	12748	24169	257	10224	19903
DP	13,58	150,92	390,60	6,91	80,37	388,42
CV (%)	3,99	1,18	1,62	2,69	0,79	1,95
Recuperação (%)	75,62	80,20	82,35			

TABELA 12 - Percentagem de recuperação do padrão interno

	Área Solução PI	Área Plasma PI
Média	137513	147086
DP	2754,49	3412,21
CV (%)	2,00	2,32
Recuperação (%)	106,96	

4.4. RESULTADO DAS ESTABILIDADES

Para avaliar a estabilidade do fármaco no tempo e condições de análise, as amostras processadas foram mantidas dentro do auto-injetor, a temperatura ambiente, e cada amostra de controle de qualidade foram analisadas em triplicata nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24.

A Tabela 13 apresenta as variações obtidas quando são comparados os valores médios de CQB, CQM e CQA obtidos no tempo 0 hora (recém preparada) com os valores médios de CQB, CQM e CQA obtidos no tempo 24 horas. Os resultados obtidos estão abaixo do desvio permitido de 15% para os três controles analisados e, portanto, pode-se concluir que as amostras permaneceram estáveis dentro do auto-injetor durante o período de 24 horas.

TABELA 13 - Resultados obtidos no estudo de estabilidade no auto-injetor

T (0 H)	CQB	CQM	CQA	T (24H)	CQB	CQM	CQA
Média	31,579	1845,860	3441,573	Média	30,289	1899,793	3580,412
DP	1,99	36,22	38,95	DP	0,45	50,46	49,27
CV (%)	6,31	1,96	1,13	CV (%)	1,47	2,66	1,38
					CQB	CQM	CQA
Variação entre o tempo de 0 a 24 horas (%)					-4,09	2,92	4,03

Concentração nominal: CQB= 30,0 ng/mL, CQM= 1900,0 ng/mL e CQA= 3800,0 ng/mL, DP= desvio padrão e CV= coeficiente de variação.

4.4.1. Estabilidade do fármaco em ciclos de congelamento e degelo

As amostras foram congeladas à -70° C e mantidas nesta temperatura por 24 horas. Após este tempo, as amostras foram submetidas ao degelo natural, à temperatura ambiente, extraídas e imediatamente analisadas. depois de completamente degeladas, as amostras foram novamente congeladas à -70° C, mantidas nesta temperatura entre 12 à 24 horas e degeladas (degelo 2). o mesmo procedimento foi repetido mais uma vez, com o intuito de completar o 3º ciclo de congelamento e degelo (degelo 3) como demonstrado na Tabela 14.

TABELA 14 - Resultados dos valores obtidos na estabilidade de Efavirenz em plasma submetido a três ciclos de congelamento e degelo

	Amostras recém-preparadas			CQB			CQM			CQA		
	CQB	CQM	CQA	Deg.1	Deg.2	Deg.3	Deg.1	Deg.2	Deg.3	Deg.1	Deg.2	Deg.3
Média	29,41	1829,54	3456,04	28,89	31,38	27,37	1850,79	2000,87	1873,60	3700,33	3885,40	3852,95
DP	2,07	54,69	107,71	1,38	1,32	0,46	57,20	58,98	86,59	77,07	116,20	185,79
CV (%)	7,04	2,99	3,12	4,76	4,20	1,66	3,09	2,95	4,62	2,08	2,99	4,82
Exatidão (%)	98,02	96,29	90,95	96,32	104,58	91,24	97,41	105,31	98,61	97,38	102,25	101,39

Concentração nominal: CQB= 30,0 ng/mL, CQM= 1900,0 ng/mL e CQA= 3800,0 ng/mL, DP= desvio padrão e CV= coeficiente de variação.

Comparando-se as variações entre as médias dos CQB, CQM e CQA para amostras recém-preparadas e a média dos CQB, CQM E CQA em cada ciclo de congelamento e degelo pode-se concluir que o Efavirenz analisado em plasma humano é estável nos três ciclos de congelamento e degelo quando armazenados à -70° C, uma vez que foram quantificados em todos os degelos.

4.4.2. Estabilidade das amostras de plasma

Na Tabela 15 estão apresentados os resultados das análises realizadas com amostras recém-preparadas compradas as mantidas durante seis horas à temperatura ambiente.

TABELA 15 - Resultados da estabilidade de plasma dopado com solução padrão de Efavirenz

	Amostras Recém preparadas			Amostras analisadas após 6 horas a temperatura ambiente		
	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
Média	29,405	1829,537	3456,04	29,24	1814,94	3487,47
DP	2,07	54,69	107,71	1,61	96,08	104,65
CV (%)	7,04	2,99	3,12	5,49	5,29	3,00
Exatidão (%)	98,02	96,29	90,95	97,48	95,52	91,78

Concentração nominal: CQB= 30,0 ng/mL, CQM= 1900,0 ng/mL e CQA= 3800,0 ng/mL, DP= desvio padrão e CV= coeficiente de variação.

Comparando-se os valores médios encontrados para os controle de qualidade baixo, médio e alto das amostras recém preparadas, com os resultados obtidos dos controles de

qualidade baixo, médio e alto mantidos durante seis horas a temperatura ambiente, pode-se concluir que os mesmos foram estáveis, uma vez que os desvios encontrados foram inferiores a 15%.

4.4.3. Estabilidade de soluções

Na Tabela 16 estão apresentadas as variações das médias das áreas do analito e do padrão interno para as soluções analisadas após 6 horas de preparo mantidas à temperatura ambiente e amostras analisadas depois de 27 dias mantidas sob refrigeração em relação às médias obtidas para as soluções recém preparadas.

TABELA 16 - Variação das médias dos controles de qualidade para as soluções padrão mantidas 6 horas à temperatura ambiente e soluções padrão depois e 27 dias sob refrigeração em relação às médias das soluções recém-preparadas

	Amostras analisadas 6 horas após preparo		Amostras após 27 dias sob refrigeração	
	Efavirenz	Loratadina	Efavirenz	Loratadina
Varição (%)	-5,24	-12,93	-2,27	1,33

Observa-se que as variações obtidas são menores que 15%, o que indica a estabilidade das soluções padrão do fármaco e do padrão interno durante um período de 27 dias armazenados em 4º C.

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, o uso de CLAE-EM/EM permitiu obter medidas precisas, exatas e confiáveis de quantificação de Efavirenz. O método descrito provou ser rápido e robusto com um tempo de corrida analítica menor que 2.8 minutos. Provou-se também ser altamente específico e seletivo. O método mostrou possuir vantagens significativas sobre os outros descritos na literatura para quantificação de Efavirenz em plasma, onde conseguiu-se o menor limite de quantificação e o menor tempo de corrida. Este método se mostrou-se eficaz para ser utilizado em estudos de bioequivalência ou para quantificação de Efavirenz em fluidos biológicos. Para Validar a Metodologia e as corridas analíticas foi respeitada a Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Gallo, R.C.; Montagneir, L.; *Scient. Am.*, 1988, 41, 259.
- (2) Pinel, A.; Ingles, E. O que é AIDS. São Paulo: Brasiliense, Coleção Primeiros Passos, p.300, 1996.
- (3)) Deen, K. C.; McDougal, J. S.; Inacker, R.; Fulena-Wasserman, G.; Arthos, J.; *Nature* 1988, 331, 82.
- (4) Choe, H.; *Arch. Pharmacol. Res.* 1998, 21, 634.
- (5) Rosenberg Z. F. and Fauci A. S.; *Clinical Immunology and Immunopathology*. Volume 50, Parte 2, Janeiro 1989, Páginas S149-S156.
- (6) Seffner, M; Report on the 2004 Brunets Seminar on Learner Autonomy, 2004, 16, 81.
- (7) SOCIEDADE BRASILEIRA DE INFECTOLOGIA. Disponível em: www.infectologia.org.br/default.asp. Acessado em fevereiro de 2008.
- (8) Tantillo, C.; Ding, J.; Jacobo-Molina, A.; Nanni, R.G.; Boyer, P.L.; Hughes, S.H.; Pawels, R.; Andries, K.; Janssen, P.A.J.; Arnold, E.J.; *J. Mol. Biol.*, 1994, 243, 369.
- (9) De Clercq, E.; *Pure Appl. Chem.* 1998, 70, 567.
- (10) Giami A. Enfermeiras frente à AIDS: representações e condutas, permanência e mudanças. Canoas (RS): ULBRA; 1997.
- (11) De Clercq, E.; *Clin. Microbiol. Rev.* 1995, 8, 200.
- (12) De Clercq, E.; *Biochem. Pharmacol.* 1991, 42,963.
- (13) Pawels, R.; Andries, K.; Desmyter, J.; Schols, D.; Kukla, M. J.; Breslin, H. J.; Raeymaeckers, A.; Van Gelder, J.; Woestenborgs, R.; Heykants, J.; Schellekens, K.; Janssen, M. A. C.; De Clercq, E.; Janssen, P. A. J.; *Nature* 1990, 343, 470.
- (14) Baba, M.; De Clercq, E.; Tanaka, H.; Ubasawa, M.; Takashima, H.; Sekiya, K.; Niita, I.; Umezu, K.; Nakashima, H.; Mori, S.; Shigeta, S.; Walker, R. T.; Miyasaka, T.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991, 88, 2356.

- (15) Baba, M.; De Clercq, E.; Tanaka, H.; Ubasawa, M.; Takashima, H.; Sekiya, K.; Niita, I.; Umezue, K.; Nakashima, H.; Mori, S.; Ito, M.; Shigeta, S.; Miyasaka, T.; *Mol. Pharmacol.* 1991, 39, 805.
- (16) Koup, R. A.; Merluzzi, V. J.; Hargrave, K. D.; Adams, J.; Grzinger, K.; Eckner, R. J.; Sullivan, J. L.; *Infect. Dis.* 1991, 163, 966.
- (17) Goldman, M. E.; Nunberg, J. H.; Schleif, W. A.; Quintero, J. C.; Siegl, P. K. S.; Hoffman, J. M.; Smith, A. M.; Emini, E. A.; *Antimicrob. Agents Chemother.* 1992, 36, 1019.
- (18) Romero, D. L.; Morge, R. A.; Genin, M. J.; Biles, C.; Busso, M.; Resnick, L.; Althaus, I. W.; Reusser, F.; Thomas, R. C.; Tarpley, W. G.; *J. Med. Chem.* 1993, 36, 1505.
- (19) Balzarini, J.; Pérez-Pérez, M. J.; San-Felix, A.; Schols, D.; Perno, C. F.; Vandamme, A. M.; Camarasa, M. J.; De Clercq, E.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992, 89, 1073.
- (20) Pauwels, R.; Andries, K.; Debyse, Z.; Van Daele, P.; Schols, D.; Stoffels, P.; De Vreese, K.; Woestenborgs, R.; Vandamme, A. M.; Janssen, M. A. C.; De Clercq, E.; Janssen, P. A. J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993, 90, 1711.
- (21) Baba, M.; Shigeta, S.; Yuasa, S.; Takashima, H.; Sekiya, K.; Ubasawa, M.; Tanaka, H.; Miyasaka, T.; Walker, R. T.; De Clercq, E.; *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994, 38, 688.
- (22) Pauwels, R.; Andries, K.; Debyser, Z.; Kukla, M.-J.; Schols, D.; Breslin, H. J.; Woestenborgs, R.; Desmyter, J.; Janssen, M. A. C.; De Clercq, E.; Janssen, P. A. J.; *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994, 38, 2863.
- (23) Food And Drug Administration. Disponível em: <http://www.fda.gov/oashi/aids/virals.html>. Acessado em Novembro 2008.
- (24) De Clercq, E.; *Antiviral Res.* 1998, 38, 153.
- (25) Dias, C.R.C., Generic drug policy implementation in Brazil; *cod. Saúde pública: Rio de Janeiro*. p.1661, 2006.
- (26) ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE n. 899, de 29 de maio de 2004. Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília: Diário Oficial da União, 2003.

- (27) Storpirtis, S.; Balduino, J.; Bueno, M.M.; Freitas, S.T.; Gatto, R.C.; Lima Filho, P.; Marcolongo, R.; Valente, V.R.; Aspectos técnicos ao registro de medicamentos genéricos no Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003.
- (28) ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n. 10, de 2 de janeiro de 2001.
- (29) De Moraes, M.E.A.; De Moraes, M.O., *Fárm. Méd.*, 2000, 6, 36.
- (30) ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE n. 1170, de 19 de abril de 2006. Guia para provas de biodisponibilidade relativa/ bioequivalência de Medicamentos. Brasília: Diário Oficial da União, 2006.
- (31) FDA - Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, may, 2001.
- (32) Gil, E.S.; Batista Filho, R.O.P., *Pharmabooks*, 2007, 41.
- (33) ICH – International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human uses. Guideline on Validation of analytical procedure: methodology, 1996.
- (34) Cass, Q.B.; Degani, A.L.G.; *Desenvolvimento de métodos por HPLC – Fundamentos, Estratégias e Validação. Serie apontamentos*, p.5, 2001.
- (35) McMurry; John; *Química Orgânica*, p. 666, 1997.
- (36) Harris, D.C.; *Espectrometria de massas. Análise Quantitativa*, p. 507, 2005.
- (37) Pereira, A. S.; Bicalho, B.; Lilla, S.; De Nucci, G., *Quim. Nova*. 2005, 28.
- (38) Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Nieman, T.A.; *Molecular mass spectrometry. Principles of instrumental analysis* p. 498, 2001.
- (39) Sawaya, A.C.; *Análise da composição química de própolis brasileira por espectrometria de massas; Tese – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química; Campinas, SP; 2006.*
- (40) Fenn, J.B. Mann, M. Meng, C.K. Wong, S.F, Whitehouse, C.M. *Science*, 1989, 246.

ANEXO

GUIA PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E BIOANALÍTICOS MÉTODOS ANALÍTICOS

1. Considerações Gerais

1.1. As informações contidas nesse Anexo apresentam as características a serem consideradas durante a validação de procedimentos analíticos. O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos.

1.2. Essas informações aplicam-se a:

1.2.1. técnicas analíticas que façam uso de métodos de cromatografia gasosa (CG) ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);

1.2.2. métodos não-cromatográficos, desde que estes ofereçam uma seletividade aceitável (por ex. titulometria, espectrofotometria UV-VIS);

1.2.3. testes imunológicos ou microbiológicos, desde que observado o grau de variabilidade usualmente associado a estas técnicas.

1.3. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão, adequados à análise.

1.4. Deve-se utilizar substâncias de referência oficializadas pela Farmacopéia Brasileira ou, na ausência destas, por outros códigos autorizados pela legislação vigente. No caso da inexistência dessas substâncias, será admitido o uso de padrões de trabalho, desde que a identidade e o teor sejam devidamente comprovados.

1.5. Para efeito desse guia, considera-se corrida analítica as medições sucessivas de um mesmo analito, efetuadas nas mesmas condições: método, analista, instrumentação, local, condições de utilização e em intervalo de tempo curto entre as medições.

1.6. No caso de metodologia analítica descrita em farmacopéias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela ANVISA, a metodologia será considerada validada.

1.7. No caso de metodologia analítica não descrita em farmacopéias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela ANVISA, a metodologia será considerada validada, desde que sejam avaliados os parâmetros relacionados a seguir, conforme especificado nas Tabelas 1 e 2.

1.7.1. Especificidade e Seletividade

- 1.7.2. Linearidade
- 1.7.3. Intervalo
- 1.7.4. Precisão
- 1.7.5. Limite de detecção (sensibilidade)
- 1.7.6. Limite de quantificação
- 1.7.7. Exatidão
- 1.7.8. Robustez

1.8. No caso da transferência de metodologias da matriz para suas subsidiárias no Brasil e/ou das empresas nacionais para os centro de estudos de equivalência farmacêutica, a metodologia será considerada validada, desde que sejam avaliados os parâmetros de precisão, especificidade e linearidade. Cópia de toda a documentação original da validação da metodologia deverá ser anexada, como prova de que a metodologia foi originalmente validada e deverá conter, no mínimo, todos os parâmetros relacionados no item 1.7.

1.9. Para a garantia da qualidade analítica dos resultados, todos os equipamentos utilizados na validação devem estar devidamente calibrados e os analistas devem ser qualificados e adequadamente treinados.

1.10. Os testes são classificados em 4 categorias, conforme a Tabela 1.

TABELA 1. Classificação dos testes, segundo sua finalidade:

Categoria	Finalidade do teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

1.11. Para cada categoria será exigido um conjunto de testes, relacionados na Tabela 2.

TABELA 2. Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade:

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV	
		Quantitativo	Ensaio limite			
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim	
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não	
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não	
Precisão	Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
	Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não	
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não	
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não	
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não	

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

1.12. Metodologia analítica deverá ser revalidada nas seguintes circunstâncias:

1.12.1. Mudanças na síntese da substância ativa;

1.12.2. Mudanças na composição do produto acabado;

1.12.3. Mudanças no procedimento analítico.

Determinadas outras mudanças podem requerer validação também, dependendo da natureza das mudanças.

2. Metodologia

2.1. Especificidade e Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.

2.1.1. Para análise qualitativa (teste de identificação) é necessário demonstrar a capacidade de seleção do método entre compostos com estruturas relacionadas que podem estar presentes. Isto deve ser confirmado pela obtenção de resultados positivos (preferivelmente em relação ao material de referência conhecido) em amostras contendo o fármaco, comparativamente com resultados negativos obtidos com amostras que não contém o fármaco, mas compostos estruturalmente semelhantes.

2.1.2. Para análise quantitativa (teor) e análise de impurezas, a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras (fármaco ou medicamento) contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais. Quando a impureza ou o padrão do produto de degradação não estiverem disponíveis, pode-se comparar os resultados do teste das amostras contendo impurezas ou produtos de degradação com os resultados de um segundo procedimento bem caracterizado (por exemplo metodologia farmacopéica ou outro procedimento validado). Estas comparações devem incluir amostras armazenadas sob condições de estresse (por ex. luz, calor umidade, hidrólise ácida/básica, oxidação).

2.1.3. Em métodos cromatográficos, deve-se tomar as precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos. A utilização de testes de pureza de pico (por exemplo, com auxílio de detector de arranjo de fotiodos ou espectrometria de massas) são interessantes para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente.

2.2. Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

2.2.1. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes. Estas concentrações devem seguir os intervalos da Tabela 3.

2.2.2. Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do

coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. Se não houver relação linear, realizar transformação matemática.

2.2.3. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser = 0,99.

2.2.4. Deve-se apresentar as curvas obtidas (experimental e a resultante do tratamento matemático).

2.3. Intervalo

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método (Tabela 3). É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequados quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado.

TABELA 3 - Limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos analíticos.

Ensaio	Alcance
Determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas	De 80% a 120% da concentração teórica do teste
Determinação de impurezas	Do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado. Quando apresentarem importância toxicológica ou efeitos farmacológicos inesperados, os limites de
	Quantificação e detecção devem ser adequadas às quantidades de impurezas a serem controladas
Uniformidade de conteúdo	De 70% a 130% da concentração teórica do teste
Ensaio de dissolução	De $\pm 20\%$ sobre o valor especificado para o intervalo. Caso a especificação para a dissolução envolva mais que um tempo,
	O alcance do método deve incluir -20% sobre o menor valor e $+20\%$ sobre o maior valor.

2.4. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis.

2.4.1. Repetibilidade (precisão intra-corrída): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação.

A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste;

2.4.2. Precisão intermediária (precisão inter-corrídas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.

Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes.

2.4.3. Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopéias. Estes dados não precisam ser apresentados para a concessão de registro.

A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas.

A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a fórmula,

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

em que, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5%.

2.5. Limite de Detecção

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

2.5.1. O limite de detecção é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável;

2.5.2. No caso de métodos não instrumentais (CCD, titulação, comparação de cor), esta determinação pode ser feita visualmente, onde o limite de detecção é o menor valor de concentração capaz de produzir o efeito esperado (mudança de cor, turvação, etc).

2.5.3. No caso de métodos instrumentais (CLAE, CG, absorção atômica), a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base. Pode ser determinado pela equação,

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC}$$

em que: DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco; IC é a inclinação da curva de calibração.

2.6. Limite de Quantificação

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas.

O limite de quantificação é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito (por exemplo, porcentagem p/p ou p/V, partes por milhão) na amostra.

2.6.1. O limite de quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis. Pode ser expresso pela equação,

$$LD = \frac{DP_a \times 10}{IC}$$

em que: DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um apropriado número de amostras do branco; IC é a inclinação da curva de calibração.

2.6.2. Também pode ser determinado por meio do ruído. Neste caso, determina-se o ruído da linha de base e considera-se como limite de quantificação aquela concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10:1.

2.7. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.

Várias metodologias para a determinação da exatidão estão disponíveis:

2.7.1. Fármaco

2.7.1.1. aplicando-se a metodologia analítica proposta na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência);

2.7.1.2. comparação dos resultados obtidos com aqueles resultantes de uma segunda metodologia bem caracterizada, cuja exatidão tenha sido estabelecida;

2.7.2. Forma Farmacêutica

2.7.2.1. na análise de uma amostra, na qual quantidade conhecida de fármaco foi adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado);

2.7.2.2. nos casos em que amostras de todos os componentes do medicamento estão indisponíveis, aceita-se a análise pelo método de adição de padrão, no qual adiciona-se quantidades conhecidas do analito (padrão de referência) ao medicamento.

2.7.3. Impurezas

2.7.3.1. análise pelo método de adição de padrão, no qual adiciona-se quantidades conhecidas de impurezas e/ou produtos de degradação ao medicamento ou ao fármaco;

2.7.3.2. no caso da indisponibilidade de amostras de certas impurezas e/ou produtos de degradação, aceita-se a comparação dos resultados obtidos com um segundo método bem caracterizado (metodologia farmacopéica ou outro procedimento analítico validado).

A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança.

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. A exatidão é expressa pela

relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

2.8. Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal.

Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método à variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento.

A Tabela 4 relaciona os principais parâmetros que podem resultar em variação na resposta do método.

TABELA 4. Fatores que devem ser considerados na determinação da robustez do método analítico.

Preparo das Amostras	<ul style="list-style-type: none"> ·Estabilidade das soluções analíticas ·Tempo de extração
Espectrofotometria	<ul style="list-style-type: none"> ·Variação do pH da solução ·Temperatura ·Diferentes fabricantes de solventes
Cromatografia Líquida	<ul style="list-style-type: none"> ·Variação do pH da fase móvel ·Variação na composição da fase móvel ·Diferentes lotes ou fabricantes de colunas ·Temperatura ·Fluxo da fase móvel
Cromatografia Gasosa	<ul style="list-style-type: none"> ·Diferentes lotes ou fabricantes de colunas ·Temperatura ·Velocidade do gás de arraste

MÉTODOS BIOANALÍTICOS

1. Definições

Amostra – termo geral que abrange: controles, brancos, amostras processadas e desconhecidas.

Amostra branco – amostra de uma matriz biológica na qual nenhum analito foi adicionado, utilizada para avaliar a especificidade do método bioanalítico.

Amostra de Controle de Qualidade (CQ) – amostra de matriz biológica adicionada do analito, usada para monitorar o desempenho de um método bioanalítico e para avaliar a integridade e validade dos resultados das amostras desconhecidas analisadas numa corrida individual.

Amostra processada – extrato final (anterior à análise instrumental) de uma amostra que foi submetida a várias manipulações (ex.: diluição, extração, concentração).

Amostra desconhecida – amostra biológica que é objeto de análise.

Analito – composto químico específico a ser mensurado, podendo ser o fármaco não-transformado, biomolécula ou seu derivado, metabólito ou produto de degradação em uma matriz biológica.

Corrida analítica (ou lote) – conjunto completo de amostras em estudo, com um número apropriado de padrões e CQs para sua validação e que tem sua análise completa nas mesmas condições.

Especificidade – habilidade do método bioanalítico de medir e diferenciar o analito de componentes que possam estar presentes na amostra, tais como metabólitos, impurezas, compostos de degradação ou componentes da matriz.

Estabilidade – parâmetro que visa determinar se um analito mantém-se quimicamente inalterado numa dada matriz sob condições específicas, em determinados intervalos de tempo.

Exatidão – representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência.

Faixa de quantificação – corresponde a uma faixa de concentração, incluindo o LSQ e o LIQ, que pode ser confiável e reprodutivelmente quantificada com exatidão e precisão, por meio da relação concentração-resposta.

Limite de Detecção (LD) – menor concentração de um analito que o procedimento bioanalítico consegue diferenciar confiavelmente do ruído de fundo.

Limite Inferior de Quantificação (LIQ) – menor quantidade de um analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis.

Limite Superior de Quantificação (LSQ) – maior quantidade de um analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão.

Linearidade – corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame (analito).

Matriz biológica – material distinto de origem biológica, que pode ser amostrado e processado de modo reprodutível.

Método – descrição compreensível de todos os procedimentos usados em análises de amostras.

Padrão de calibração – matriz biológica a qual foi adicionada uma quantidade conhecida de analito. Os padrões de calibração são usados para construir a curva de calibração, com a qual são determinadas as concentrações do analito nos CQs e nas amostras desconhecidas em estudo.

Padrão Interno (PI) – composto, geralmente com características estruturais similares ao analito, adicionado aos padrões de calibração e amostras em concentrações conhecidas e constantes, para facilitar a determinação do analito.

Precisão – representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio.

Recuperação – eficiência de extração de um método analítico, expressa como a porcentagem da quantidade conhecida de um analito, obtida da comparação dos resultados analíticos de amostras branco acrescidas de padrão e submetidas ao processo de extração, com os resultados analíticos de soluções padrão não extraídas.

Reprodutibilidade – precisão entre dois laboratórios. Também representa a precisão do método sob as mesmas condições operacionais, num curto período de tempo.

Validação parcial – modificação no método bioanalítico validado que não requer a necessidade de uma revalidação total.

Validação total – estabelecimento de todos os parâmetros de validação de um método bioanalítico, aplicáveis à análise das amostras.

2. Considerações Gerais

2.1. As informações contidas neste guia aplicam-se a métodos bioanalíticos, tais como cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e estas combinadas com espectrometria de massa (MS) tais como LC-MS, LC-MS-MS, CG-MS, CG-MS-MS, utilizados na determinação quantitativa de fármacos e/ou metabólitos em matrizes

biológicas, tais como sangue, soro, plasma ou urina. Também se aplica a outras técnicas analíticas, tais como métodos microbiológicos e imunológicos, ou para outras matrizes biológicas, embora, nestes casos, pode-se observar um alto grau de variabilidade.

2.2. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, especificidade, reprodutibilidade, estabilidade e recuperação adequadas à análise. Desse modo, é importante ressaltar que todos os equipamentos e materiais devem apresentar-se devidamente calibrados e os analistas devem ser qualificados e adequadamente treinados.

2.3. Deve-se utilizar substâncias químicas de referência e /ou padrões biológicos oficializados pela Farmacopéia Brasileira ou por outros códigos autorizados pela legislação vigente. Serão admitidos estudos utilizando padrões secundários desde que seja comprovada sua certificação, na ausência de substâncias químicas de referência e/ou padrões biológicos farmacopéicos.

2.4. Para os estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência deve-se utilizar padrão interno, sempre que métodos cromatográficos forem utilizados. Deve-se justificar a impossibilidade de sua utilização.

2.5. Deve ser realizada validação total antes da implementação de um método bioanalítico para a quantificação de um fármaco e/ou metabólitos.

2.6. Devem ser realizadas validações parciais quando ocorrerem modificações no método bioanalítico já validado. Os ensaios de validação parcial podem ser desde uma pequena determinação, como a determinação da exatidão e precisão intra-ensaio, até próximo de uma validação total. As mudanças típicas que podem requerer uma validação parcial incluem, entre outras:

2.6.1. Transferências de métodos entre laboratórios e analistas;

2.6.2. Mudanças na metodologia analítica, por exemplo, substituição do sistema de detecção;

2.6.3. Mudança de anticoagulante na coleta das amostras;

2.6.4. Mudança de matriz, por exemplo, de plasma para urina;

2.6.5. Mudança no procedimento de preparação da amostra;

2.6.6. Mudanças relevantes na faixa de concentração;

2.6.7. Mudanças de instrumentos e/ou “softwares”;

2.6.8. Demonstração de seletividade do analito na presença de medicações concomitantes;

2.6.9. Demonstração de seletividade do analito na presença de metabólitos específicos.

2.7. A avaliação da robustez deve ser considerada durante a fase de desenvolvimento do método. Constatando-se suscetibilidade a variações nas condições analíticas, estas deverão ser adequadamente controladas ou precauções deverão ser incluídas no procedimento. Exemplos de variações:

2.7.1. Estabilidade das soluções analíticas.

2.7.2. Tempo de extração.

Variações típicas em cromatografia líquida:

2.7.3. Influência da variação de pH da fase móvel.

2.7.4. Influência da variação da composição da fase móvel.

2.7.5. Diferentes colunas (diferentes lotes e/ou fabricantes).

2.7.6. Temperatura.

2.7.7. Velocidade de fluxo.

Variações típicas em cromatografia gasosa:

2.7.8. Diferentes colunas (diferentes lotes e/ou fabricantes);

2.7.9. Temperatura;

2.7.10. Velocidade de fluxo.

3. Validação pré – estudo

3.1. Especificidade

3.1.1. Deve-se analisar amostras da matriz biológica (sangue, plasma, soro, urina, ou outra) obtidas de seis indivíduos, sendo quatro amostras normais, uma lipêmica e uma hemolisada, sob condições controladas referentes ao tempo, alimentação e outros fatores importantes para o estudo. Cada amostra branco deve ser testada utilizando o procedimento e as condições cromatográficas propostas. Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos com solução aquosa do analito, em concentração próxima ao LIQ.

3.1.2. Qualquer amostra branco que apresentar interferência significativa no tempo de retenção do fármaco, metabólito ou padrão interno, deve ser rejeitada. Caso uma ou mais das amostras analisadas apresentarem tal interferência, novas amostras de outros seis indivíduos devem ser testadas. Caso uma ou mais das amostras deste grupo apresentarem interferência significativa no tempo de retenção do fármaco, o método deve ser alterado visando eliminá-la.

3.1.3. Os interferentes podem ser componentes da matriz biológica, metabólitos, produtos de decomposição e medicamentos utilizados concomitantemente ao estudo. A

interferência da nicotina, cafeína, produtos de venda isenta de prescrição e metabólitos deve ser considerada sempre que necessário.

3.1.4. Caso o método seja destinado à quantificação de mais de um fármaco, cada um deve ser injetado separadamente para determinar os tempos de retenção individuais e assegurar que impurezas de um fármaco não interfiram na análise do outro.

3.1.5. A resposta de picos interferentes no tempo de retenção do fármaco deve ser inferior a 20% da resposta do LIQ. As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do fármaco e do padrão interno devem ser inferiores, respectivamente, a 20% e 5% da resposta na concentração utilizada.

3.2. Curva de calibração/linearidade

3.2.1. A curva de calibração representa a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito. Deve-se gerar uma curva de calibração para cada fármaco e corrida analítica, a qual será usada para calcular a concentração do fármaco nas amostras, utilizando-se a mesma matriz biológica proposta para o estudo. A curva de calibração deve incluir a análise da amostra branco (matriz biológica isenta de padrão do fármaco e do padrão interno), da amostra zero (matriz biológica mais o padrão interno) e de, no mínimo, 6 (seis) amostras contendo padrão do fármaco e padrão interno, contemplando o limite de variação esperado, do LIQ até 120% da concentração mais alta que se pretende analisar.

3.2.2. Para a determinação da curva de calibração, deve-se analisar amostras extraídas da matriz apropriada, no mínimo 6 (seis) concentrações diferentes. Procedimentos alternativos devem ser justificados, como na obtenção de uma correlação não-linear, em que um maior número de concentrações de padrões serão necessários.

3.2.3. Os resultados devem ser analisados por métodos estatísticos apropriados como, por exemplo, o cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Deve-se apresentar as curvas obtidas (experimental e a resultante do tratamento matemático), o coeficiente de correlação linear, o coeficiente angular e o intercepto da reta.

3.2.4. Critérios de aceitação da curva de calibração:

3.2.4.1. desvio menor ou igual a 20% (vinte por cento) em relação a concentração nominal para o LIQ;

3.2.4.2. desvio menor ou igual a 15 % (quinze por cento) em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração;

3.2.4.3. no mínimo quatro de seis concentrações da curva de calibração devem cumprir com os critérios anteriores, incluindo o LIQ e a maior concentração da curva de calibração;

3.2.4.4. o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98.

3.3. Precisão

3.3.1. A repetibilidade do método é verificada utilizando-se, no mínimo, 3 (três) concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de variação do procedimento, realizando-se, no mínimo, 5 (cinco) determinações por concentração.

3.3.2. A precisão deve ser determinada em uma mesma corrida (precisão intra-corrída) e em corridas diferentes (precisão inter-corrídas).

3.3.3. Pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), não se admitindo valores superiores a 15%, exceto para o LIQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20%, segundo a fórmula:

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100$$

onde, D P é o desvio padrão e C M D, a concentração média determinada.

3.4. Exatidão

3.4.1. A exatidão do método deve ser determinada utilizando-se, no mínimo, 3 (três) concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de variação do procedimento, realizando-se, no mínimo, 5 (cinco) determinações por concentração.

3.4.2. A exatidão deve ser determinada em uma mesma corrida analítica (exatidão intra-corrída) e em corridas diferentes (exatidão inter-corrídas).

3.4.3. O desvio não deve exceder 15%, exceto para o limite de quantificação, para o qual se admite desvios menores ou iguais a 20%.

3.4.4. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

3.5. Limite inferior de quantificação (LIQ)

3.5.1. Estabelecido por meio da análise de matriz biológica contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis.

3.5.2. Pode-se, também, utilizar a razão de 5:1 entre o sinal e o ruído da linha de base, devendo-se especificar o método utilizado para determinação do LIQ.

3.5.3. O LIQ deve ser, no mínimo, cinco vezes superior a qualquer interferência da amostra branco no tempo de retenção do fármaco.

3.5.4. O pico de resposta do fármaco no LIQ deve ser identificável e reprodutível com precisão de 20% (vinte por cento) e exatidão de 80 – 120 % (oitenta a cento e vinte por cento), através da análise de, no mínimo, 5 (cinco) amostras de padrões.

3.6. Limite de detecção (LD)

Estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do fármaco, até o menor nível detectável. Recomenda-se que o LD seja de 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base.

3.7. Recuperação

A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximos a 100% são desejáveis, porém, admite-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata.

3.7.1. Este teste deve ser realizado comparando-se os resultados analíticos de amostras extraídas a partir de três concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de linearidade do método, com os resultados obtidos com soluções padrão não extraídas, que representam 100% de recuperação.

3.7.2. O cálculo da recuperação deve ser feito em função da relação de área do padrão extraído e não extraído, tanto para o analito quanto para o padrão interno separadamente.

3.8. Controle de qualidade (CQ)

3.8.1. CQ do limite inferior de quantificação (CQ-LIQ): mesma concentração de LIQ.

3.8.2. CQ de baixa concentração (CQB): menor ou igual 3 x LIQ.

3.8.3. CQ de média concentração (CQM): aproximadamente a média entre CQB e CQA

3.8.4. CQ de alta concentração (CQA): 75 a 90% da maior concentração da curva de calibração.

3.9. Estudo de estabilidade do fármaco em Líquidos biológicos:

3.9.1. Considerações específicas relevantes

Para a realização do estudo de estabilidade devem ser observados os parâmetros de exatidão, precisão, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, especificidade, limite de variação e robustez, previamente validados.

A estabilidade do fármaco em líquidos biológicos depende de suas propriedades químicas, da matriz biológica e do material de acondicionamento utilizado. A estabilidade determinada para um tipo de matriz e de material de acondicionamento específico não pode ser extrapolada para outros.

As condições de realização dos ensaios de estabilidade devem reproduzir as reais condições de manuseio e análise das amostras. Deve ser avaliada a estabilidade do analito durante a coleta e manuseio da amostra, após armazenagem de longa duração (congelamento) e curta duração (à temperatura ambiente), após ciclos de congelamento e descongelamento e nas condições de análise. Deve-se incluir também avaliação da estabilidade do analito nas soluções-padrão, preparadas com solvente apropriado em concentrações conhecidas.

As determinações de estabilidade devem utilizar um conjunto de amostras, preparadas a partir de uma solução estoque recente do fármaco em análise, adicionado à matriz biológica isenta de interferência.

3.9.2. Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

Deve-se testar a estabilidade do fármaco após três ciclos de congelamento e descongelamento, utilizando-se, no mínimo, três amostras das concentrações baixa e alta determinadas na validação do método analítico, nas seguintes condições: as amostras devem ser congeladas à temperatura indicada para o armazenamento e mantidas por 24 horas, sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas, as amostras devem ser novamente congeladas à temperatura indicada para o armazenamento, por 12 a 24 horas e, assim sucessivamente, até contemplar os três ciclos, quantificando-se o fármaco nas amostras após o terceiro ciclo. Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém-preparadas.

3.9.3. Estabilidade de curta duração

Para verificação dessa estabilidade utilizam-se, no mínimo, três amostras das concentrações baixa e alta determinadas na validação do método analítico. Cada uma delas deverá permanecer à temperatura ambiente de 4 (quatro) a 24 (vinte e quatro) horas (baseado no tempo em que as amostras do estudo serão mantidas à temperatura ambiente) e analisadas. Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém-preparadas.

3.9.4. Estabilidade de longa duração

3.9.4.1. O tempo de armazenamento para o estudo de estabilidade de longa duração deve exceder o intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra e a análise da última, de acordo com o cronograma apresentado no protocolo de estudo de biodisponibilidade relativa/bioequivalência.

3.9.4.2. A temperatura utilizada no ensaio deve reproduzir a recomendada para armazenamento das amostras, normalmente igual a -20 °C.

3.9.4.3. Para verificação dessa estabilidade utilizam-se, no mínimo, três amostras das concentrações baixa e alta determinadas na validação do método analítico. As concentrações de todas as amostras de estabilidade devem ser comparadas com a média dos valores anteriormente calculados para as amostras do primeiro dia do teste.

3.9.5. Estabilidade pós-processamento

Em caso de utilização de equipamentos que empregam sistemas automáticos de amostragem/injeção, deve-se realizar estudo de estabilidade do fármaco, na amostra processada para análise, incluindo o padrão interno, na temperatura sob a qual o teste será realizado e por período de tempo superior à duração da corrida analítica. Utiliza-se, no mínimo, três amostras das concentrações baixa e alta determinadas na validação do método analítico. Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém-preparadas.

3.9.6. Estabilidade das soluções-padrão

3.9.6.1. Deve ser avaliada a estabilidade das soluções-padrão do fármaco e do padrão interno, mantidas à temperatura ambiente por, no mínimo, 6 (seis) horas após preparação.

3.9.6.2. Em caso de tais soluções serem armazenadas sob refrigeração ou congelamento, a estabilidade também deve ser avaliada, contemplando a temperatura e o período de armazenamento das mesmas.

3.9.6.3. Os resultados desse teste devem ser comparados com aqueles obtidos utilizando-se soluções recentemente preparadas do fármaco e do padrão interno.

3.9.7. Análise dos resultados

As amostras serão consideradas estáveis quando não se observar desvio superior a 15% do valor obtido das amostras recém-preparadas, com exceção do LIQ, para o qual se aceita desvio de até 20%. Qualquer que seja o método estatístico utilizado para avaliar os resultados dos estudos de estabilidade, este deverá estar descrito claramente no procedimento operacional padrão (POP).

4. Critérios de aplicação do método bioanalítico validado

4.1. A análise de todas as amostras de um analito em matriz biológica deve ser concluída dentro do período de tempo para o qual a estabilidade tenha sido determinada.

4.2. Uma corrida analítica deve conter: amostras de CQ, padrões de calibração e amostras desconhecidas de um ou mais voluntários do estudo. É preferível que todas as amostras de um mesmo voluntário sejam analisadas numa única corrida.

4.3. Não é permitido estimar a concentração das amostras através de extrapolação da curva de calibração abaixo do LIQ ou acima do maior padrão. Em vez disso, a curva deve

ser redefinida ou as amostras de concentrações superiores devem ser diluídas e re-analisadas.

4.4. No uso rotineiro do método analítico validado, sua precisão e exatidão devem ser monitoradas regularmente para assegurar a continuidade do desempenho satisfatório. Para atingir este objetivo, amostras de CQ devem ser analisadas juntamente com as demais amostras, em cada corrida analítica.

4.5. As amostras de CQ devem ser incorporadas em intervalos adequados, dependendo do número total de amostras da corrida, sempre em igual número de replicatas de cada concentração (CQB, CQM e CQA).

4.6. O número de amostras de CQ (em múltiplos de três) a ser incorporado em cada corrida analítica não deve ser inferior a 5% (cinco por cento) do número de amostras desconhecidas. Para corridas analíticas constituídas de até 120 amostras, pelo menos 6 (seis) CQs (uma duplicata de cada concentração) devem estar presentes.

4.7. Os resultados das amostras de CQ servirão de base para aceitação ou rejeição da corrida analítica. No mínimo, 67% (quatro de seis) das amostras de CQ devem estar dentro de mais ou menos 15% dos seus respectivos valores nominais, exceto para o LIQ, para o qual se admite desvios menores ou iguais a 20%; 33%.