

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

DETERMINAÇÃO DE FLUNARIZINA EM PLASMA HUMANO
UTILIZANDO CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE
MASSAS.

Gilvan Vieira do Carmo

Bragança Paulista – SP

2009

Universidade São Francisco
Programa de Pós Graduação Stricto Sensu em Ciências da
Saúde
Área de Farmacologia Clínica e Geral

DETERMINAÇÃO DE FLUNARIZINA EM PLASMA HUMANO
UTILIZANDO CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE
MASSAS.

Gilvan Vieira do Carmo

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde, da Universidade São
Francisco – USF.

Orientador:
Prof. Dr. Eduardo César Meurer

BRAGANÇA PAULISTA – SP

2009

QV 38
C285d

Carmo, Gilvan Vieira do.

Determinação de flunarizina no plasma humano utilizando cromatografia líquida alta eficiência acoplada a espectrometria de massas / Gilvan Vieira do Carmo. -- Bragança Paulista, 2009.
54 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

Orientação: Eduardo César Meurer.

1. Flunarizina. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência. 3. Espectrometria de massas. 4. Equivalência terapêutica. I. Meurer, Eduardo César. II. Título.



CARMO, Gilvan Vieira do. “Determinação de Flunarizina no Plasma Humano Utilizando Cromatografia Líquida Alta Eficiência 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. Gezimari Donizetti de Souza
Universidade Federal de São Carlos

Universidade São Francisco
Programa de Pós Graduação Stricto Sensu em Ciências da
Saúde
Área de Farmacologia Clínica e Geral

DETERMINAÇÃO DE FLUNARIZINA EM PLASMA HUMANO UTILIZANDO
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A
ESPECTROMETRIA DE MASSAS.

Gilvan Vieira do Carmo

Orientador: Prof. Dr. Eduardo César Meurer

Data defesa:

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Luiz Alberto B. Moraes, USP- Ribeirão Preto
Doutor pela UNICAMP – Campinas , Brasil.

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

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

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

AGRADECIMENTOS

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

Minha família, em especial minha mãe Maria do Socorro, aos meus irmãos Gilberto e Luiz Sergio, por sempre participarem de todos os momentos de minha vida.

Ao meu querido e amado filho Arthur, que veio para dar um novo sentido a minha vida.

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

A direção da Unifag, Dr. Pedrazzoli, Dra. Silvana Calafatti, pelo o apoio e oportunidade de vivencia toda a rotina de um centro de bioequivalência.

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

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

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

RESUMO

Um sensível e específico método (LC-MS/MS) envolvendo cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas para quantificação de Flunarizina em plasma humano. O preparo das amostras consistia na adição de Cinarizina como padrão interno, a extração era líquido-líquido em condições básicas usando uma mistura de hexano/acetato de etila (1:1 v/v) como solvente de extração, em seguida centrifugou-se, depois evaporou-se o solvente sob fluxo de ar comprimido e em seguida o resíduo foi ressuspendido em metanol.

Ambos compostos Flunarizina e Cinarizina foram analisados usando uma coluna C18 e uma fase móvel composta por Acetonitrila/acetato de amônia 10 mmol.l⁻¹ (9:1 v/v). A eluição do composto foi monitorada usando electrospray (ESI) no modo positivo. As análises eram executadas por monitoração de reações múltiplas (SRM) usando a molécula protonada combinada com o fragmento iônico de m/z 404>203,0 (Flunarizina) e m/z 369,4>167,0 (Cinarizina). A resposta da área do pico do analito e do padrão foi usada para quantificação da Flunarizina. O limite alcançado de quantificação foi de 0,3 ng/mL. O estudo exibiu um intervalo dinâmico linear de 0,3 - 150,0 ng/mL com um coeficiente de correlação de pelo menos 0,98. Os resultados da validação demonstrados na linearidade, especificidade, precisão, exatidão e estabilidade das amostras analisadas que começou depois de 96 horas após a administração oral de Flunarizina 10 mg em voluntários saudáveis, demonstrou a aplicabilidade deste método analítico para estudos de bioequivalência.

ABSTRACT

A sensitive and specific liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for flunarizine quantification (I) in human plasma is presented. Sample preparation consisted of addition of cinnarizine (II) as internal standard (IS), liquid-liquid extraction in basic conditions using a mixture of hexane/ethyl acetate (1:1; v/v) as extracting solvent, followed by centrifugation, solvent evaporation and sample reconstitution in methanol. Both I and II (internal standard) were analyzed using a C18 column and a mobile-phase composed of acetonitrile: ammonium acetate 10 mmol.l⁻¹ (9:1; v/v). Eluted compounds were monitored using positive mode electrospray (ES) tandem mass spectrometry. Analyses were carried out by selected reaction monitoring (SRM) using the protonated molecule to ionic fragment combinations of m/z 404.5 > 203.0 (flunarizine) and m/z 369.4 > 167.0 (cinnarizine). The peak areas ratio (response) of the analyte and IS were used for quantification of I. The achieved limit of quantification (LOQ) was 0.3 ng/mL; the assay exhibited a linear dynamic range of 0.3 -150.0 ng/ml with a determination coefficient of at least 0.98. Validation results on linearity, specificity, accuracy, precision and stability, as well as on application to the analysis of samples taken up to 96 h after oral administration of 10mg of I in healthy volunteers, demonstrated the applicability of this analytical method to bioequivalence studies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas Químicas da (a) Flunarizina e (b) Cinarizina.....	12
Figura 2. Parâmetros farmacocinéticos avaliados na BE: ASC0-t, Tmax, Cmax.....	24
Figura 3. Equipamentos de CLAE e Espectrômetro de massas.....	27
Figura 4. Componentes do Espectrômetro de Massas.....	28
Figura 5. Ionização Electrospray (ESI): Transferência de íons da solução para a fase gasosa.....	29
Figura 6. Processos da ionização: Fissão Coulombica (Coulombic Fission) e Evaporação Iônica (Ionic Evaporation).....	29
Figura 7. Analisador de Massas Quadrupolar.....	30
Figura 8. Utilização da espectrometria de massas em diferentes áreas do conhecimento (CROTTI, 2006).....	31
Figura 9. Esquema analítico em um espectrômetro de massas triploquadrupolo.....	35
Figura 10. Esquema do interior de um de massas triploquadrupolo.....	35
Figura 11. Representação dos símbolos usados em um experimento b) MS2 e c) MS3.....	36
Figura 12. Proposta de fragmentação da Flunarizina.....	40
Figura 13. Proposta de fragmentação da Cinarizina.....	41
Figura 14. Estrutura química da Cinarizina (C ₂₆ H ₂₈ N ₂).....	45
Figura 15. Espectro de MS da Flunarizina em modo MS.....	46
Figura 16. Espectro do íons produtos no modo MS/MS.....	47

Figura 17. Esquema de extração líquido-líquido.....	50
Figura 18. Cromatograma de amostras de plasma branco normal, referente ao analito e ao padrão interno, demonstrando que não existe interferência em nenhum dos canais.....	52
Figura 19. Cromatograma de amostras de plasma branco normal, referente ao analito e ao padrão interno, demonstrando que não existe interferência em nenhum dos canais.....	53
Figura 20. Cromatograma do plasma branco lipêmico (A,B), referente ao branco do analito, referente ao branco do padrão interno. Cromatograma do plasma branco Hemolisado (C,D), referente ao branco do analito, referente ao branco do padrão interno.....	54
Figura 21. Cromatograma referente a Solução de Flunarizina 0,3 ng/mL (LQ).....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Preparo da curva de calibração para a Flunarizina.....	38
Tabela 2: Preparo dos controles de qualidade da Flunarizina.....	38
Tabela 3: Resultados de teste de colunas para Flunarizina.....	48
Tabela 4: Resultados de teste de colunas para Cinarizina.....	48
Tabela 5: Teste entre Solvente Orgânico.....	48
Tabela 6: Teste utilizando diferentes Proporções entre acetonitrila e Água	49
Tabela 7: Avaliação de Acetonitrila + Aditivos.....	49
Tabela 8. Avaliação Solvente de Extração.....	49
Tabela 9: Amostras do fluido biológico plasma (Flunarizina).....	51
Tabela 10: Dados da Curva de Calibração da Flunarizina.....	56
Tabela 11: Análise Intra-Lote do Controle de Qualidade LQ da Flunarizina.....	57
Tabela 12: Análise Intra-Lote dos Controles de Qualidade CQB, CQM e CQA da Flunarizina	57
Tabela 13: Análise Intra-Lote dos Controles de Qualidade da Flunarizina em plasmas Lipêmico e Hemolisado.....	58
Tabela 14: Análise Inter-Lotes do Controle de Qualidade LQ da Flunarizina.....	58
Tabela 15: Para análise Inter-Lotes dos Controles de Qualidade CQB, CQM e CQA da Flunarizina.....	58
Tabela 16: Análise da percentagem de recuperação do fármaco Flunarizina.....	59

Tabela 17: Análise da percentagem de recuperação do padrão interno Cinarizina.....	59
Tabela 18: Estudo de estabilidade da Flunarizina em plasma submetido a três ciclos de congelamento e degelo.....	60
Tabela 19: Variação das médias dos controles de qualidade para Flunarizina nos ciclos de congelamento e degelo em relação as médias das amostras recém-preparadas.....	60
Tabela 20: Estabilidade das soluções padrão para a Flunarizina e Cinarizina.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de variância.

ASC – Área sob curva da concentração plasmática em relação ao tempo.

ANVISA – Agência Nacional de vigilância sanitária.

CID – Código internacional de doenças.

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência.

C_{max} – Concentração plasmática máxima.

CQB – Controle de qualidade baixo.

CQM – Controle de qualidade Médio.

CQA – Controle de qualidade alto.

CV – Coeficiente de variação.

DP – Desvio padrão.

ESI – Ionização por electrospray, do inglês electrospray ionization.

FDA – Administração de alimentos e drogas, do inglês Food and drug administration.

GC – Cromatografia gasosa.

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês High performance liquid chromatography.

IS – Padrão interno.

LC – Cromatografia líquida de alta eficiência.

LC-MS – Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.

LQ – Limite de quantificação.

MRM – Monitoramento de reações múltiplas, do inglês multiple reaction monitoring.

MS/MS – Espectrometria de massas.

m/z – Razão massa/carga, do inglês mass to charge ratio.

µg – Micrograma.

ng/mL – Nanograma por mililitro.

OMS – Organização mundial de saúde.

RE – Resolução.

RF – Rádio-frequência.

rpm – Rotação por minuto.

SRM – Selected reaction monitoring.

SNC – Sistema nervoso central.

UV - Ultravioleta.

T_{max} – Tempo para obtenção do C_{max}.

v/v – Volume por volume.

SUMÁRIO

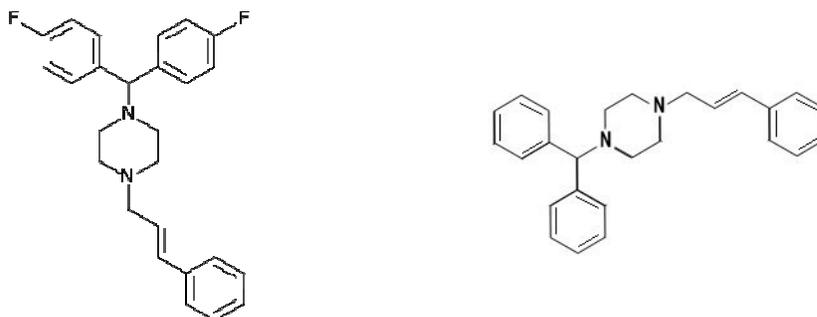
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Flunarizina.....	12
1.2. Medicamento Genérico	14
1.2.1 Conceitos Aplicáveis	15
1.2.2 Histórico.....	17
1.3. Ensaio clínico de Medicamentos no Brasil	20
1.3.1. Biodisponibilidade e Bioequivalência	23
1.4. Técnicas usadas para validação de métodos bioanalíticos utilizados em estudos de Bioequivalência	25
1.4.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	25
1.4.2. Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas CLAE-EM/EM	26
1.4.3. Ionização por Eletrospray (ESI)	28
3.6. Métodos Analíticos para determinação da Flunarizina	32
2. OBJETIVO	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1. Materiais	34
3.1.2. Padrões	34
3.2 Equipamentos	34
3.2.1 Espectrometro Quadrupolo	34
3.2.1.1. Triploquadrupolo	34
3.2.1.2 A simbologia dos experimentos de espectrometria de massas seqüencial	36
3.3. Métodos.....	36
3.3.1. Preparo das Soluções Usadas.....	36
3.3.1.1 Soluções Padrão	36
3.3.1.2 Solução Padrão de Flunarizina	36
3.3.1.3 Solução Padrão Cinarizina.....	37
3.3.2. Fase móvel usada no trabalho	37
3.3.2.1. Preparo da fase móvel Acetonitrila:Acetato de Amônio 10mmol L-1 (9:1)	37
3.4. Preparo dos padrões da curva de calibração e das amostras controle de qualidade	37
3.4.1. Preparo dos padrões da curva de calibração	37
3.4.2. Preparo das amostras dos controles de qualidade.....	38
3.5. Montagem da seqüência de determinações das amostras	39
3.6.1. Princípios do Método.....	39
3.6.2. Extração das amostras.....	39
3.6.3. Condições cromatográficas.....	39
3.6.4. Condições de detecção no Espectrômetro de Massas no modo MS/MS.....	40
3.6.5. Proposta de Fragmentação Para Flunarizina e Cinarizina	40
3.6.5. Validação do Método Analítico.....	41
3.6.5.1. Parâmetros para validação de métodos bioanalíticos	41

3.6.5.1.1 Seletividade.....	42
3.6.5.1.2. Recuperação.....	42
3.6.5.1.3. Limite de quantificação.....	42
3.6.5.1.4. Linearidade.....	43
3.6.5.1.5. Curva resposta.....	43
3.6.5.1.6. Precisão.....	43
3.6.5.1.7. Exatidão.....	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1. Desenvolvimento.....	45
4.2. Validação do Método Bioanalítico.....	50
4.2.1.1. Especificidade.....	51
4.2.1.2. Curva de calibração.....	55
4.2.1.2.1. Determinação do limite de quantificação.....	55
4.2.1.3. Linearidade.....	56
4.2.1.3.1. Precisão e Exatidão.....	56
4.2.1.3.2. Determinação das concentrações dos controles de qualidade.....	57
4.2.1.3.3. Validação intra-lote.....	57
4.2.1.3.4. Validação inter-lotes.....	58
4.2.1.3.6. Recuperação.....	59
4.3. Avaliação.....	59
4.4. Estudo de estabilidade do fármaco no fluido biológico.....	60
4.4.1. Estabilidade do fármaco em ciclos de congelamento e degelo.....	60
4.5. Estabilidade de soluções padrão.....	61
5. CONCLUSÃO.....	62
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
7. ANEXO.....	66

1. INTRODUÇÃO

1.1 Flunarizina

Flunarizina é uma droga com capacidade de inibir canais de cálcio nas células, possuindo também ação anti-histamínica, anti-serotoninérgica e anti-dopaminérgica (PIONER, 2005). A Flunarizina Figura 1(a) abaixo, na verdade, é um derivado difluorinado da Cinarizina Figura 1(b) abaixo, que apresenta um radical piperazínico em sua molécula, o que a torna estrutural e quimicamente semelhante às drogas neurolépticas e anti-histamínicas (Micromedex).



a) Flunarizina ($C_{26}H_{26}F_2N_2$), MM: $404,5 \text{ g/mol}^{-1}$ b) Cinarizina ($C_{26}H_{28}N_2$), MM: $368,5 \text{ g/mol}^{-1}$

Figura 1. Estruturas Químicas da (a) Flunarizina e (b) Cinarizina.

A Flunarizina é bem absorvida no trato gastrointestinal, com os picos plasmáticos ocorrendo de 2 a 4 horas após a administração. A Flunarizina é lipofílica e a ligação com proteínas plasmáticas também é alta (mais de 90%). O metabolismo ocorre no fígado, e menos do que 0,01% da droga inalterada é excretada na urina em 48 horas (PIONER, 2005).

Esta droga é indicada na profilaxia da enxaqueca (com ou sem aura), vertigem de origem central ou periférica, doenças vasculares periféricas em geral, labirintopatias de qualquer etiologia, doenças circulatórias acompanhadas de vertigens ou tonturas, arteriopatas dos membros inferiores em geral, claudicação intermitente, angiopatia diabética, distúrbios funcionais em angiologia com sintomatologia do tipo parestesias, câimbras, dores de repouso e alterações tróficas, insuficiência circulatória cerebral, acompanhada de alterações de memória, sono, concentração, comportamento, depressão e outros sintomas. A maior diferença entre a Flunarizina e a Cinarizina é o tempo de meia-vida de eliminação, que é de cerca de 3 horas para a Cinarizina e de 2 a 7 semanas para a Flunarizina (HOLMES et al., 1984). Os efeitos colaterais mais comuns são sonolência e/ou fadiga (20%), geralmente transitórias, e ganho de peso (ou aumento do apetite) (11%). Podem ser observadas durante o tratamento a longo prazo: depressão, com risco mais

importante em mulheres com antecedentes depressivos; sintomas extrapiramidais (bradicinesia, rigidez, acatisia, discinesia orofacial, tremor), com risco mais importante em idoso. Outras reações adversas menos frequentes são: gastrintestinal, pirose, náusea, dor abdominal; SNC: insônia, ansiedade. Outras: galactorréia, boca seca, dores musculares, erupções cutâneas e alterações visuais (HOLMES, 1984).

Estudos subseqüentes demonstraram que a Flunarizina é um antagonista de receptores D2 de dopamina (como todos os antipsicóticos), com afinidade moderada, além de apresentar baixo efeito anticolinérgico. A finalidade da Flunarizina para os receptores D2 é intermediária entre a da Olanzapina e Clozapina, que é a principal característica dos antipsicóticos atípicos. Os fatores de risco para desenvolver sintomas extrapiramidais (É um estado neurológico normalmente produzido pela Doença de Parkinson ou, mais comumente, como efeito colateral dos neurolépticos ou antipsicóticos; substâncias usadas no tratamento da esquizofrenia e outras psicoses.) com a Flunarizina são: idade (especialmente > 70 anos), sexo feminino e uso prolongado (mais de seis meses). Apesar do perfil favorável para sua aplicação na psiquiatria, a Flunarizina nunca foi considerada para o tratamento de esquizofrenia ou de transtornos psicóticos. Estudos prévios foram conduzidos para explicar a ocorrência dos sintomas extrapiramidais, o que limitou seu uso para as indicações terapêuticas habituais, ao invés de expandir seu potencial terapêutico como antipsicótico ou antimaníaco. Existem apenas dois casos de Flunarizina em psiquiatria. em uma paciente com transtorno bipolar com 20 episódios maníacos prévios não responsivos ao tratamento com lítio, a Flunarizina produziu um efeito terapêutico que foi atribuído às suas propriedades bloqueadoras dos canais de cálcio, e outro caso foi de um paciente com depressão involutiva (segundo CID 9) associada a distúrbios cerebrovasculares após tratamento com Flunarizina, comparado ao tratamento placebo (BISOL, 2008).

Outro fator surpreendente é que a longa meia-vida de eliminação da Flunarizina (2 a 7 semanas) é frequentemente desconsiderada na prática clínica, sendo normalmente prescrita na dose diária de 10 mg, sem redução de dose ou aumento de intervalo entre as doses após uso a longo prazo (mais de seis meses), quando os efeitos adversos podem ocorrer simplesmente devido ao acúmulo da droga. Poucos estudos adequadamente consideram esta característica farmacocinética. Foi observado que o benefício para os movimentos coreicos depois de uma dose única de 20 mg de Flunarizina em pacientes com coreia de Huntington durava pelo menos uma semana. (HOLMES et al.,1984)

A Flunarizina é um bloqueador não específico de canais de cálcio (o aumento na concentração intracelular de cálcio promove eventos como liberação de neurotransmissores, aumento da atividade sináptica, modulação de diversas enzimas e indução de morte celular), com finalidade de moderada a alta, com relevância comportamental (BISOL, 2008).

A Flunarizina é um potente inibidor de canais de Na⁺ baseado em estudos de *binding* de [³H]-BTX-B a canais de Na⁺ e em parâmetros eletrofisiológicos. Também foi demonstrado que este mecanismo preveniu a neurotoxicidade por antagonistas de receptores NMDA, que constitui o modelo farmacológico para a disfunção glutamatérgica na esquizofrenia (BISOL, 2008).

A Flunarizina também apresentou um efeito neuroprotetor em modelos de isquemia cerebral, lesões nervosas, e implante neuronal, o que pode favorecer a plasticidade neural por atenuar o postulado déficit de atividade trófica e atenuar a vulnerabilidade à excitotoxicidade e neurodegeneração na esquizofrenia (BISOL, 2008).

Também se mostrou com ação anticonvulsivante em animais e humanos com significativas reduções na frequência de convulsões. Após o tratamento com Flunarizina foi observado uma melhora do desempenho cognitivo em idosos com síndrome cerebral orgânica, e em pacientes com doença cerebrovascular crônica, o que pode ser relevante para a esquizofrenia, já que a cognição é fundamental na síndrome e responsável por grande parte da morbidade e prejuízo funcional causada pela doença (PIONER, 2005).

A Flunarizina não apresenta antagonismo significativo de receptores 5-HT e é um fraco antagonista de receptores H1 de histamina. Ela é geralmente bem tolerada e segura, como verificado também pelo seu uso freqüente e prolongado em idosos (com exceção da parkinsonismo quando a dose não é ajustada), sendo sonolência leve e ganho de peso de 2-4 Kg no longo prazo os efeitos adversos mais comuns. No ensaio clínico para epilepsia refratária, em que a Flunarizina foi usada geralmente na dose diária de 30-40 mg, o ganho de peso médio foi de 3,9 Kg após 25 semanas (PIONER, 2005).

1.2. Medicamento Genérico

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.

Neste contexto, insere-se a política nacional de medicamentos, cujo propósito é garantir o acesso da população aos medicamentos considerados essenciais, bem como a sua necessária segurança, eficácia e qualidade (CLAUDIA, 2006).

Dentre as estratégias para a promoção do acesso a medicamentos, encontra-se a política de medicamentos genéricos, que são, em geral mais baratos que os medicamentos inovadores devido em grande parte ao fato de não recaírem sobre o genérico os custos relativos ao desenvolvimento da nova molécula e dos estudos clínicos necessários. Outro fator que contribui para um custo mais baixo é o menor investimento em propaganda para tornar a marca conhecida (ANVISA, 2009).

Os medicamentos genéricos são medicamentos similares a um produto de referência ou inovador, que pretende ser com este intercambiável, geralmente produzido após a expiração ou renúncia da proteção patentária ou de outros direitos de exclusividade, comprovada a sua eficácia, segurança e qualidade (ANVISA, 2009).

O mercado farmacêutico brasileiro possui algumas particularidades que auxiliam a compreensão do processo de implantação de medicamentos genéricos. Ele é um dos maiores do mundo, ocupando a oitava posição em vendas.

O medicamento genérico, sem dúvida, contribuiu para o acirramento da concorrência do setor farmacêutico nacional. O principal fator é o preço, pois os genéricos são em média mais baratos que os medicamentos de referência.

Essa pressão competitiva fez com que os laboratórios produtores de medicamentos de marca adotassem estratégias para que seus produtos ficassem mais competitivos em relação aos genéricos. Como saída para não perder consumidores, alguns laboratórios produtores de medicamentos de marcas diminuíram o preço de seus produtos, como forma de estimular as vendas. O preço do medicamento de marca são sensíveis ao aumento do número de genéricos no mercado nacional.

Estas tendências são interessantes do ponto de vista da sociedade brasileira, isso porque se os preços dos medicamentos de marca se reduzem como resposta ao aumento da concorrência, tende a ocorrer uma queda no custo de tratamentos de doenças e/ou um aumento do número de compradores, devido à entrada no mercado de pessoas de renda baixa que passariam a comprar os medicamentos mais baratos.

1.2.1 Conceitos Aplicáveis

Sempre que utilizamos o termo “medicamento” estamos mencionando toda substância contida em um produto farmacêutico empregado para modificar ou explorar sistemas fisiológicos ou estados patológicos, em benefício do usuário. Quando falamos de uma molécula que possui atividade biológica testada e conhecida, utilizada para tratamento de patologias (doenças), estaremos falando de fármaco, proveniente do termo grego “Pharmakon”, cujo significado é “droga”, que constitui-se em “qualquer entidade química ou mistura de drogas (mas outras que não aquelas necessárias para a manutenção da saúde, como por exemplo água e oxigênio), que alteram, a função biológica e possivelmente a sua estrutura” (ANVISA, 2009). Ou seja, medicamento é o fármaco em sua forma terapêutica.

Medicamento Genérico: entende-se como medicamento genérico, na referência da OMS "produto farmacêutico intercambiável", um produto farmacêutico que pretende ser intercambiável com o produto inovador, geralmente produzido após a expiração da proteção patentária ou outros direitos de exclusividade, independente de autorização da companhia farmacêutica inovadora. (Lei n° 9.787).

Produto Farmacêutico Intercambiável: um produto farmacêutico é intercambiável quando é equivalente terapêutico a um medicamento de referência. (Lei n° 9.787).

Denominação Genérica: nome empregado para distinguir um princípio ativo que não está amparado por marca comercial. É usado comumente por diversos fabricantes e reconhecido pela autoridade competente para denominar produtos farmacêuticos que contenham o mesmo princípio ativo. O nome genérico geralmente corresponde ao da Denominação Comum Brasileira (DCB) ou, complementarmente, da Denominação Comum Internacional (DCI), recomendada pela OMS. (Lei n° 9.787).

Medicamento Inovador: em geral, é aquele com marca, autorizado em primeiro lugar para comercialização (normalmente como medicamento patentado), com base em documentação de eficácia, segurança e qualidade, reconhecidas pela autoridade sanitária nacional. Quando um medicamento está disponível há muitos anos, pode não ser possível identificá-lo como produto farmacêutico inovador. (Lei n° 9.787).

Medicamento de Referência: corresponde a um produto comercializado, com o qual outros produtos pretendem ser intercambiáveis na prática clínica. Geralmente corresponde ao produto farmacêutico inovador ou, na sua ausência, ao líder de vendas no mercado, para o qual se comprovam a eficácia, a segurança e a qualidade. (Lei n° 9.787).

Medicamento Similar: é aquele que contém o mesmo princípio ativo, a mesma concentração, a mesma forma farmacêutica, a mesma via de administração, a mesma indicação terapêutica, a mesma posologia e que é equivalente ao medicamento de referência, podendo diferir somente em características de tamanho, forma, prazo de validade, embalagem, rotulagem e excipientes. (Lei n° 9.787).

Biodisponibilidade: é a taxa e o grau de absorção (velocidade e totalidade) de um princípio ativo proveniente de uma forma de dosificação, de acordo com o determinado por sua curva de concentração - tempo na circulação sistêmica ou pela sua excreção na urina. (Lei n° 9.787).

Bioequivalência: dois produtos são bioequivalentes, se forem farmacêuticamente equivalentes e se suas biodisponibilidades depois da administração da mesma dose molar, são similares em tal grau que seus efeitos sejam essencialmente os mesmos. (Lei n° 9.787).

Equivalência Farmacêutica: dois produtos são farmacêuticamente equivalentes, se contém a mesma quantidade da mesma substância ativa, na mesma forma farmacêutica, se tem padrões idênticos ou comparáveis e se estão indicados para administração pela mesma via. Entretanto, equivalência farmacêutica não necessariamente acarreta equivalência terapêutica, tendo em vista que as diferenças nos excipientes e/ou no processo de fabricação podem conduzir a diferenças no desempenho do produto. (Lei n° 9.787).

Equivalência Terapêutica: dois produtos farmacêuticos são terapêuticamente equivalentes, se forem farmacêuticamente equivalentes, depois de sua administração na

mesma dose molar, se seus efeitos com respeito à eficácia e a segurança forem essencialmente os mesmos, determinados através de estudos apropriados (bioequivalência, farmacodinâmicos, clínicos ou provas *in vitro*. (Lei n° 9.787).

1.2.2 Histórico

A indústria de medicamentos genéricos teve origem na década de 60, por iniciativa do governo dos EUA. A implantação dessa política foi tão satisfatória que, atualmente, os genéricos representam 72% do receituário médico. Outros países, como Japão e alguns europeus, copiaram tal política. Esta é realizada com sucesso há mais de 20 anos (DIAS, 2006).

Os medicamentos similares surgiram após 1971, quando o Brasil decidiu não reconhecer patentes para medicamentos. O mercado para a produção de cópias de remédios patenteados em outros países foi aberto para os laboratórios nacionais. Essa situação perdurou até 1976, quando a Lei n° 6.360/76 os colocou sob controle da Vigilância Sanitária (STORPIRTIS, 2001).

Desde 1976, as indústrias farmacêuticas foram autorizadas a registrar produtos similares ao medicamento inovador ou original. Vale lembrar que medicamento similar é aquele que contém o mesmo princípio ativo, a mesma concentração, a mesma forma farmacêutica, a mesma via de administração, a mesma indicação terapêutica, a mesma posologia, podendo diferir somente em características de tamanho, forma, prazo de validade, embalagem, rotulagem e excipientes (DIAS, 2006).

Os medicamentos similares, entretanto, nunca foram obrigados a comprovar equivalência farmacêutica com o inovador. Hoje há no mercado dois tipos de similares: os similares com marca, que têm um nome de fantasia e os similares sem marca, que desde 4 de outubro de 2001 não podem utilizar mais a nomenclatura genérica, passando a ser identificados pelo nome de marca/fantasia. Em 1983, tornou-se obrigatória a impressão, além da marca comercial (nome de fantasia ou marca registrada), também do nome genérico da substância ativa nas embalagens dos medicamentos, conforme determinado na Denominação Comum Brasileira (DCB).

Para construir e orientar uma política de genéricos, a Organização Mundial da Saúde propõe em seu *Glossário de Termos Especializados para Avaliação de Medicamentos* (1990) que um genérico só deve ser autorizado para comercialização quando a sua segurança, eficácia e qualidade tenham sido estabelecidas e documentadas, usando como referência o produto inovador. Isto visando alcançar maior racionalidade na utilização de medicamentos, estimulando a concorrência (ANVISA, 2009).

Em 1991, começou a tramitar na Câmara dos Deputados, em Brasília, o Projeto de Lei n° 2002 que visava abolir as marcas comerciais das embalagens de medicamentos. Tal

projeto deu origem ao Decreto 793, de 05 de abril de 1993, que determinavam o uso da denominação genérica do fármaco (nome genérico) nas embalagens, em tamanho três vezes maior que o da marca do medicamento. As diretrizes desse decreto não foram implantadas integralmente por problemas técnicos e por falta de vontade política (ANVISA, 2009).

Com a sanção, em 1996, da Lei de Patentes, voltou-se à situação anterior a 1971: medicamentos patenteados no exterior e cuja patente ainda não havia vencido não podem ser copiados, devendo esperar o prazo de vencimento da patente, que é de 20 anos. Em 1999, com a Lei 9.787, conhecida como Lei dos Genéricos (iniciativa do deputado federal Eduardo Jorge - PT/SP), foi instituída a Política de Medicamentos Genéricos, traçando diretrizes, normas e critérios para sua implantação, revogando o Decreto 793/93. A política de Genéricos no Brasil é traçada pelo documento *Diretrizes para uma Política de Medicamentos Genéricos* (ANVISA, 2009).

Com o Decreto 3.675, de 28 de novembro de 2000, foram definidos critérios para concessão de registro especial (com prazo de validade de um ano) para medicamentos genéricos importados e que tenham registro concedido pelas seguintes autoridades sanitárias: Administração Federal de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos da América; Saúde Canadá - Direção de Produtos Farmacêuticos do Canadá e Agência Européia de Avaliação de Produtos Medicinais da Comunidade Européia, objetivando incrementar a política de medicamentos genéricos no país (ANVISA, 2009).

Foram usadas estratégias diferentes na implantação da política dos genéricos em diversos países como, redução de preços, propagandas em mídia etc. Mas a que se mostrou mais eficaz foi a de conscientização dos médicos da qualidade e eficácia dos genéricos, promovendo mudança de comportamento dos mesmos na prescrição de medicamentos (ANVISA, 2009).

No Brasil, só no fim da década de 90 é que segue a lei que regulamenta a política dos genéricos. Esta foi seguida de resoluções posteriores para melhoria da execução de tal lei. Ela tem como objetivo a implementação de um conjunto de diretrizes e ações conseqüentes, articuladas à política nacional de medicamentos, orientadas para promover a disponibilização do medicamento genérico no mercado brasileiro e o acesso para utilização por todas as camadas da população, promovendo-se o seu registro, a sua prescrição e a sua dispensação nos serviços de assistência farmacêutica governamentais e privados. Exige-se para tal, que os medicamentos genéricos, tanto quanto os medicamentos de marca, inovadores e/ou similares, tenham segurança, eficácia e qualidade, devidamente documentadas e reconhecidas pela autoridade sanitária nacional (DIAS, 2006).

Segue-se um breve resumo dessas leis:

1993: Ministro Jamil Haddad, governo Itamar Franco – Decreto 793/93 – adoção da denominação genérica nas embalagens, rótulos, bulas e no material de divulgação médica de medicamentos (ANVISA, 2009)

1999: Lei 9787 – regulamentação das bases legais para os medicamentos genéricos e atribuições de poderes da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) para regulamentação das condições de registro e controle de qualidade. Até então, não existia genéricos no país, só medicamentos de marca e similares, utilizando denominação genérica (ANVISA, 2009).

20/01/2000: Resolução 349 – disposição sobre dispensação de medicamentos genéricos – intercambialidade/substituição do genérico (STORPIRTIS, 2001).

28/04/2000: Resolução 41 – Cadastramento para habilitação de realização de ensaios de biodisponibilidade e bioequivalência (STORPIRTIS, 2001).

15/05/2000: Resolução RDC 45 – estabelecimento da obrigatoriedade das farmácias, drogarias e estabelecimentos que comercializam medicamentos fixarem a relação de medicamentos genéricos, atualizada (STORPIRTIS, 2001).

17/08/2000: Resolução RDC 78 – obrigatoriedade das empresas em apresentarem, mensalmente, relatório de produção e comercialização de genéricos (ANVISA, 2009).

02/01/2001: Resolução RDC 10 – assegura a qualidade de medicamentos genéricos. Revoga resolução 391, de 1999 (STORPIRTIS, 2001).

Em relação às embalagens de medicamentos houve modificações. Os medicamentos referência devem conter a denominação genérica em sua embalagem. Os medicamentos genéricos devem apresentar apenas o nome do princípio ativo; possuir a frase “medicamento genérico – Lei 9.787/99; e conter uma tarja amarela com um G e os dizeres “Medicamento Genérico” em suas embalagens (STORPIRTIS, 2001).

Para se iniciar a produção de um medicamento genérico é necessário que a patente do fármaco referência tenha expirado. Essa proteção por patente dura de 15 a 20 anos.

As principais vantagens da Política de Genéricos foram:

Revisão dos requisitos de qualidade, segurança e eficácia;

Monitoramento do cumprimento das boas práticas de fabricação na indústria farmacêutica e controle regular da qualidade de medicamentos;

Regulamentação das Boas Práticas de Armazenamento e Transporte em toda a cadeia de distribuição (logística);

Adoção obrigatória da DCB, ou complementarmente das DCI, exigíveis nas bulas, rótulos e materiais promocionais;

Implementação dos regulamentos sobre os estudos clínicos, de conformidade com o estabelecido pela Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde;

Regulamentação de normas/procedimentos exigíveis para o registro de genéricos, inclusive importados em qualquer estágio de produção;

Regulamentação da *Prescrição e Dispensação* de Genéricos nos serviços de Assistência Farmacêutica governamentais e privados – respeitada a decisão de não intercambialidade do prescritor.

A política de Medicamentos Genéricos, ao ser definitivamente implementada, com seriedade e rigoroso controle de qualidade, gera muitas vantagens como:

Medicamentos de melhor qualidade, mais seguros e eficazes, comprovados pela realização de testes de equivalência farmacêutica e bioequivalência;

Medicamentos de menor preço, pois fabricantes copiam um determinado medicamento – não necessitam fazer investimentos em pesquisas para o desenvolvimento – visto que as formulações já estão definidas pelos medicamentos de referência e que servirão de parâmetro para a fabricação;

Com a entrada dos genéricos houve redução nos preços dos medicamentos de referência, principalmente por causa da concorrência;

Possibilidade de maior acesso aos medicamentos, desde que a política de genéricos priorize os medicamentos essenciais, mais utilizados pela população;

Fortalecimento da indústria nacional, com desenvolvimento tecnológico e mais empregos para o país;

Mudança de comportamento dos profissionais de saúde (prescritores e dispensadores).

1.3. Ensaio clínico de Medicamentos no Brasil

Até meados do século XIII a terapêutica era realizada sem qualquer embasamento científico, era na maioria dos casos ineficiente. Nesta época ainda não havia conhecimento sobre farmacologia, fisiologia, bioquímica e fisiologia, o que levou o escritor inglês Richard Gordon a afirmar: "A história da medicina foi, em grande parte, até os fins do século passado, a substituição da ignorância por mentira" (MORAES e MORAES, 2000).

No século XIX um cientista francês chamado Claude Bernard formalizou os critérios para reunir informações baseadas na experimentação, tratando, a partir daí, a medicina como ciência; apesar de ainda haver muitas falhas como, por exemplo, o efeito terapêutico de um medicamento era baseado nos costumes de um povo ou relato individual do médico. Essa falha na segurança, eficácia do medicamento é devido a inexistência, até então, de uma ciência chamada farmacologia clínica, a qual se refere-se a investigação de fármacos em seres humanos, que só foi introduzido no meio científico em 1952, apesar de estudos com pesquisas clínica controladas terem sido iniciada por Harry Gold em 1930 (LEITÃO, 2001).

Em 1977, o FDA publica as primeiras diretrizes para pesquisa clínicas com objetivo de garantir qualidade dos dados e proteger os participantes das mesmas. Entre 1977 e 1981, novas diretrizes sobre boas práticas clínicas são publicadas. Em 1988, uma consolidação de um código de boas práticas (GCP) é publicada pelo FDA (ANVISA, 2002).

No Brasil, a implantação de normas definindo a pesquisa em seres humanos deu-se com a resolução n° 01/88, através de iniciativa do professor Elisaldo Carlini. Em outubro de 1996, esta foi revogada pela resolução n° 196/MS/CNS, sendo posteriormente complementada pela resolução n° 251/97. Por meio desta resolução, o ministério da saúde define diretrizes e normas objetivando promover a proteção de sujeito de pesquisas envolvendo seres humanos (ANAVISA, 2002).

A resolução 196/96, baseada nos quatro referenciais básicos da bioética, autonomia, não maleficência, beneficência e justiça, trazem algumas regras à comunidade científica, bem como à sociedade brasileira. Esta resolução estabelece que todas as pesquisas desenvolvidas com seres humanos devem ser submetidas à apreciação de comitê de ética em pesquisa (CEP), credenciado pela comissão nacional de ética em pesquisa (CONEP). A resolução também preconiza que todas as instituições que realizem pesquisas implantem um CEP, a fim de se promover em toda a rede o desenvolvimento científico e tecnológico fundamentados nos princípios de ética e do respeito à cidadania (ANVISA, 2002).

Atualmente, a Farmacologia Clínica desenvolve principalmente duas atividades: estudos farmacocinéticos e elaboração, execução e análise de ensaios clínicos para verificar a segurança, qualidade e eficácia dos medicamentos em seres humanos (MORAES e MORAES, 2000).

A realização de estudos de biodisponibilidade e bioequivalência, de forma rotineira, no Brasil, pode ser creditada à lei de genéricos n° 9787/99. O pioneirismo coube ao Dr. Gilberto de Nucci, na última década, através da implementação da Unidade de Farmacologia Clínica Miguel Servet (Unicamp-SP), possibilitou uma estreita colaboração com outros centros de pesquisa, que resultou na criação da Unidade de Farmacologia Clínica da Universidade São Francisco, em Bragança Paulista, sob a coordenação do professor José Pedrazzoli, em 1992, da Unidade de Farmacologia Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (Unifac), coordenada pela professora Elisabete Moraes (MORAES e MORAES, 2000).

A confiabilidade dos resultados dos estudos de bioequivalência está na dependência direta dos estudos analíticos. A introdução dos genéricos no arsenal terapêutico nacional veio acompanhada do controle de qualidade desses medicamentos, através de testes de equivalência farmacêutica e bioequivalência.

Vale ressaltar que o parâmetro utilizado para a comparação dos medicamentos, está relacionado à absorção, por tanto não se aplica ao fármaco administrado, por via

intravascular. A absorção é a transferência do fármaco do local de administração para a corrente sanguínea. Assim, por definição, um fármaco administrado por via intravenosa é 100% biodisponível, isto é, toda dose do fármaco é administrada na corrente sanguínea devendo estar disponível para interagir com os receptores e desencadear o efeito farmacêutico (PITTA, 2004).

Existem diversas formas farmacêuticas através das quais podemos realizar este tipo de estudo:

Suspensão – Forma farmacêutica onde um sólido finamente dividido está disperso em um meio líquido que não é um solvente do fármaco.

Cápsula – Invólucro de gelatina que contém o fármaco. Após a ingestão, a gelatina é digerida e o fármaco, e o pó menos compacto do que em comprimidos, é liberado dispersa-se com facilidade e tendo boa biodisponibilidade.

Comprimido – Forma sólida comprimida sob alta pressão. A biodisponibilidade desta forma farmacêutica é muito afetada pelos excipientes presentes.

Comprimido recoberto – Comprimido contendo uma cobertura de açúcar, polímeros ou uma cobertura entérica. A cobertura tem como função proteger o fármaco do ambiente, mascarar odor ou sabor, melhorar a aparência ou controlar a liberação do fármaco.

Para alguns medicamentos, a intercambialidade pode ser assegurada pela implementação das Boas Práticas de Fabricação. Para determinadas classes de produtos biológicos, como vacinas, soros, produtos derivados do plasma e do sangue humano, e produtos obtidos por biotecnologia, a intercambialidade depende também de outras considerações, requerendo muitas vezes estudos clínicos que lhe comprovem a eficácia terapêutica (PITTA, 2004).

Os medicamentos que se enquadram nas situações abaixo estão isentos de testes de bioequivalência tendo, por isso, seu registro aprovado mais rapidamente (PITTA, 2004):

1. medicamentos cujos fármacos apresentem alta solubilidade e permeabilidade;
2. biodisponibilidade absoluta (F) superior a 90% e dissolução, a partir da forma farmacêutica, maior que 85% em até 15 min;
3. formulações parenterais sob forma de soluções aquosas;
4. solução de uso oral (sem excipientes que afetem a mortalidade ou absorção);
5. pós para reconstituição;
6. soluções aquosas oftálmicas, produtos tópicos e otológicos;
7. medicamentos para uso tópico não-sistêmico;
8. produtos para inalação e *sprays* nasais;
9. medicamentos de uso oral com fármacos não-absorvíveis;
10. produtos biológicos ou oriundos de biotecnologia.

1.3.1. Biodisponibilidade e Bioequivalência

Os testes de equivalência são de extrema importância, pois através deles assegura-se que o medicamento pesquisado apresentara eficazmente o efeito esperado, após ter passado pelas etapas que antecedem a etapa terapêutica, as quais sejam farmacêutica, farmacocinética e farmacodinâmica.

O primeiro teste de bioequivalência farmacêutica realizada no Brasil foi em 1989 e até então esse tipo de estudo era desconhecido no país. Sabia-se apenas da experiência internacional, enquanto que o Brasil era palco para o mercado de centenas de medicamentos similares e com Denominação Comum Brasileira (DCB), supostamente cópias fiéis dos originais que os inspiravam, mas sem apresentarem a comprovação necessária de qualidade, eficácia e segurança (LEITÃO, 2001).

Após 12 anos dos primeiros estudos de bioequivalência pode-se observar um grande avanço nesta área, pois no princípio trabalhava-se com estrutura precária e com enorme ceticismo da comunidade científica. Atualmente o Brasil conta com tecnologia de ponta, estrutura física adequada e corpo científico qualificado, o que contribui para a credibilidade com que se faz jus desta nova área de pesquisa, a farmacologia clínica. Diante de tantas mudanças pode-se afirmar que o objetivo foi mantido; verificar se duas ou mais formulações farmacêuticas podem ser intercambiáveis, termo muito popular na atualidade frente a política de medicamentos genéricos (LEITÃO, 2001).

Como tudo que é novo, inédito no país, a comunidade científica demonstrou um sentimento de rejeição, mesmo sendo ainda um assunto desconhecido. No início da década de 90, os meios de comunicação desencadearam forte campanha contra o recrutamento de voluntários sadios para testar drogas cuja toxicidade já havia sido exaustivamente demonstrada. Com um pouco de conhecimento a polêmica foi intensamente discutida por órgãos federais, com o conselho federal de medicina e conselho nacional de saúde e foi então elaborada uma regulamentação, baseada na declaração de Helsinque, e publicada a Resolução CNS n° 196/96, que disciplina as condições e critérios para participação de seres humanos em pesquisas (MORAES e MORAES, 2000).

O termo biodisponibilidade é, na verdade, uma contração de disponibilidade biológica. Considera-se biodisponibilidade como sendo a taxa e a extensão na qual uma molécula ativa é absorvida e torna-se disponível no sítio de ação da droga. Considerando-se que a quantidade do fármaco contida no fluido biológico está em equilíbrio com o sítio de ação, a biodisponibilidade é determinada através da medida da concentração do princípio ativo do fármaco em sangue total, soro ou outro fluido biológico apropriado, em função do tempo (ANVISA, 2002).

A RE n° 478 de março de 2002 estabelece três medidas fundamentais para à determinação da bioequivalência entre medicamentos.

Os principais parâmetros farmacocinéticos (são mostrados na Figura 2 abaixo) utilizados para a avaliação da biodisponibilidade são:

- O pico de concentração máxima observada (C_{max}) - o pico da curva concentração-tempo indica a concentração máxima do fármaco, observado na matriz biológica depois de uma dose. C_{max} é a medida que representa a maior concentração do fármaco observado e é diretamente proporcional ao montante total de droga absorvido pelo organismo. Para as formas farmacêuticas convencionais como comprimidos ou cápsulas, o C_{max} , normalmente ocorre em apenas um ponto no tempo, denominado de T_{max} . A quantidade de fármaco geralmente é expressa em termos de sua concentração relativa a um volume específico de sangue, soro e plasma.

- O tempo no qual essa concentração foi alcançada (T_{max}) - esse parâmetro reflete a velocidade de absorção do fármaco de uma determinada forma farmacêutica. E a sua velocidade de absorção que determina o tempo necessário para que a concentração máxima efetiva seja atingida e, assim, tenha início o efeito farmacêutico desejado. A velocidade de absorção também influencia o tempo em que o fármaco entra na corrente sanguínea.

- A área sob a curva de concentração versus tempo (ASC_{0-t}) - é utilizada na mensuração da quantidade total do princípio ativo inalterado que atinge a circulação sistêmica, proporcional à quantidade de fármaco administrado (relação linear ou não linear). É calculado pela integração da área sob a curva da concentração plasmática em relação ao tempo desde a administração do fármaco até a última coleta sanguínea.

Essas medidas são obtidas das curvas de concentração sanguínea versus tempo, construídas no estudo.

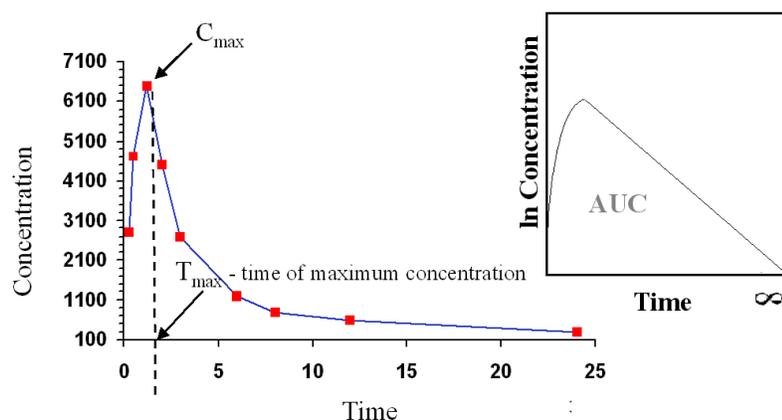


Figura 2. Parâmetros farmacocinéticos avaliados na BE: ASC_{0-t} , T_{max} , C_{max}

As normas que regem a vigilância no país permitem assegurar ao medicamento genérico sua intercambialidade com o medicamento referência ou inovador. Ou seja, através

de estudos *in vitro* (equivalência farmacêutica) e estudos *in vivo* em voluntários sadios (bioequivalência) verifica-se a qualidade, eficiência e segurança do medicamento teste em relação ao medicamento referência (ANVISA, 2009).

Bioequivalência é o estudo de biodisponibilidade comparativa entre dois ou mais medicamentos administrados em uma mesma via extravascular. Avalia os parâmetros relacionados à absorção do fármaco, a partir da forma farmacêutica administrada, contendo a mesma dosagem e o mesmo desenho experimental. Dois produtos são considerados bioequivalentes se suas biodisponibilidades (velocidade e extensão da absorção) são semelhantes, após administração na mesma dosagem (ANVISA, 2009).

De acordo com a Administração Federal de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (FDA-USA), 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 velocidade de absorção (LEITÃO, 2001).

Para tais avaliações de biodisponibilidade e bioequivalência são necessárias técnicas analíticas avançadas para obter-se alta sensibilidade e reprodutibilidade na determinação de concentração em fluidos biológicos (principalmente plasma).

Para que os medicamentos genéricos possam ser comercializados, as indústrias farmacêuticas precisam comprovar que o medicamento genérico que irá ser lançado no mercado tenha o mesmo princípio ativo e a mesma eficácia (biodisponibilidade) que um medicamento referência. Para isso é necessário um teste de bioequivalência farmacêutica. Este teste de bioequivalência deve ser realizado em um laboratório credenciado pela ANVISA e o método analítico utilizado deve ter sua eficiência comprovada através de um processo de validação.

1.4. Técnicas usadas para validação de métodos bioanalíticos utilizados em estudos de Bioequivalência

As duas técnicas que são mais utilizadas em testes analíticos de bioequivalência, são a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção de Ultravioleta-Visível e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM).

1.4.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Entre os métodos modernos de análise, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido a sua eficiência para efetuar a separação, a identificação e a quantificação das espécies químicas, isoladamente ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como por exemplo a espectrometria de massas. (Lough e Wainer, 1995)

A cromatografia é um processo de separação de compostos de uma mistura através

de duas fases imiscíveis, uma delas deslocando-se em relação à outra que permanece estacionária. A separação cromatográfica se efetua através da migração diferencial dos componentes da mistura no sistema bifásico. A primeira fase (em movimento) é denominada de fase móvel e a segunda (estacionária) de fase fixa ou estacionária. (Akisue et. al, 1983).

A separação cromatográfica baseia-se na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido às diferenças entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária, e no alargamento de bandas, que é dependente de processos físicos e não de equilíbrio. Estas interações podem ser realizadas por meio de interações do tipo pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas ou forças de Van der Waals, entre outras. (ANVISA, 2002).

A migração diferencial resulta da diferença de equilíbrio dos analitos entre as duas fases imiscíveis e é determinada pelos fatores que afetam este equilíbrio como composição da fase móvel, composição da fase estacionária e temperatura da separação. Mudanças em qualquer um destes fatores levam a alterações na migração diferencial. (ANVISA, 2002)

A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação. (Lough e Wainer, 1995)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) surgiu como a aplicação de cromatografia líquida às teorias e instrumentação desenvolvidas originalmente para cromatografia gasosa. (Lough e Wainer, 1995)

A CLAE usa pressões elevadas para forçar a passagem do solvente através de colunas fechadas que contém partículas microporosas com grande pureza e formato esférico, que são permeáveis ao solvente e têm uma área superficial de várias centenas de metros quadrados por grama. As análises são mais rápidas e a eficiência é muito mais elevada quando comparada à cromatografia líquida clássica. Além disso, o formato instrumental permite o uso de detectores, tais como ultravioleta, índice de refração, espectrometria de massas, fluorescência, condutividade, eletroquímicos, ressonância magnética nuclear, infravermelho com transformada de Fourier e evaporativo espalhamento de luz. (BASTOS, 2008)

1.4.2. Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM/EM)

O método analítico aplicado a testes de bioequivalência, na mensuração da concentração de diferentes fármacos em matrizes biológicas deve ser exato, preciso e específico. Não há um consenso quanto ao melhor método, porém, o formado pelo CLAE acoplado a espectrometria de massas (Na Figura 3 (a) e (b) podemos ver os equipamentos de CLAE e espectrômetro de massas), mostra-se de grande valor na análise de fármacos e seus metabólitos, substâncias endógenas polares e macromoléculas.

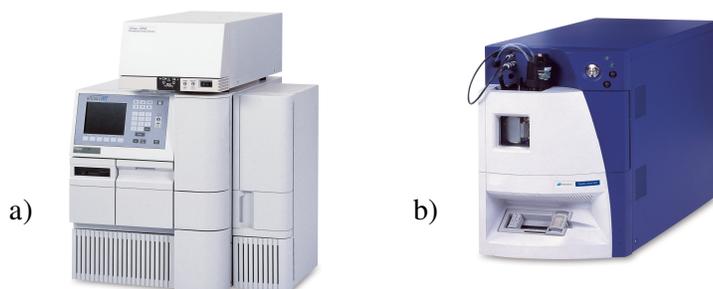


Figura 3. (a) Equipamento de HPLC e (b) Espectrômetro de massas

A CLAE é um método de separação química, normalmente utilizada para análise de bioequivalência, servindo como purificador inicial do fluido biológico avaliado e como introdutor as diferentes substâncias separadas para o dispositivo de análise que, neste caso, é o espectrômetro de massas, que alia o poder de separação da CLAE a especificidade e sensibilidade da espectrometria de massas como detector (HOFFMENN, 1996).

A espectrometria de massas (MS, “Mass Spectrometry”) é nos dias de hoje, reconhecidamente uma das técnicas instrumentais mais úteis e poderosas em investigação científica e com ampla aplicação em várias áreas das ciências biológicas, biomédicas e naturais (química e física) (MEURER, 2003).

As amostras biológicas são previamente tratadas antes de serem injetadas no HPLC (cromatógrafo), por precipitação de proteínas do soro ou plasma, extração líquido-líquido e líquido-sólido. O acoplamento entre a cromatografia líquida e a espectrômetro de massas, que poderia ser um problema, foi resolvido com aperfeiçoamento do *electrospray*, pois o espectrômetro requer íons em fase gasosa e as substâncias normalmente analisadas pelo CLAE são compostos não voláteis (HOFFMENN, 1996).

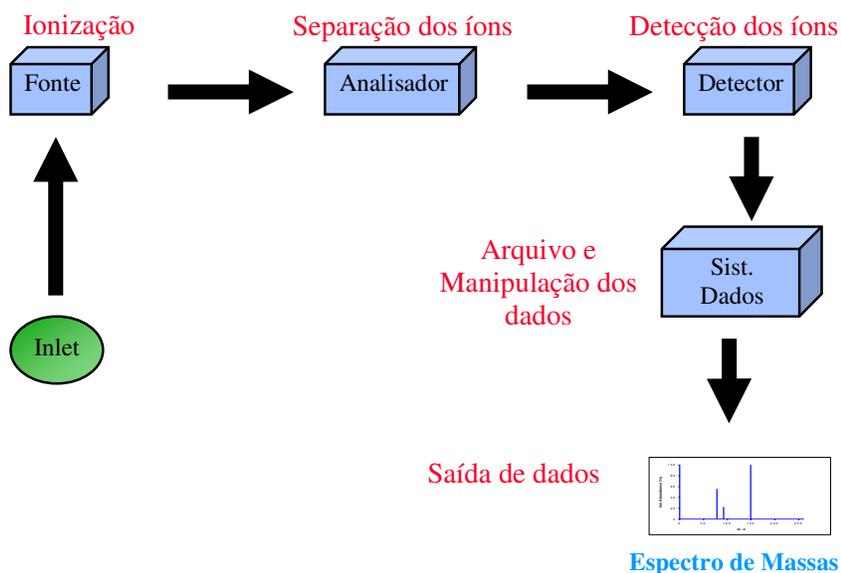


Figura 4. Componentes do Espectrômetro de Massas.

1.4.3. Ionização por *Electrospray* (ESI)

A ionização por eletrospray (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 (SAWAYA, 2006).

Os primeiros experimentos de *electrospray* (ESI) foram conduzidos pelo físico John Zeleny em 1917 e a primeira descrição é datada de 1968 por Malcolm Dole, mas os avanços mais importantes da ionização por *electrospray* vieram em 1988 no simpósio em São Francisco, nos Estados Unidos, quando John Fenn apresentou a identificação de polipeptídeos e proteínas de massas moleculares de até 40 kDa em massa (MEURER, 2003).

Os trabalhos de ESI de Fenn começaram em 1984 quando *electrospray* e espectrômetro de Massas foram acoplados pela primeira vez. O processo de ESI apresenta um variado número de parâmetro químicos e físicos que determinam juntos o sucesso do processo. O sistema ESI-MS pode ser definido por um circuito elétrico que dirige os íons formados em solução para a fase gasosa (MEURER, 2003).

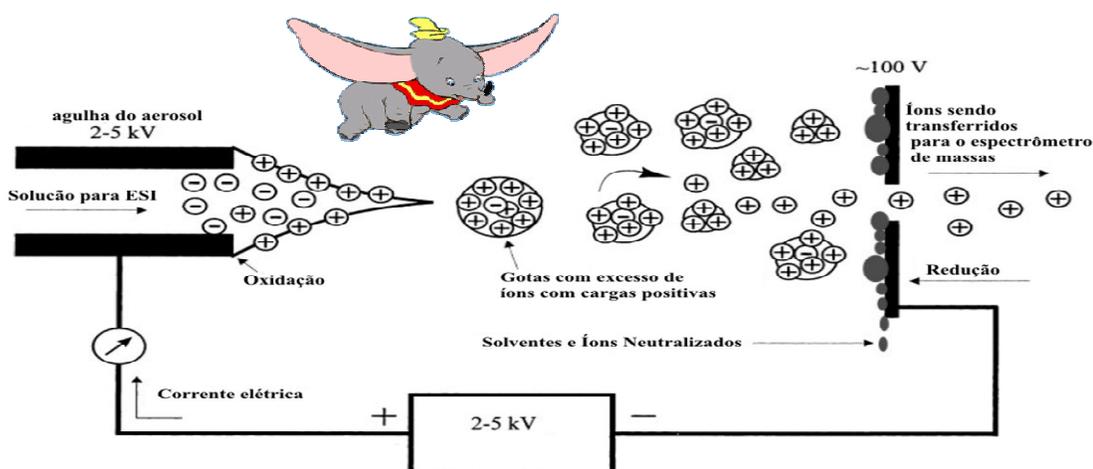


Figura 5. Ionização *Electrospray* (ESI): Transferência de íons da solução para a fase gasosa.

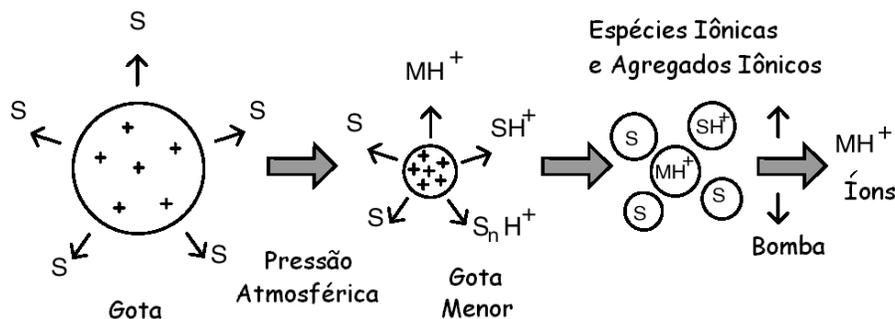


Figura 6. Processos de ionização: Fissão Coulombica (Coulombic Fission) e Evaporação Iônica (Ionic Evaporation).

ESI é conhecido como um método de ionização suave servindo de maneira elegante no estudo de compostos com interações não covalentes fracas, como por exemplo, interações proteína-proteína, enzima-substrato ou interações entre ligantes e metais em complexos inorgânicos (MEURER, 20003).

A fase móvel é borrifada após deixar o capilar, na extremidade do qual existe uma diferença de potencial de vários quilovolts. A natureza da fase móvel, a velocidade do fluxo e a diferença de potencial são parâmetros que influenciam no tamanho das gotículas, bem como a carga de cada uma delas (HOFFMENN, 1006). As gotículas vão contra um fluxo de

nitrogênio (Ver Figura 5), que as faz diminuir de tamanho por evaporação do solvente, restando várias moléculas do analito, que carregadas eletricamente (Ver Figura 6), vão se separando até praticamente sobraem somente íons isolados, cuja carga dependerá do número de sítios de ionização de cada *molécula* em questão ou agregados eletricamente carregadas (HOFFMENN, 1996).

Os analisadores dos espectrômetros de massas separam as espécies carregadas eletricamente, de acordo com a relação massa/carga (m/z) de cada uma, a partir do que determinará a abundância e massa de cada espécie iônica. Um dos quatro tipos mais comuns de analisadores é o quadropolo visto na Figura 7. Este formado por quatro hastes dispostas de tal forma que configuram um quadrado, pelo centro da qual passam as espécies carregadas eletricamente. Assim, todos os íons formados no *electrospray* entram no primeiro quadropolo do espectrômetro, onde será separada, por corrente elétrica e rádio frequência, apenas a molécula com a relação massa/carga desejada. No quadropolo seguinte do espectrômetro, o íon colide com um gás, inerte (argônio) e produz fragmentos também carregados. Estes são denominados íons produto e são característicos para cada substância. Os íons produto são separados no terceiro quadropolo do espectrômetro, para serem analisados e quantificados no detector. Para cada potencial elétrico, íons de determinada relação m/z são selecionados, pois só eles atravessarão o quadropolo, atingindo o detector eletrônico no final do aparelho. Todos os demais são refletidos e perdidos nas laterais do aparelho (USP convention, 1995).

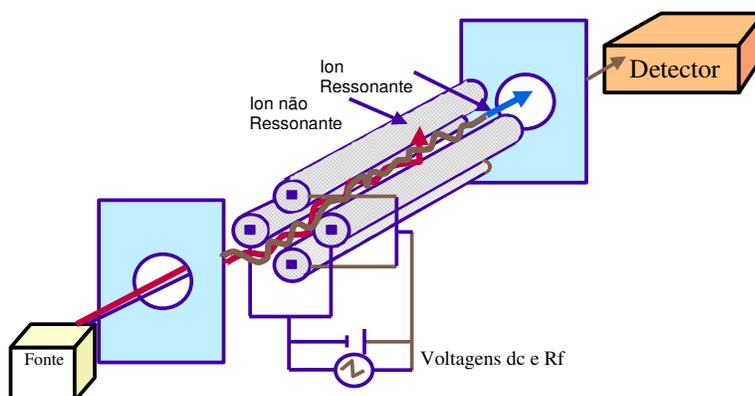


Figura 7. Analisador de Massas Quadropolar

Esta técnica CLAE-MS/MS analítica tem a característica de ser altamente seletivo. Quando se tem uma mistura de substâncias eluídas advindas do cromatógrafo, o primeiro quadropolo ira separar somente a molécula de m/z desejada, porém, se hove nesta mistura

um composto com a mesma m/z a colisão que ocorre no segundo quadrupolo, formará fragmentos diferentes, que serão definitivamente separados no terceiro, restando assim somente o íon desejado para ser analisado no detector (SAWAYA, 2006).

O processo analítico citado acima inicia-se com a infusão da mistura em análise no sistema, pelo eletrospray, sem a operação do segundo e terceiro quadrupolo (modo scan), gerando espectros de massa totais que registram todas as moléculas. Ajustes são feitos para que o sinal da molécula em estudo seja máximo (energia de cone e colisão). Após os ajustes, o gás de colisão é ligado e espectros de massas por “Collision-Induced Dissociation – (C.I.D)” são registrados (modo produto). Novos ajustes são realizados posteriormente para que o sinal do íon produto selecionado seja máximo, principalmente pela energia de colisão (HOFFMENN, 1996).

Há muitas aplicações para a espectrometria de massas na área farmacêutica, seja para obter informações qualitativas do fármaco, identificar impurezas e contaminantes ou características estruturais de determinada molécula, bem como realizam análises quantitativas de determinadas substâncias em matrizes biológicas. Este método é muito favorecido quando se usa concomitantemente um dispositivo cromatográfico (USP convention, 1995).

Nos últimos anos, a espectrometria de massas com ionização por “*electrospray*” tem se difundido nas mais diversas áreas da ciência. A importância desta técnica reflete-se no número crescente de artigos publicados que a utilizam, mostrada na Figura 8, seja para simples determinação do peso molecular e/ou quantificação de uma substância, ou mesmo em estudo de determinação estrutural (ANVISA, 2003).

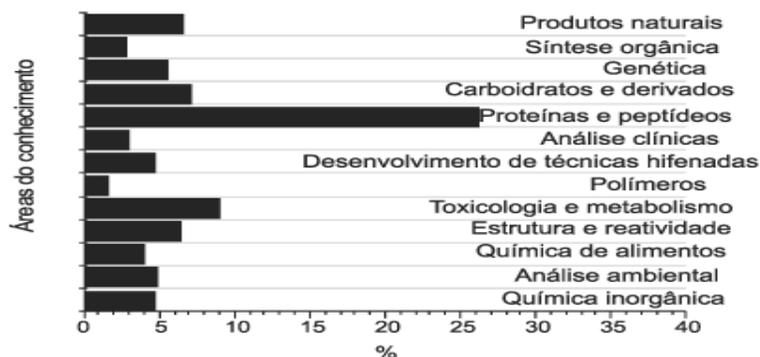


Figura 8. Utilização da espectrometria de massas em diferentes áreas do conhecimento (CROTTI, 2006).

3.6. Métodos Analíticos para determinação da Flunarizina

A quantificação de fármacos em matrizes biológicas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada espectrometria de massas seqüencial (CLAE-EM/EM) tornou-se a principal técnica para análise de fármacos em plasma, tendo como vantagens uma maior sensibilidade e seletividade (VITA et al., 2005).

Outras técnicas foram previamente utilizadas para determinação de Flunarizina em uma variedade de matrizes. Estes métodos incluem Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) (FLOR, 1983) e Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de massas (LIN et al., 2005).

Algumas destas técnicas não foram utilizadas para determinação de Flunarizina em matrizes biológicas, enquanto outras apresentaram altos limites de quantificação ou são muito complexas o que limitam sua aplicação a grandes quantidades de amostras. Já existe métodos na literatura para determinação de Flunarizina em plasma, só que com maior tempo de corrida de análise e baixa recuperação, fluxo de fase móvel maior, limite de quantificação semelhante, com método extração mais demorado e com maior custo (LIN et al, 2005).

Este trabalho descreve um método por Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à Espectrometria de Massas, com ionização por *Electrospray* para quantificação de Flunarizina em amostras biológicas.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar uma metodologia para quantificação do fármaco Flunarizina em plasma humano, utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CLAE-MS/MS), com aplicabilidade em farmacocinética e bioequivalência farmacêutica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Foram utilizados os seguintes materiais:

Pipetas de volume variável da marca Gilson;

Ponteiras de pipeta descartáveis da marca Axygen;

Acetonitrila para preparo de fase móvel, soluções padrão de Flunarizina e Cinarizina e extração das amostras;

Solução de cloreto de sódio para extração das amostras;

Hexano para extração das amostras;

Acetato de etila para extração;

Acetato de amônio, para preparo de fase móvel;

Água Milli-Q preparo fase móvel;

3.1.2. Padrões

Para a realização dos testes foram utilizados padrões de referência com procedência identificável para o preparo das soluções. A origem e o número do lote estão descritos abaixo:

Padrões de Referência com Certificados utilizados na Validação foram:

Flunarizina padrão de referência SIMS - lote 25176, como analito;

Cinarizina padrão de referência P.E – 1b, como padrão interno.

3.2 Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos:

Espectrômetro de massas triploquadrupolo MS/MS da VARIAN;

Gerador de nitrogênio da Dominick Hunter modelo UHPLCMS 12;

Bomba analítica ps 210/ Varian;

Auto-injetor os410/Varian;

Programa Varian ws 6.5;

Mesa agitadora (Finemixer) da marca FINE PCR;

Misturador (Vortex) da marca PHOENIX;

Balança analítica precisa 40sm-200^a.

3.2.1 ESPECTROMETRO QUADRUPOLO

3.2.1.1. Triploquadrupolo

Este equipamento é constituído por três quadrupolos em série, sendo que o segundo quadrupolo não é utilizado para separar íons de mesma massa/carga (m/z), mas sim como

cela de colisão, no qual ocorre a fragmentação do íon selecionado no primeiro quadrupolo geralmente por dissociação induzida por colisão com gás inerte, é também empregada como direcionador dos íons produzidos ao terceiro quadrupolo.

Na dissociação induzida por colisão, o íon precursor proveniente do primeiro quadrupolo é acelerado por potencial elétrico para uma região de alto vácuo no interior do segundo quadrupolo, onde sofre repetidas colisões com gás inerte de elevada energia (geralmente Ar, He ou N₂), o que levam geralmente a um aumento na energia potencial deste íon até ocasionar sua fragmentação, induzindo à formação de íons produto (CHIARADIA et al, 2008).

A técnica de MS/MS é comumente aplicada em sistema triploquadrupolo, mostrado na Figuras 9 e 10, o que lhe confere alta seletividade, um íon previamente zerado no primeiro quadrupolo (Q1) é fragmentado no segundo quadrupolo (Q2), através da aplicação de uma rádio-frequência e da colisão com o gás inerte. Os fragmentos gerados no Q2, do íon selecionado no Q1, são separados por suas razões massa/carga (m/z) no terceiro quadrupolo (Q3) e permitem monitorar o sinal composto (precursor – fragmento) a ser quantificado.

Todos os quadrupolos são controlados para transmitir íons de uma única razão m/z ou um intervalo de razão m/z para gerar informação analítica mais exata.

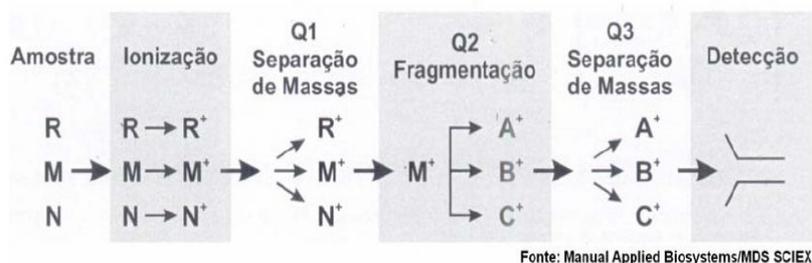


Figura 9. Esquema analítico de um espectrômetro de massas triploquadrupolo.

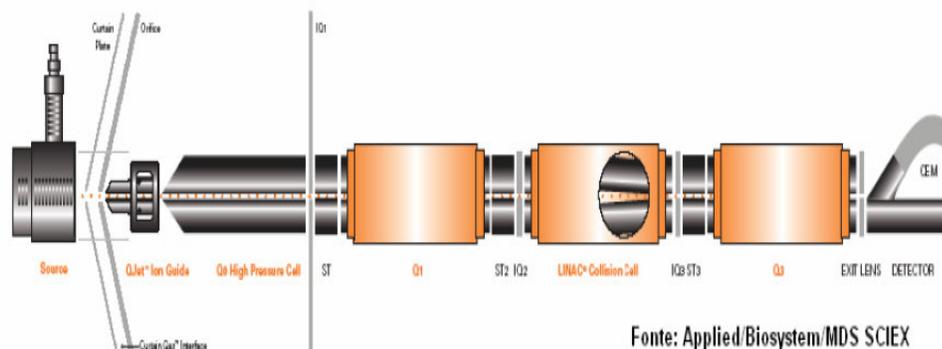


Figura 10. Esquema do interior de um de massas triploquadrupolo

3.2.1.2 A simbologia dos experimentos de espectrometria de massas seqüencial

Foi definida por COOKS e colaboradores, para descrever os diversos experimentos seqüenciais em MS de múltiplos estágios. Esta simbologia é descrita resumidamente na figura 11 abaixo. Na figura 11a, o círculo vazio representa um analisador de massas no modo varredura rf/DC que analisa assim as razões m/z dos íons que por ele transmitidos. O círculo cheio representa um analisador de massas selecionando um íon com uma determinada m/z e a seta representa o fluxo dos íons por uma câmara de colisão onde pode ocorrer, tanto ganho como perda de massas, decorrente de reação ou fragmentação. A figura 11b mostra a representação para os experimentos MS^2 , onde o quadrupolo Q1 está sendo utilizado na seleção e o Q3 ou Q5 está analisando os produtos formados na reação com uma molécula neutra (benzeno, por exemplo) em q2. Para experimentos MS^3 (Figura 11c), o quadrupolo Q1 seleciona o íon reagente formado na fonte, o quadrupolo Q3 seleciona o produto específico formado na reação com molécula neutra no quadrupolo q2, e o quadrupolo Q5 analisa os fragmentos ou produtos iônicos provenientes da dissociação (com argônio, por exemplo) ou reação em q4, respectivamente. (MEURER, 2003).

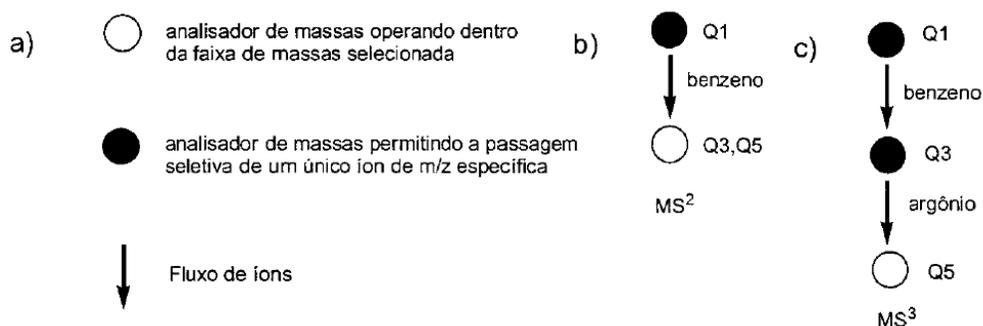


Figura 11: (a) Representação dos símbolos usados em um experimento (b) MS^2 e (c) MS^3

3.3. MÉTODOS

3.3.1. Preparo das Soluções Usadas

3.3.1.1 Soluções Padrão

Todas as soluções padrão preparadas foram transferidas para frascos de plástico rotulados, com batoque e tampa de rosca, armazenadas em geladeira a $+4^{\circ}C$ e substituídas de acordo com os prazos de validade pré-determinados.

3.3.1.2 Solução Padrão de Flunarizina

Uma massa correspondente a 6,05 mg de Dicloridrato de Flunarizina (99,44% de teor) foi cuidadosamente pesada, colocada em um balão volumétrico (50,0 mL) e a solução foi

então preparada em acetonitrila para a obtenção de uma solução de concentração 101,9 µg/mL de Flunarizina (base livre).

3.3.1.3 Solução Padrão Cinarizina

Uma massa correspondente a 5,29 mg de Cinarizina (100,0% de teor) foi cuidadosamente pesada, colocada em um balão volumétrico (50,0 mL) e preparada em Acetonitrila para a obtenção de uma solução de concentração de 105,8 µg/mL de Cinarizina. A partir desta solução foi feita uma diluição na concentração de 720,0 ng/mL.

3.3.2. Fase móvel usada no trabalho

A solução utilizada como fase móvel foi preparada de acordo com a necessidade e substituída diariamente.

3.3.2.1. Preparo da fase móvel Acetonitrila:Acetato de Amônio 10mmol L⁻¹ (9:1)

Em um béquer de 50 mL pesou-se 0,77 g de acetato de amônio, adicionou-se água para a solubilização do acetato de amônio e transferiu-se para um balão volumétrico de 200 mL e completou-se o volume. A solução foi transferida para um frasco de vidro (a), em um outro frasco (b) adicionou-se 800 mL de Acetonitrila, filtrou-se, os dois frascos foram colocados nas respectivas bombas do equipamento (a e b) onde o *software* fez a proporção (9:1).

3.4. Preparo dos padrões da curva de calibração e das amostras controle de qualidade

As concentrações dos padrões da curva de calibração e das amostras controles de qualidade foram definidas, de acordo com os procedimentos de rotina para a validação do método, em função da faixa prevista das concentrações das amostras a serem analisadas. Assim, estas concentrações correlacionam-se com a dose para qual o método foi desenvolvido, a utilização de outra dosagem pode levar a uma revisão destas concentrações, se a faixa prevista de concentrações da amostra não for a mesma.

3.4.1. Preparo dos padrões da curva de calibração

A curva de calibração é composta de uma amostra branca, isto é, a matriz biológica não dopada; uma amostra zero, isto é, isenta do analito, mas com o padrão interno; e sete pontos contendo concentrações conhecidas de Flunarizina e do padrão interno em concentração constante. Os dados referentes ao preparo da curva de calibração estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Preparo da curva de calibração para a Flunarizina

Amostra	Concentração no Plasma (ng/mL)	Volume Pipetado (mL)/ Concentração da Solução de Flunarizina Preparada em Plasma	Volume Final (mL)
Branco	-	-	-
Zero	-	-	-
Flunarizina	0,3	0,020 (150,0 ng/mL)	10,0
Flunarizina	1,5	0,100 (150,0 ng/mL)	10,0
Flunarizina	5,0	0,033 (1500,0 ng/mL)	10,0
Flunarizina	15,0	0,100 (1500,0 ng/mL)	10,0
Flunarizina	50,0	0,334 (1500,0 ng/mL)	10,0
Flunarizina	75,0	0,500 (1500,0 ng/mL)	10,0
Flunarizina	150,0	1,000 (1500,0 ng/mL)	10,0

Os padrões da curva de calibração foram fracionados e armazenados à -70°C até a sua utilização.

3.4.2. Preparo das amostras dos controles de qualidade

Para o preparo dos controles de qualidade, alíquotas de plasma humano foram preparadas com concentrações conhecidas de Flunarizina apresentados abaixo na Tabela 2, e os valores assumidos para estas amostras foram: CQB 0,9 ng/mL, CQM 60,0 ng/mL, CQA 120,0 ng/mL. Todos os controles de qualidade foram preparadas adicionando-se o analito a ser analisado ao plasma humano.

Tabela 2: Preparo dos controles de qualidade da Flunarizina

CQ	Concentração no Plasma (ng/mL)	Volume Pipetado (mL)/ Concentração da Solução de Flunarizina Preparada Em Plasma	Volume Final (mL)
CQB	0,9	0,060 (150,0 ng/mL)	10,0
CQM	60,0	0,400 (1500 ng/mL)	10,0
CQA	120,0	0,800 (1500 ng/mL)	10,0

Os controles foram preparados em quantidade suficiente para monitoramento contínuo da precisão e exatidão do método analítico em questão, e após o preparo, as amostras foram alíquotadas em tubos eppendorff e estocadas à -70°C até a sua utilização.

3.5. Montagem da seqüência de determinações das amostras

Cada lote de análise deve conter uma curva de calibração, com uma amostra branca, uma amostra zero e amostras contendo padrão do fármaco e padrão interno. As concentrações dos padrões da curva de calibração são checadas pelo cálculo de volta (*back-calculation*) e se estiver dentro das especificações, será utilizada para determinar a concentração do fármaco nas amostras. Caso esta não atenda essas especificações, um novo lote de amostras deverá ser construída. Os controles de qualidade (CQB, CQM, CQA), serão intercalados em intervalos, dependendo do número total de amostras a serem determinadas.

3.6.1. Princípios do Método

O fármaco Flunarizina e o seu padrão interno Cinarizina foram extraídos do plasma humano por meio de extração líquido-líquido utilizando Hexano/Acetato de Etila 1:1. Após a extração, as amostras foram secas sob fluxo de ar comprimido e ressuspensas em acetonitrila. Alíquotas foram analisadas por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas no modo MS/MS.

3.6.2. Extração das amostras

A extração das amostras do analito (Flunarizina) e do padrão interno (Cinarizina) das amostras biológicas, foram feitas da seguinte forma:

Em um tubo eppendorff colocou-se 300 µL de plasma humano, 50 µL de solução de Cloreto de Sódio saturado. Em seguida agitou-se por 1 minuto em mesa agitadora. Após agitar, adicionou-se 25 µL de solução de Cinarizina 720 ng/mL em Acetonitrila. Em seguida agitou-se por 1 minuto em mesa agitadora. Após agitar adicionou-se 1000 µL de Hexano/Acetato de Etila 1:1 e novamente agitou-se por 10 minutos em mesa agitadora.

Após a agitação de 10 minutos, foi feita a Centrifugação por 5 minutos, em 14000 rpm à temperatura de 22^o C. Uma alíquota de 800 µL da fase orgânica foi transferida para um eppendorff, em seguida foi evaporado o solvente sob fluxo de ar comprimido e depois o resíduo foi ressuspense em 600 µL de acetonitrila. Em seguida foi agitou-se por 5 minutos em mesa agitadora. Depois uma amostra foi transferida para *inserts* de vidro descartáveis e, em seguida, injetou-se uma alíquotas de 10,0 µL no sistema cromatográfico.

3.6.3. Condições cromatográficas

A separação cromatográfica foi realizada usando uma coluna analítica Polaris C₁₈ (5 µm, 50 x 20,0 mm), mantida a temperatura ambiente (~20°C).

O Cromatógrafo Líquido com um sistema de detecção por Espectrometria de Massas no modo MS/MS foi operado com um fluxo constante de 0,22 mL/min, e um volume de

injeção de 10,0 μL . O tempo total de análise para cada amostra foi de 2,50 minutos. A Flunarizina teve um tempo de retenção de 1,50 minutos, e a Cinarizina (padrão interno) com um tempo de retenção de 1,55 minutos.

3.6.4. Condições de detecção no Espectrômetro de Massas no modo MS/MS

O espectrômetro de massas foi operado no modo positivo, com fonte de ionização electrospray (ESI+). A temperatura do gás de secagem foi de 269,9°C com pressão de nitrogênio de 25,6 psi. A pressão de nitrogênio utilizado para nebulização foi de 52,7 psi. A voltagem na agulha e no capilar foram de 5000 V e 25 V. Os SRM, canais de dissociação, e suas energias de colisão, foram 404,5 > 203,0 para Flunarizina e 369,4 > 167,0 para Cinarizina. A pressão de Argônio na célula de colisão foi mantida em $4,149 \times 10^{-3}$ Torr à uma temperatura 42°C.

3.6.5. Proposta de Fragmentação Para Flunarizina e Cinarizina

A Análise do espectro de massas da Flunarizina mostrou que o fragmento de m/z mais intenso, é o m/z 202,9. Dê posse dessa informação foi feito uma proposta de fragmentação para a Flunarizina, como visto na Figura 12 abaixo, nela é observa-se a Flunarizina protonada de m/z 404,5 e o fragmento formado de m/z 203,0, que é um íon benzílico estável.

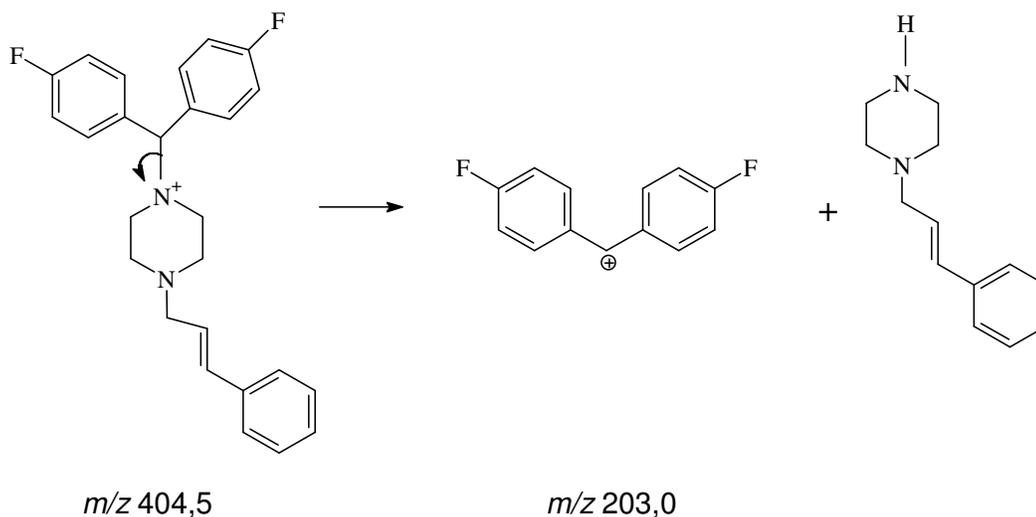


Figura 12. Proposta de fragmentação da Flunarizina.

Foi feita uma proposta de fragmentação para a Cinarizina, como é visto abaixo na Figura 13, nela é observa-se a Cinarizina protonada de m/z 369,4 e o fragmento formado de m/z 167,0, que é um íon benzílico estável.

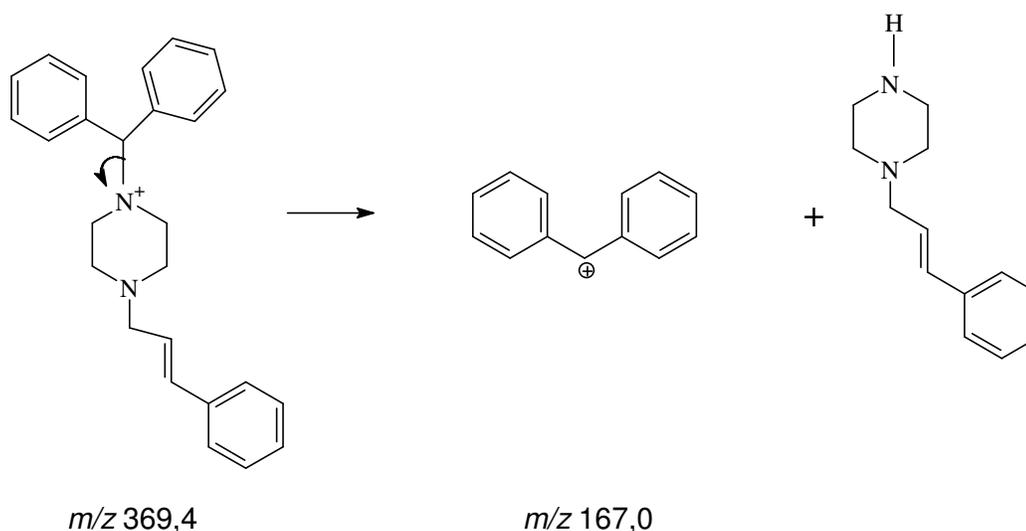


Figura 13. Proposta de fragmentação da Cinarizina.

3.6.5. Validação do Método Analítico

A Resolução n° 899 de 29 de maio de 2003 é a definição, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de como se deve realizar uma validação para que os medicamentos possam ser classificados como genéricos (ver anexo). A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências, assegurando a confiabilidade dos resultados, garantido que o método proposto possa ser usado.

3.6.5.1. Parâmetros para validação de métodos bioanalíticos

Os parâmetros fundamentais para a validação de um método são: exatidão, precisão (repetibilidade e reprodutividade), seletividade, sensibilidade e estabilidade. As medidas de cada analito na matriz biológica devem ser validadas. Além disso, deve-se determinar a estabilidade do analito nas matrizes biológicas nas quais ele foi acrescentando para construção da curva de calibração. O desenvolvimento e estabelecimento de um método bioanalítico típico inclui a determinação (ANVISA, 2002).

3.6.5.1.1 Seletividade

A Seletividade do método foi avaliada através de branco da matriz, cada amostra de branco deve ser testada para interferentes, e a seletividade deve ser assegurada no limite de quantificação.

3.6.5.1.2. Recuperação

A recuperação de um analito em um ensaio é a resposta do detector de uma quantificação de analito adicionada e ou separada de uma matriz biológica. A recuperação está ligada a eficiência do método analítico de separação, dentro dos limites de variabilidade (ANVISA 2002). A recuperação de um analito não precisa de 100%, mas a quantidade de analito recuperado e do padrão interno deve ser consistente, precisa e reprodutível. Experimentos para recuperação devem ser feitos comparando resultados analíticos de amostras a três concentrações (baixa, média e alta) com soluções-padrão nas mesmas concentrações representando 100% de recuperação. O percentual de recuperado deve ser tal que não interfira na quantificação da corrida analítica que se segue. O percentual de recuperação desejado é, na realidade, função da relação da detectabilidade do método com o limite de quantificação necessário. Por exemplo, se em função da faixa de concentração na matriz biológica antes da separação de 10 ng/mL e em meio biológico pós-separação detectar-se com confiabilidade 6 ng/mL, a recuperação necessária será de no mínimo 60%. Como guia para estimar a % de recuperação mínima, pode-se utilizar a seguinte equação:

$$\% \text{Recuperação Mínima} = \frac{\text{L.Q. Obtido no fluido biológico} \times 100}{\text{L.Q. Estimado no fluido biológico}}$$

Determinar a recuperação em 03 níveis de concentração, concentrações estas pertinentes ao estudo de bioequivalência, sendo a menor concentração no máximo três vezes o limite de quantificação (LQ). Para a variabilidade das recuperações considerar um C.V. máximo de 20% (ANVISA, 2002)..

3.6.5.1.3. Limite de quantificação

O padrão de concentração mais baixa deve ser o limite de quantificação se as seguintes condições devem ser obedecidas (ANVISA, 2002).

A resposta do analito for identificável, e reproduzível com precisão de 20% exatidão entre 80 – 120%. O limite de quantificação é normalmente definido pela relação S/N (signal-to-noise), usualmente pode ser definido quando o S/N for igual ou maior que 10.

3.6.5.1.4. Linearidade

Uma curva de resposta (padrão) é a relação entre a resposta do instrumento e concentrações conhecidas do analito. Uma curva de resposta deve ser gerada para cada analito na amostra. Um número suficiente de padrão deve ser usado para definir adequadamente a relação entre concentração e resposta. Uma curva de resposta deve ser preparada na mesma matriz biológica que as amostras de um estudo, adicionando na matriz concentrações conhecidas do analito. O número de padrões usados na concentração de curva de resposta será uma função dos valores analíticos esperados no estudo e da relação analito/resposta. Uma curva de calibração deve consistir de uma amostra “branco” (matriz isenta de droga), uma amostra “zero”, se pertinente, (matriz processada com o padrão interno) e seis ou mais amostras intermediárias cobrindo a faixa esperada, incluindo o limite de quantificação (ANVISA, 2002)

3.6.5.1.5. Curva calibração

A curva de calibração deve conter no mínimo 05 pontos incluindo-se o LQ e excluindo o branco. Caso haja exclusão de pontos, os mesmos devem ser registrados para posterior avaliação do órgão regulador (ANVISA, 2002)

Os pontos não devem exceder o desvio 15% do valor nominal e em 20% para o limite de quantificação.

Os pontos excluídos não devem ser consecutivos, nem o LQ e nem o nível mais alto da curva.

3.6.5.1.6. Precisão

A precisão de um método analítico descreve a proximidade de medidas individuais de um analito quando o procedimento é aplicado repetidamente a múltiplas alíquotas de um único volume homogêneo de uma matriz biológica. O mínimo de três concentrações pertinentes a toda faixa de estudo é recomendado. A precisão determinada a cada nível de concentração não deve exceder 15% em coeficiente de variação (CV) exceto no limite mínimo de quantificação, o qual não pode-se desviar mais de 20% em C.V. A precisão é posteriormente subdividida em precisão ou repetibilidade dentro da corrida ou intra lote, que fornece a precisão durante uma única corrida analítica, e precisão ou reprodutividade entre corridas ou inter lote que mede a precisão ao longo do tempo, podendo envolver diferentes analistas, equipamentos, reagentes e laboratórios (ANVISA, 2002).

3.6.5.1.7. Exatidão

A exatidão é uma comparação da média dos resultados obtidos com os valores nominais (concentração) do analito. É medida no mínimo com cinco amostras. A media deve

ser igual ou maior ou igual que 85% do valor nominal, exceto no limite de quantificação, não deve estar abaixo de 80% (ANVISA, 2002). Abaixo esta apresentado a fórmula utilizada na verificação da precisão.

$$\% \text{Exatidão} = \frac{\text{Média dos valores obtidos} \times 100\%}{\text{Valor esperado}}$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desenvolvimento

O primeiro passo para o desenvolvimento do método analítico foi fazer um levantamento bibliográfico e a revisão da literatura já publicada sobre o assunto. A consulta à literatura tem como objetivo obter o maior número possível de informações sobre o nosso objeto de estudo, no caso o fármaco. Informações como podem ser obtidas através de revisão bibliográfica, são solubilidade, polaridade, pH, pKa, C_{max} do fármaco, T_{max} do fármaco, tempo de meia vida.

O desenvolvimento de metodologia para Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de massas seqüencial é complexa e cada desenvolvimento de método tem suas barreiras a serem vencidas, No início, é feito uma sintonia padrão de todos os parâmetros do equipamento, como voltagem do capilar, modo de ionização, temperaturas, resolução entre outros. É preciso escolher o padrão interno, os solventes para preparo de soluções, a coluna cromatográfica, a fase móvel e a vazão empregada.

O padrão interno deve ser uma substância similar à substância a ser quantificada, ter tempo de retenção próximo a esta substância, não reagir com a substância ou outro componente da matriz, não fazer parte da amostra, levando em consideração essas características foi escolhido a Cinarizina ver Figura 14, foi levado em conta que era um padrão que já tínhamos em mãos, diminuindo assim custo e tempo.

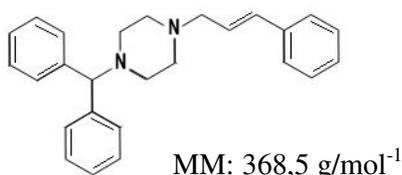


Figura 14. Estrutura Química da Cinarizina (C₂₆H₂₈N₂).

No desenvolvimento de um método, a escolha do solvente para preparo das soluções é feita de acordo com a melhor solubilidade, o solvente escolhido foi acetonitrila, após consulta das informações levantadas durante a revisão bibliográfica. Após o Preparo das soluções de 100 µg/mL de Flunarizina e Cinarizina em acetonitrila, essas soluções foram então fracionadas em 1 µg/mL, partimos para desenvolvimento no equipamento, foram feitas infusões com uma bomba manual com fluxo inicial 10 µL/min das solução na concentração de 1 µg/mL. O fluxo deve ser mantido entre 10 a 50 µL/min, pois neste momento ainda não temos fluxo constante, fase móvel. Soluções muito concentradas não

devem ser infundidas no equipamento, podendo sujar o equipamento, levando a uma perda na sensibilidade, assim como o fluxo, as concentrações também não devem ser inferiores aos já citados, podemos correr o risco de não termos uma sensibilidade boa para o início do desenvolvimento.

Primeiro é feita uma varredura de uma ampla faixa de valores de massas através da função MS, ver Figura15, que compreenda o valor nominal de massa teórica, para a confirmação da massa teórica e obtenção do espectro de MS, bem como avaliar o modo de ionização de maior sensibilidade (positivo ou negativo). Após a confirmação da Massa teórica e obtenção do MS, é realizado uma pré-otimização das condições do equipamento, como capilar, cone, RF (Rádio frequência), temperatura do bloco, temperatura dessolvatação, gás do cone.

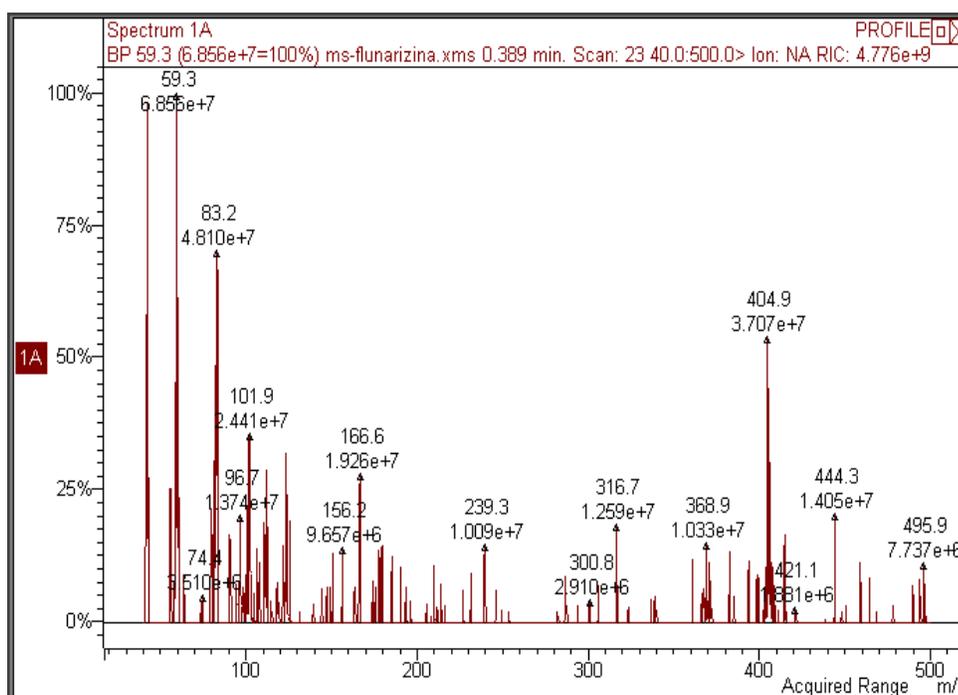


Figura15. Espectro de massas da Flunarizina em modo MS

O próximo passo é a obtenção do espectro de MS/MS Figura 16. O primeiro quadrupolo é selecionado para a massa do “íon Precursor”, em seguida foi ligado o gás de colisão, que geralmente é o argônio, que vai fragmentar a molécula no segundo quadrupolo. No terceiro quadrupolo é feita uma varredura de massas para selecionar os fragmentos mais intensos, ao selecionar-se o íon precursor e seu melhor fragmento faz-se um canal SEM que é utilizado para obter-se maior seletividade.

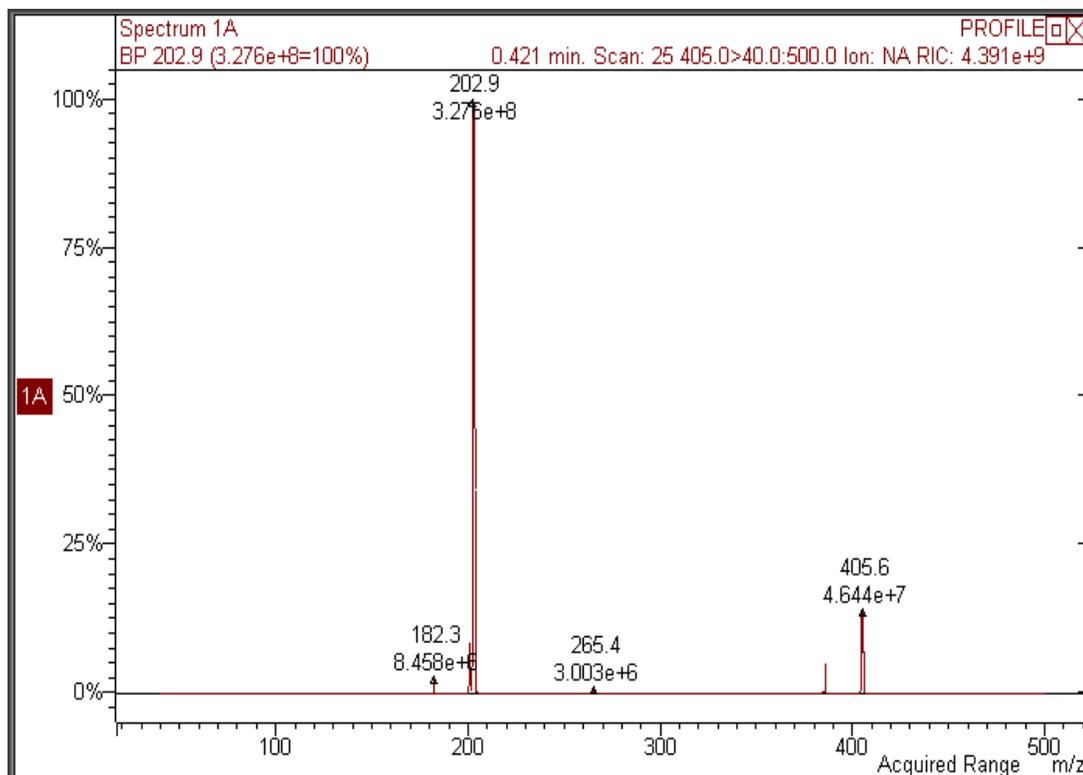


Figura16. Espectro de íons produtos no modo MS/MS

Em seguida é montada a função SRM, todo procedimento devera ser repetido para o padrão. O padrão interno tem por finalidade corrigir possíveis erros associados a variações de parâmetros instrumentais e experimentais durante as análises. Na função MRM, o primeiro quadrupolo está selecionado para o íon precursor e o terceiro quadrupolo está selecionado para o fragmento, sendo que o segundo quadrupolo funciona como uma cela de colisão, nesta função é feita a otimização da energia do cone e a energia de colisão.

Geralmente são feitas três funções MRM, em cada uma deverá conter o íon precursor e um fragmento dos três já escolhidos, mas neste estudo foi feito apenas uma função que foi MRM 404,5 > 203,0.

Colunas cromatográficas de mesma composição (C_{18}) da marca Polaris e diferentes dimensões: 5 μm , 50 x 20,0 mm e 15 μm , 50 x 20,0 mm foram testadas, os resultados estão mostrados nas Tabelas 3 e 4. Soluções de Flunarizina e Cinarizina na concentração de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ foram analisadas nas duas colunas onde foram avaliados a resolução do pico cromatográfico, a sensibilidade da análise para Flunarizina e Cinarizina, bem como o tempo de análise. O fluxo da fase móvel foi mantido em 0,18 mL/minuto para ambas as colunas. A resolução do pico cromatográfico foi satisfatória nas duas colunas, demonstrando que a composição das colunas e o fluxo são adequados para análise de Flunarizina.

Uma melhor sensibilidade foi alcançada para Flunarizina na coluna de menor diâmetro, isso se deve ao fato de que o uso de colunas menores possibilitar o uso de fluxos menores. Houve também uma redução do tempo de análise utilizando coluna de menor diâmetro, sendo assim foi a coluna escolhida para as análises.

Tabela 3: Resultados de teste de colunas para Flunarizina

Colunas	Área Flunarizina	Tempo retenção
C18 (5 µm, 50 x 20,0 mm)	6,149 e ⁺⁸	1,801
C18 (15 µm, 50 x 20,0 mm)	5,743 e ⁺⁸	2,011

Tabela 4: Resultados de teste de colunas para Cinarizina

Colunas	Área Cinarizina	Tempo retenção
C18 (5 µm, 50 x 20,0 mm)	5,489 e ⁺⁸	1,890
C18 (15µm, 50 x 20,0 mm)	4,202e ⁺⁸	2,004

A escolha da fase móvel envolveu a comparação entre metanol e acetonitrila como solventes orgânicos, os resultados estão mostrados na Tabela 5. O melhor solvente foi escolhido observando o tempo de retenção, altura da linha base, altura da banda, e área. Feita a escolha do solvente orgânico, no caso Acetonitrila, então começou-se a varia as proporções entre solvente aquoso e orgânico, ver Tabela 6, e testou-se a adição também de ácido fórmico e acetato de amônio ver Tabela 7, sempre observando os parâmetros citados acima. O ácido fórmico é utilizado para abaixar o pH da solução, isso faz com que aumente a eficiência da ionização do fármaco, conseqüentemente melhorando a assimetria dos picos.

O acetato de amônio age como agente tampão, para que não ocorra a variação do pH durante a injeção, pois o pH menor ajuda na ionização do fármaco, fazendo com que seja possível obtermos picos mais finos, nítidos, melhorando assim a resolução cromatográfica.

Tabela 5: Teste entre Solvente Orgânico

Solvente	Área (Analito)	Área (PI)
Acetonitrila 100%	5,578 e ⁺⁸	4,691 e ⁺⁸
Metanol 100%	8,183 e ⁺⁷	7,679 e ⁺⁷

Tabela 6: Teste utilizando diferentes Proporções entre acetonitrila e Água

Solvente	Área (Analito)	Área (PI)
Acetonitrila + Água (90/10)	6,423 e ⁺⁸	5,021 e ⁺⁷
Acetonitrila + Água (85/15)	5,83 e ⁺⁷	4,679 e ⁺⁷
Acetonitrila + Água (80/20)	4,423 e ⁺⁷	3,521 e ⁺⁷

Tabela 7: Avaliação de Acetonitrila + Aditivos

Solvente	Área (Analito)	Área (PI)
Acetonitrila + 0,1 % ac. Fórmico	4,678 e ⁺⁷	3,983 e ⁺⁷
Acetonitrila + 0,2 % ac. Fórmico	4,053 e ⁺⁷	3,183 e ⁺⁷
Acetonitrila + 0,3 % ac. Fórmico	3,983 e ⁺⁷	2,987 e ⁺⁷
Acetonitrila + acetato de amônia 5 Mmol L ⁻¹	7,678 e ⁺⁷	6,783 e ⁺⁷
Acetonitrila + acetato de amônia 10 Mmol L ⁻¹	9,149 e ⁺⁸	8,073 e ⁺⁸
Acetonitrila + acetato de amônia 15 Mmol L ⁻¹	8,972 e ⁺⁷	7,583 e ⁺⁷

Foram comparadas a resposta do instrumento, a resolução cromatográfica e a eficiência na ionização. Após estas análises definiu-se a fase móvel sendo Acetonitrila:Acetato de amônio 10 mmol L⁻¹. Definida a fase móvel, é realizada a injeção de soluções para a sintonia fina dos parâmetros das condições do Espectrômetro de massas.

Feito a sintonia do equipamento, foram realizados testes de contaminação cruzada para verificação da existência de interferente da droga no canal do analito e do vice versa.

Após os testes de contaminação, foi realizado testes de extrações para verificar qual dos solventes seria utilizado, os resultados estão apresentados na Tabela 8, os solventes foram escolhidos de acordo com a melhor recuperação apresentada. Para a escolha dos solventes de extração foram feitos teste utilizando um volume de injeção de 10 µL.

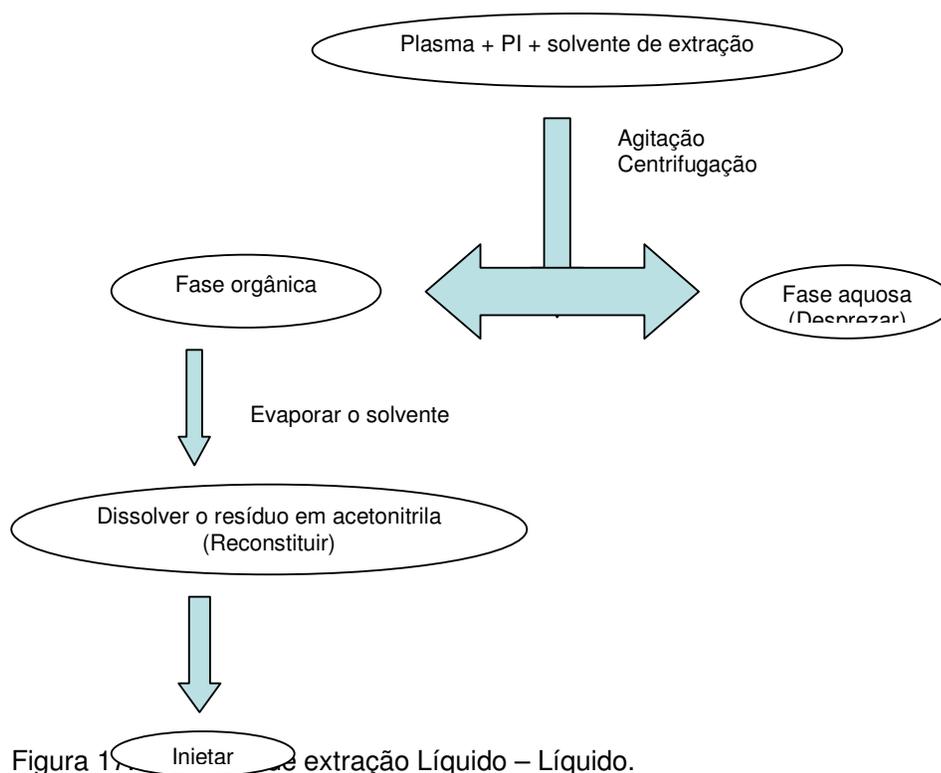
Tabela 8. Avaliação Solvente de Extração

Solvente	Área (Analito)	Área (PI)
Hexano 100%	49,11	53,67
Acetato de etila	43,87	44,19
Tricloro-metano	27,77	24,98
Dicloro-metano	23,69	21,01
Hexano / acetato de etila (1/1)	62,37	64,29

Foi testado tempos de agitação das amostra, após a adição de solvente orgânico de 5 e 10 min. Sendo que a segunda apresentou melhor resultado de reprodutibilidade e sensibilidade

Foi testado como solvente de ressuspensão Acetonitrila com volume de 300 e 600 μL , ambos tiveram resultados semelhantes, porém com 600 μL minimiza o efeito de matriz (É um tipo de interferente causado por fenômenos de absorção ou intensificação do sinal de emissão, por parte dos outros elementos que compõem a matriz). Foi feito testes com fase móvel, como solvente de ressuspensão com 300 μL e 600 μL , e esses testes apresentaram resultados piores.

A extração líquido-líquido é visto na Figura 17, apresenta vantagens de ser simples e poder utilizar um número grande de solventes, puros e disponíveis comercialmente, os quais fornecem uma ampla faixa de solubilidade e seletividade. Além disso, as proteínas presentes nas amostras são desnaturadas, eliminando a contaminação da coluna cromatográfica. A escolha do solvente orgânico e o ajuste do pH da amostra são necessários para assegurar uma boa recuperação do analito



4.2. Validação do Método Bioanalítico

Nesta seção estão apresentados os procedimentos laboratoriais utilizados para demonstrar que o método analítico descrito neste estudo é adequado e confiável para as análises propostas. Os resultados obtidos durante estes procedimentos também estão apresentados nesta seção.

Este protocolo foi criado para cumprir as seguintes finalidades:

1- Validação pré-estudo, incluindo os parâmetros: especificidade, linearidade, precisão e exatidão.

2- Definição dos parâmetros do estudo: limite de quantificação, concentração dos padrões de calibração e das amostras de controle de qualidade.

3- Determinação da estabilidade das amostras.

Estes 3 itens são descritos nas seções subseqüentes.

4.2.1.1. Especificidade/Seletividade

Através da análise de branco de matriz foi possível verificar que nenhum interferente esta presente no tempo de retenção da Flunarizina e da Cinarizina, podendo ser verificado nas Figuras 18, 19, 20. Portanto, o método foi considerado específico e seletivo para a análise de Flunarizina em plasma humano por LC-MS/MS.

Para testar a especificidade do método, amostras de plasma, foram obtidas de seis indivíduos (Ver Tabela 9), sendo quatro normais, uma lipêmica e uma hemolisada. Cada amostras branca foi testada utilizando o procedimento e as condições cromatográficas e espectrométricas propostas, comparando os resultados obtidos com a solução aquosa do analito (Figura 21), em concentrações próximas ao limite de quantificação (LQ).

Tabela 9: Amostras do fluido biológico plasma (Flunarizina)

Indivíduo	Descrição
1	Plasma Humano Normal
2	Plasma Humano Normal
3	Plasma Humano Normal
4	Plasma Humano Normal
5	Plasma Humano Lipêmico
6	Plasma Humano Hemolisado

As amostras branco que apresentaram interferência significativa no tempo de retenção do fármaco, metabólicos ou padrão interno, foram rejeitadas. Em casos em que uma ou mais amostras analisadas apresentarem tal interferente, novas amostras de outros indivíduos serem testadas.

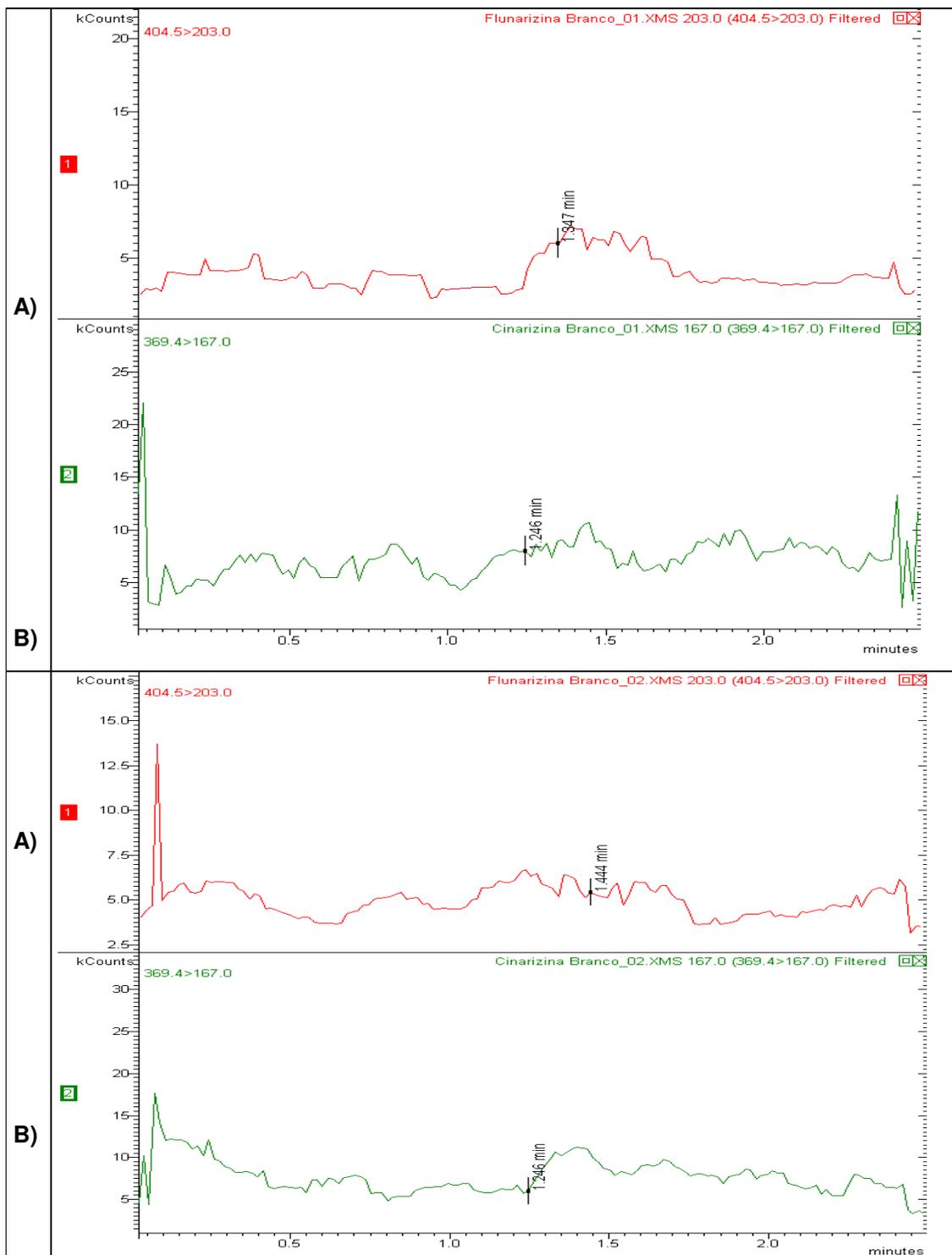


Figura 18: Cromatograma de amostras de plasma branco normal, referente ao analito e ao padrão interno, demonstrando que não existe interferência em nenhum dos canais.

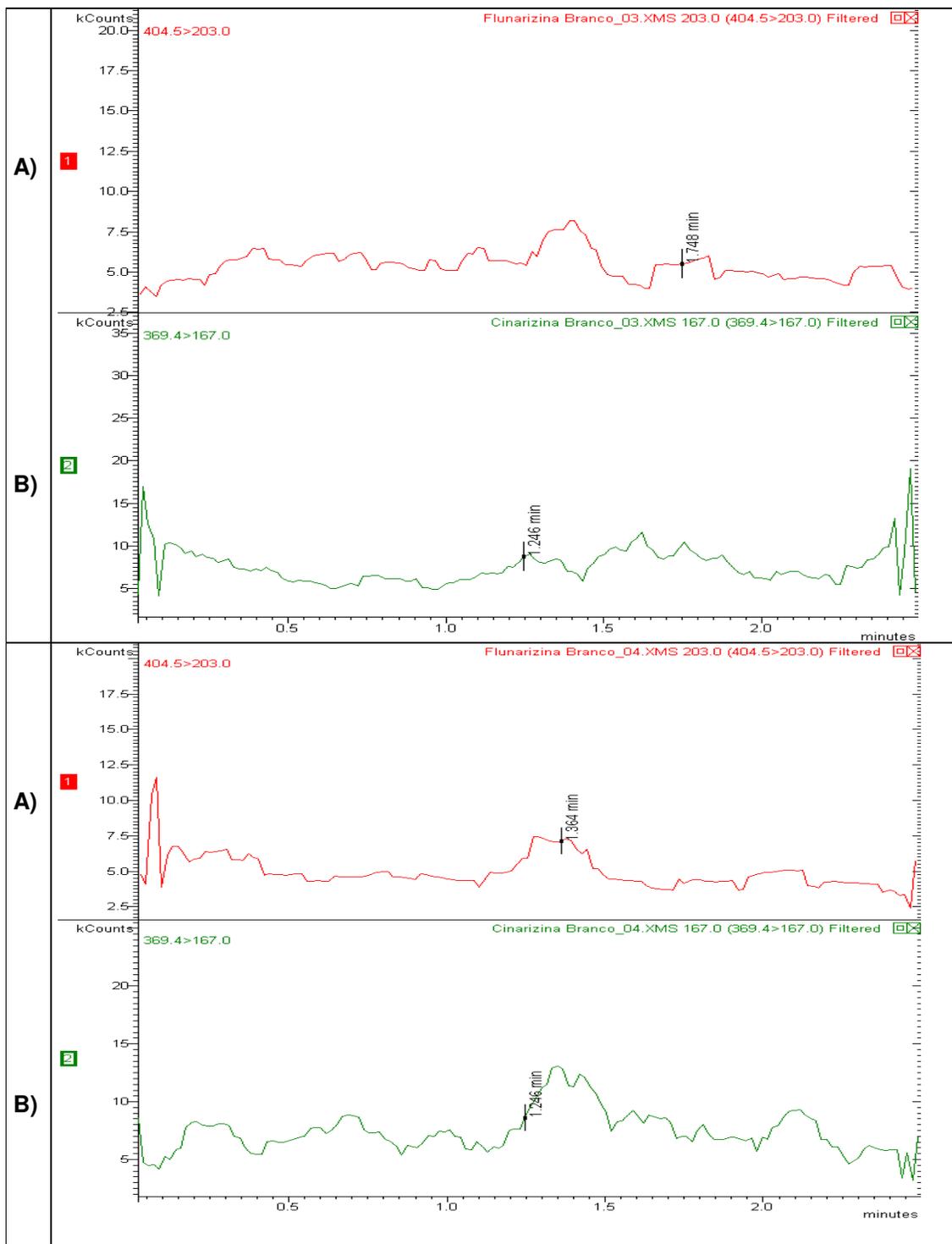


Figura 19: Cromatograma de amostras de plasma branco normal, referente ao analito e ao padrão interno, demonstrando que não existe interferência em nenhum dos canais.

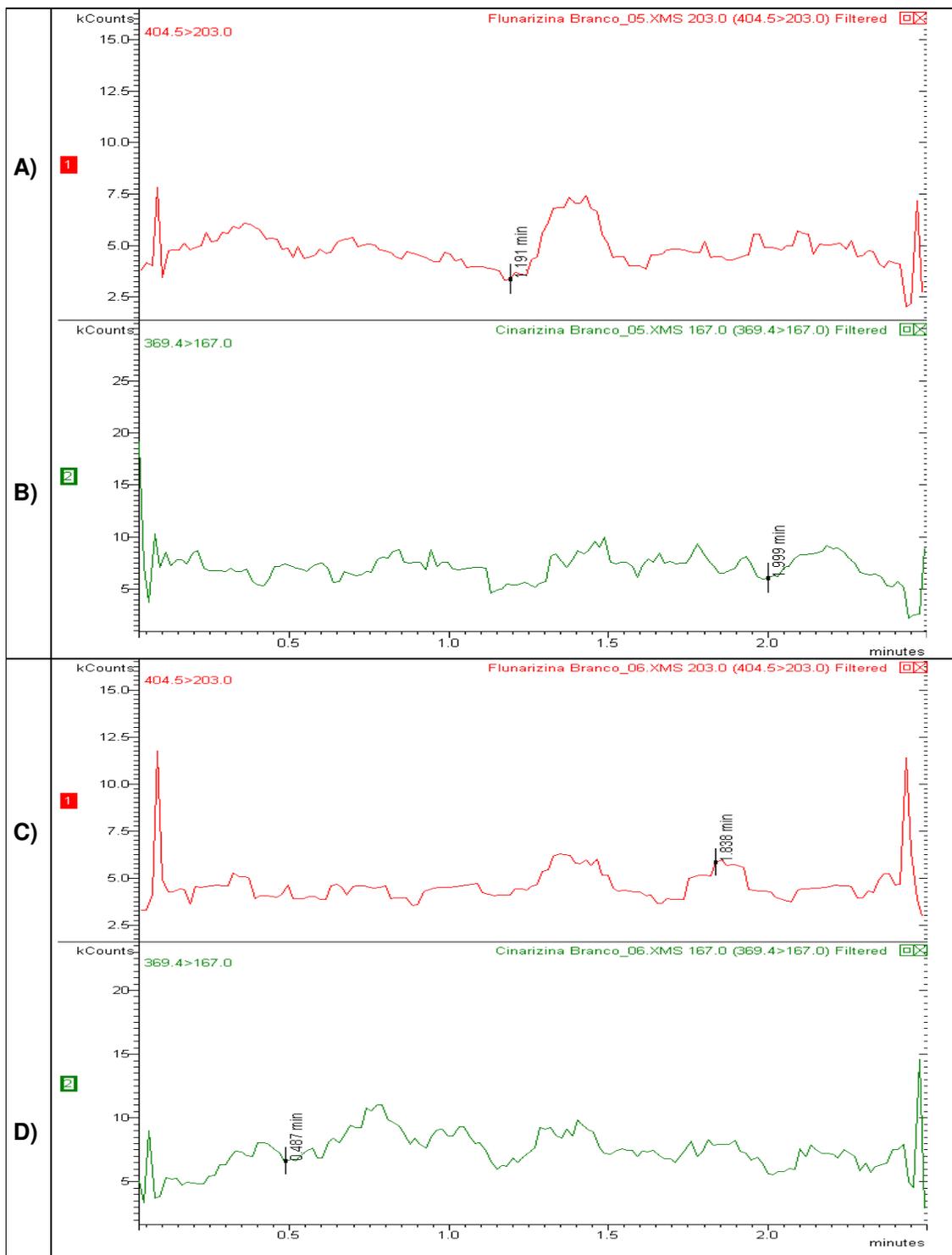


Figura 20: Cromatograma do plasma branco lipêmico (A,B), referente ao branco do analito, referente ao branco do padrão interno. Cromatograma do plasma branco Hemolisado (C,D), referente ao branco do analito, referente ao branco do padrão interno.

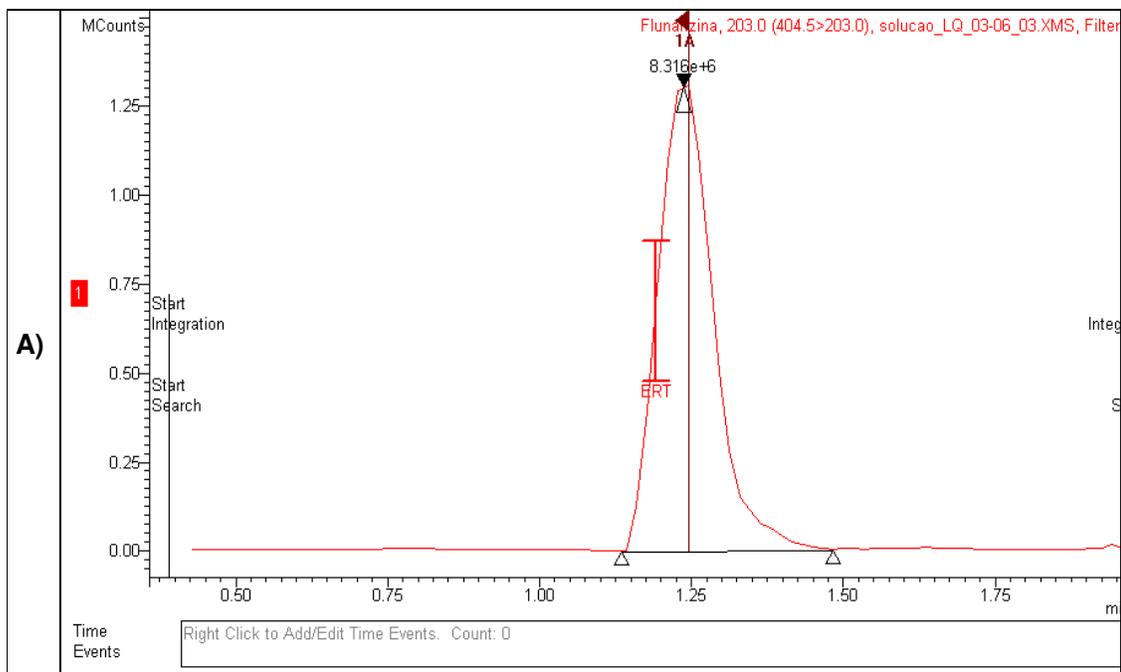


Figura 21: **A)** Cromatograma referente à Solução de Flunarizina 0,3 ng/mL (LQ).

4.2.1.2. Curva de calibração

Foi construída uma curva de calibração utilizando a mesma matriz biológica proposta para o desenvolvimento. A curva foi composta dos seguintes pontos: branco, amostra zero (matriz biológica mais padrão interno) e sete amostras contendo padrão do fármaco, nas seguintes concentrações 0.3, 1.50, 5.0, 15.0, 50.0, 75.0, 150.0 ng/mL. A curva de calibração na validação e feita em triplicata, utilizando depois uma média para determinar-se as concentrações do analito.

4.2.1.2.1. Determinação do limite de quantificação

Para definir, o limite de quantificação (LQ), foram levadas em consideração a sensibilidade do equipamento, especificidade, precisão e exatidão para o método. Para avaliar a sensibilidade, precisão e exatidão do método, amostras de controle de qualidade (LQ), também foram incluídas no procedimento de validação.

Para definir o LQ, nenhuma interferência deve ser apresentada na amostra branco no tempo de retenção do fármaco, o LQ deve ser, no mínimo, 5 vezes superior que qualquer interferência na amostra branco no tempo de retenção do fármaco., o pico de resposta do fármaco no LQ deve ter uma 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.

Desta forma definido para o LQ foi de 0,3 ng/mL.

4.2.1.3. Linearidade

A linearidade foi obtida através da construção de 3 curvas analíticas com sete níveis de concentração: sendo 0,30; 1,50; 5,00; 15,00; 50,00; 75,00; 150,00 ng/mL, na qual cada ponto foi injetado em triplicata. A Tabela 4 apresenta a média dos resultados das análises, apresenta também a média dos coeficientes de correlação (r^2), angulares (y) e lineares (x), obtidos da regressão linear das curvas analíticas para as 3 linearidades.

Para a avaliação da linearidade da curva de calibração (Ver Tabela 10), o LQ deve ter desvio menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal, em pelo menos duas das triplicatas. Para as demais concentrações desvio menor ou igual a 15%, em pelo menos duas das triplicatas, no mínimo 4 de 6 concentrações da curva de calibração devem estar dentro dos critérios anteriores. O coeficiente de correlação deve ser igual ou maior do que 0,98.

Analisando as equações das curvas analíticas, pode-se concluir que o método é linear para Flunarizina em plasma humano, ou seja, um $r^2 > 0,99$, o que demonstra que o método fornece resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro da faixa trabalhada

Tabela 10: Dados da Curva de Calibração da Flunarizina

Padrão	Concentração Nominal (ng/mL)	Medias das três linearidades Concentração Experimental (ng/mL)	CV (%)	Exatidão (%)
Flunarizina	0,30	0,2955	1,626	98,511
Flunarizina	1,50	1,5850	6,843	105,667
Flunarizina	5,00	5,3046	5,213	106,092
Flunarizina	15,00	15,3709	1,237	102,473
Flunarizina	50,00	47,7797	2,744	95,559
Flunarizina	75,00	69,4861	2,075	92,648
Flunarizina	150,00	148,5641	6,838	99,043

Equação da curva de calibração (Médias das três linearidades): $y = 0,004647 x + 0,000581$ ($r = 0,9981336$)

4.2.1.3.1. Precisão e Exatidão

Para avaliar a precisão e exatidão foram utilizadas quatro concentrações (CQ-LQ, CQB, CQM, CQA), dentro da faixa de limite esperado. O coeficiente de variação não deve exceder 15%, exceto para o LQ, para o qual se admite valores menor ou igual a 20%. Foram realizadas análises intra-lote e inter-lote.

4.2.1.3.2. Determinação das concentrações dos controles de qualidade

Os controles de qualidades foram determinados da seguinte forma, para o CQ-LQ, foi definido a mesma concentração do LQ, que foi definido em 0,3 ng/mL. Para o CQB, é definido que sua concentração deve ser menor ou igual 3 x LQ, e ficando definido em 0,9 ng/mL. Para o CQM, sua concentração tem que ser aproximadamente a média entre o CQB e o CQA, assim ficou definido 60,0 ng/mL. Para o CQA, a concentração deve ser 75-90% da maior concentração da curva de calibração, assim ficou definido em 20,0 ng/mL.

4.2.1.3.3. Validação intra-lote

A precisão e exatidão intra-lote estão apresentados nas Tabelas 11 e 12, foram determinadas utilizando-se um lote contendo uma curva de calibração, cinco amostras de cada controle de qualidade.

Para análise intra-lote, a precisão para os controles CQB, CQM e CQA e coeficiente de variação (CV) não devem exceder 15% e para o LQ, menores ou iguais a 20%. A exatidão para as amostras CQB, CQM e CQA dentro do desvio de $\pm 15\%$ do valor nominal e para o LQ, menores ou iguais a 20%.

Tabela 11: Análise Intra-Lote do Controle de Qualidade LQ da Flunarizina

Replicatas Total (5)	LQ (lote 1)	LQ (lote 2)	LQ (lote 3)
Média	0,285	0,315	0,281
DP	0,035	0,015	0,022
CV (%)	12,210	4,611	7,943
Exatidão(%)	95,03	105,03	93,61

Concentração nominal: LQ= 0,3 ng/mL, DP= Desvio Padrão e CV= coeficiente de variação.

Tabela 12: Análise Intra-Lote dos Controles de Qualidade CQB, CQM e CQA da Flunarizina

Replicatas Total (5)	CQB	CQM	CQA
Média	0,986	61,289	113,332
DP	0,083	1,459	4,699
CV (%)	8,44	2,38	4,15
Exatidão(%)	109,52	102,15	94,44

Concentração nominal: CQB= 0,9 ng/mL, CQM= 60,0 ng/mL e CQA= 120,0 ng/mL, DP= Desvio Padrão e CV= coeficiente de variação.

Foram realizados ensaios para avaliar precisão e exatidão intra-lote, como mostrado na Tabela 13, do método analítico utilizando plasmas Lipêmico e Hemolisado.

Tabela 13: Análise Intra-Lote dos Controles de Qualidade da Flunarizina em plasmas Lipêmico e Hemolisado

Réplicas Total (5)	Plasma Lipêmico			Plasma Hemolisado		
	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
Média	0,923	61,123	108,961	0,868	60,953	114,594
DP	0,036	2,996	2,066	0,027	2,579	3,444
CV(%)	3,87	4,90	1,90	3,12	4,23	3,01
Exatidão(%)	102,58	101,87	90,80	96,39	101,59	95,50

Concentração nominal: CQB = 0,9 ng/mL, CQM= 60,0 ng/mL e CQA= 120,0 ng/mL, DP= Desvio Padrão e CV= coeficiente de variação.

4.2.1.3.4. Validação inter-lotes

Para avaliação da precisão e exatidão inter-lotes, mostrados nas Tabelas 14 e 15, a precisão para os controles CQB, CQM e CQA obtido não dever exceder 15% e para o LQ, valores menores ou iguais a 20%. A para a exatidão as amostras CQB, CQM e CQA dentro do desvio de $\pm 15\%$ do valor nominal e para o LQ, desvios menores ou iguais a 20%.

Tabela 14: Análise Inter-Lotes do Controle de Qualidade LQ da Flunarizina

	LQ 1	LQ 2	LQ 3
Médias	0,285	0,315	0,281
Média Inter lote		0,294	
DP		0,019	
CV (%)		6,354	
Exatidão (%)		97,891	

Concentração nominal: LQ= 0,3 ng/mL, DP= Desvio Padrão e CV= coeficiente de variação.

Tabela 15: Para análise Inter-Lotes dos Controles de Qualidade CQB, CQM e CQA da Flunarizina

Réplicas Total (5)	CQB 1	CQB 2	CQB 3	CQM 1	CQM 2	CQM 3	CQA 1	CQA 2	CQA 3
Média	0,986	0,881	0,935	61,289	64,700	65,459	113,332	119,481	123,347
DP	0,083	0,092	0,041	1,459	0,641	0,851	4,699	2,184	2,002
CV (%)	8,44	10,41	4,35	2,38	0,99	1,30	4,15	1,83	1,62
Exatidão (%)	109,52	97,88	103,84	102,15	107,83	109,10	94,44	99,57	102,79
				CQB	CQM	CQA			
Média				0,934	63,816	118,720			
DP				0,052	2,221	5,051			
CV (%)				5,61	3,48	4,25			
Exatidão (%)				103,75	106,36	98,93			

Concentração nominal: CQB= 0,9 ng/mL, CQM= 60,0 ng/mL e CQA= 120,0 ng/mL, DP= Desvio Padrão e CV= coeficiente de variação.

4.2.1.3.6. Recuperação

A análise da recuperação do fármaco mostrado na Tabela 16, foi comparando as áreas dos picos da Flunarizina (controles baixo, médio e alto) das amostras extraídas do plasma com as áreas dos picos da Flunarizina preparada em solução. Para padrão interno mostrado na Tabela 17, foi feito uma análise comparando as áreas do pico de Cinarizina extraída do plasma com as áreas dos picos de Cinarizina preparadas em solução na concentração de 30,0 ng/mL.

Tabela 16: Análise da percentagem de recuperação do fármaco Flunarizina

Réplicas Total (5)	Área Solução/Droga			Área Plasma/Droga		
	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
Média	29400248	1573347600	3056611600	21200632	1133947200	2115765800
DP	2852835,26	53135896,34	30937573,84	536664,80	15287407,29	11468206,82
CV (%)	9,70	3,38	1,01	2,53	1,35	0,54
Recuperação (%)	72,11		72,07		69,22	

DP= Desvio Padrão e CV= coeficiente de variação

Tabela 17: Análise da percentagem de recuperação do padrão interno Cinarizina

Réplicas Total (5)	Área Sol Pi	Área Plasma Pi
Média	1181991600	835634460
DP	62531640,43	19050662,02
CV (%)	5,29	2,28
Recuperação (%)	70,70	

DP= Desvio Padrão e CV= coeficiente de variação

4.3. Avaliação

O método analítico foi validado com sucesso, uma vez que cumpriu todas as exigências, na especificidade não ocorreram interferências nos tempos de retenção do fármaco ou estas foram menores que 20% da resposta do padrão LQ. Não houve interferência no tempo de retenção do padrão interno ou esta foi menor que 5% da resposta na concentração utilizada no estudo. Na sensibilidade a menor concentração da curva de calibração foi aceito como LQ uma vez que apresentou $CV \leq 20\%$.

Na precisão, o coeficiente de variação (CV) calculado para os controles de qualidade CQB, CQM e CQA foram menores ou iguais a 15% e menores ou iguais a 20% para o controle de qualidade LQ. A exatidão calculada para o controle de qualidade LQ e para os controles de qualidade CQB, CQM e CQA apresentaram valores compreendidos dentro do desvio de $\pm 20\%$ e $\pm 15\%$, respectivamente, em relação ao valor nominal.

4.4. Estudo de estabilidade do fármaco no fluido biológico

4.4.1. Estabilidade do fármaco em ciclos de congelamento e degelo

A estabilidade da Flunarizina foi avaliada durante três ciclos de congelamento e degelo, visto na Tabela 18, de congelamento e degelo, foram analisadas cinco amostras de cada controle de qualidade (CQB, CQM e CQA), degelo 1, 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 a 24 horas) e então submetidas ao degelo natural, degelo 2. Para completar os degelos as amostras foram novamente degeladas e após este degelo foram quantificadas, degelo 3.

Tabela 18: Estudo de estabilidade da Flunarizina em plasma submetido a três ciclos de congelamento e degelo

Réplicas Total (5)	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	0,853	56,870	109,531	0,897	0,894	0,935	57,015	59,997	57,223	104,020	104,481	115,479
DP	0,059	4,616	5,818	0,101	0,068	0,061	5,099	5,587	2,244	1,819	2,184	3,637
CV (%)	6,89	8,12	5,31	11,28	7,57	6,48	8,94	9,31	3,92	1,75	2,09	3,15
Exatidão (%)	94,75	94,78	91,28	99,63	99,29	103,85	95,03	99,99	95,37	86,68	87,07	96,23

Concentração nominal: CQB= 0,9 ng/mL, CQM= 60,0 ng/mL e CQA= 120,0 ng/mL, DP= Desvio Padrão e CV= coeficiente de variação

As variações das médias mostrado na Tabela 19, para cada controle de qualidade (CQB, CQM e CQA) em cada ciclo de congelamento e degelo em relação às médias obtidas para as amostras recém-preparadas.

Tabela 19: Variação das médias dos controles de qualidade para Flunarizina nos ciclos de congelamento e degelo em relação as médias das amostras recém-preparadas.

Variação (%)	CQB			CQM			CQA		
	Deg.1	Deg.2	Deg.3	Deg.1	Deg.2	Deg.3	Deg.1	Deg.2	Deg.3
	5,15	4,79	9,61	0,26	5,50	0,62	-5,03	-4,61	5,43

Concentração nominal: CQB= 0,9 ng/mL, CQM= 60,0 ng/mL e CQA= 120,0 ng/mL, DP= Desvio Padrão e CV= coeficiente de variação

Com esses resultados concluímos que a Flunarizina analisada no plasma humano é estável nos três ciclos de congelamento e degelo quando armazenadas à -70°C .

4.5. Estabilidade de soluções padrão

Abaixo estão apresentados os resultados das análises realizadas com soluções padrão de Flunarizina 0,150 µg/mL e de Cinarizina 0,030 µg/mL.

Tabela 20: Estabilidade das soluções padrão para a Flunarizina e Cinarizina

Réplicas Total (3)	Recém Preparada		Amostras analisadas 6 h após preparo à temperatura ambiente		Amostras analisadas após 13 dias de armazenamento em refrigeração	
	Flunarizina	Cinarizina	Flunarizina	Cinarizina	Flunarizina	Cinarizina
Média	2214841333	366666033	2449670333	402643667	2484353000	392884700
DP	45298959,79	1083017,94	16318050,05	8549955,67	20921084,75	6297566,45
CV (%)	2,05	0,30	0,67	2,12	0,84	1,60

DP=Desvio Padrão e CV= coeficiente de variação

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 após de 13 dias mantidas sob refrigeração, em relação às médias obtidas para as soluções recém preparadas foram; 10,60% Flunarizina e 9,81% Cinarizina, para análise 6 horas após o preparo. Análise após 13 dias sob refrigeração mostrou que a Flunarizina teve uma variação de 12,17% e a Cinarizina 7,15%. Os resultados obtidos mostrados na Tabela 20 foram muitos satisfatórios, atendendo assim a todos os requisitos para a validação do método proposto. Dê posse desses dados podemos afirmar que a Flunarizina é estável no fluido biológico, garantido assim sua utilização, durante a realização dos testes propostos.

5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no desenvolvimento do método, pode-se concluir que o método demonstrou especificidade, exatidão e recuperação satisfatória para análise de Flunarizina no plasma humano. A validação deste método foi feita com sucesso, uma vez que cumpriu os critérios estabelecidos pela RE nº 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA. O método por CLAE-MS/MS permite medidas precisas, exatas e confiáveis de Flunarizina presente em plasma humano até 96 h depois da administração por via oral de 10 mg em voluntários saudáveis. O método descrito tem provado ser rápido e robusto com cada amostra apresentando 2,5 min. de tempo de análise e uma recuperação de 71,13%.

O método mostrou possui vantagens significativas sobre o descrito na literatura para quantificação de Flunarizina no plasma, com menor tempo de análise para cada amostra, extração mais simples, com menor custo e tempo, o que é muito satisfatório para análises em bioequivalência, visto que nestes estudos são analisados uma grande quantidade de amostras. O método cumpriu todos os parâmetros de avaliação estabelecidos pela legislação, podemos assim concluir que o mesmo é adequado para análise de Flunarizina no plasma humano, demonstrou alta aplicabilidade para estudos de bioequivalência.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA; **Agência nacional de vigilância sanitária**; Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotmail/hotsite/genericos/profissionais/artigos/ensaios.htm>. Consultado em 15 de janeiro de 2009.

ANVISA, Agência nacional de vigilância sanitária. **Manual de boas práticas em biodisponibilidade: Bioequivalência** Gerência geral de inspeção e controle de medicamentos e produtos. Brasília: Anvisa, 2002.

RESOLUÇÃO nº 478, 19 março de 2002. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária; **RESOLUÇÃO nº 899**; Guia para Validação de Métodos analíticos e Bioanalíticos; 2003.

AKISUE, G., OLIVEIRA, F., OKSUE, M.K., **Curso de Análise Cromatográfica em Camada Delgada.** São Paulo, 1983. pág. 2.

BASTOS, C.A. **Otimização de Metodologia por Cromatografia Líquida em Fase Reversa por Pareamento Iônico para Análise Simultânea de Paracetamol, Cloridrato de Fenilefrina e Maleato de Carbinoxamina em Formulações farmacêuticas.** 2008. p 22.

BISOL, L.W., **Novos usos para medicações psicotrópicas conhecidas.** UFRGS, Porto Alegre, maio de 2008. p. 16-20.

MORAES, M.C.B., LAGO, C.L., **Electrospray ionização mass spectrometry applied to study inorganic and organo- metallic species.** Química nova. Vol. 26, nº 4. São Paulo, 2003.

(a)CHAPMAN, J. R.; **Practical Organic Mass Spectrometry**, second ed., 1993; (b) WATSON, J. T., **Introduction to Mass Spectrometry**, third ed., 1997.

CHIARADIA, C. M.; COLLINS H.; JARDIM, C.S.F.; **O estado da arte cromatográfica associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos.** Química nova, vol. 31, nº 3, 623-636, 2008.

CROTTI, A.E.M.; **Espectrometria de massas com ionização por “Electrospray”:** processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. Química Nova, vol. 29, n° 2, 287-2992, 2006.

CHROMATOGRAPHY; São Paulo; USP convention, 1995. pg. 1768-1779.

DIAS, C. R. C.; LIEBER, N. S., **Generic drug policy implementation in Brazil**; cod. Saúde pública; Rio de Janeiro. Pág. 1661-1669, agosto, 2006.

Espectrometria de massas com ionização por electrospray: **Processos químicos envolvidos na formação de íons de substancias orgânicas de baixo peso molecular.** Química nova, vol. 29, São Paulo; Mar/Apr. 2006.

(a) FEDERAL REGISTER PART, 320: **Bioavailability and Bioequivalence Requirements, Food and drug Administration**, Washington, DC, 1985, p. 154; (b) FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, Pharmacopeial forum 19 (1993) 6501.

FLOR S.C. **Determination of the calcium antagonist flunarizine in biological fluids by gás-liquid chromatography** . J Chromatogr. 1983; 272 (2): 315-323.

HOLMES, B; BRODGEN R.N, HEEI R.C; SPEIGHT T.M, AVERY G.S. **Flunarizine: a review of its pharmacodynamic amd pharmacokinetic properties and therapeutic use.** Drugs, 27:6-44, 1984

HOFFMENN, E., **Mass spectrometry.**New York. John wiley e Sons, 1996.

LEI N° 9.787 DE 10 DE FEVEREIRO DE 1999. Ministério da Saúde.

LEITÃO, A.P.A. **Avaliação farmacocinética de duas formulações de minociclina em condições de jejum e após dieta rica em cálcio**; Fortaleza, 2001.

LIN, Z.J, MUSIANO, D, ABBOT, A, SHUM, L. **In Vitro plasma protein binding determination of flunarizine using equilibrium dialyses and liquid chromatography-tandem mass spectrometry** . J. Pharm Biomed Anal. 2005; 1: 4): 757-762

LOUGH, W.J; WAINER, I.W. **High Performance Liquid Chromatography, Fundamental Principles and Practice.** Glasgow: Blackie Academic e Professional; 1995, p. 1-276.

MEURER, E. C., **Técnicas modernas em espectrometria de massas: Aplicações analíticas e no estudo de reações íons/moléculas na fase gasosa.** Dezembro 2003, Campinas-SP, pg. 1-9.

MORAES, M. E.A.; MORAES M.O. **Ensaio clínico de medicamentos no Brasil. Biodisponibilidade e Bioequivalência.** *Fármacos e medicamentos*, nº 06 - Ano 1- Setembro/outubro, 2000. p. 36-40.

Micromedex® Healthcare Series, Greenwood Village, **Micromedex**, Inc., Colorado.

PIONER, L. M. **Parkinsonismo em população idosa;** Santa Catarina, 2005.

PITTA, L.R. **Estudo dos Métodos Estatísticos na Análise da Biodisponibilidade Relativa/Bioequivalência para o registro de Medicamentos no Brasil.** Fiocruz, Rio de Janeiro, 2004. pág. 3.

SAWAYA, A. C. H. F.; **Análise da composição química de própolis brasileira por espectrometria de massas;** Tese – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química; Campinas, SP; 2006.

SOARES, L. M. V.; **Como obter resultados confiáveis em cromatografia,** *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 60 (1) 79-84, 2001.

STORPIRTIS, S.; BALDUÍNO J. **Aspectos técnicos relativos ao registro de medicamentos genéricos no Brasil;** *Revista Racine*, set/out de 2001. pág. 28-33.

VITA, M., P.; SKANSEN, M.; ABDEL, R., **J. Chromatogr.** 25 (2005) 303.

(a) VALAVANI, P.; ATTA-POLITOU, J.; PANDERi, I., **J. Mass Spectrom.** 40 (2005) 516; (b) LAURITO, T. L.; MENDES, G. D.; SANTAGADA, V.; CALIENDO, G.; DE MORAES, G. E.; De NUCCI, G., **J. Mass Spectrom.** 39 (2004) 168.

7. 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 fotodiodos 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%.