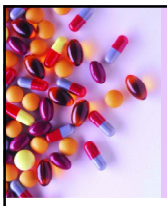
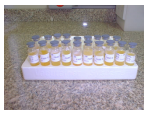
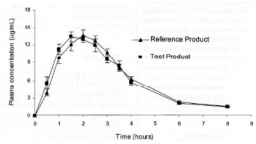


Biofarmacotécnica

Ensaios de Bioequivalência
Etapa Analítica

Introdução





método analítico
validado

Introdução

Técnicas de quantificação de fármacos em amostras biológicas:

- cromatografia líqüida de alta eficiência (CLAE, HPLC – *high performance liquid chromatography*);
- cromatografia gasosa (GC – *gas chromatography*);
- imunoensaios (radioimunoensaio, enzimaimunoensaio).

Amostra biológicas

Tipos de amostras:

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

Amostras biológicas

Pontos críticos no processo de encaminhamento das amostras biológicas:

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

Amostras biológicas

Pré-tratamento:

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

Técnicas cromatográficas

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

CLAE

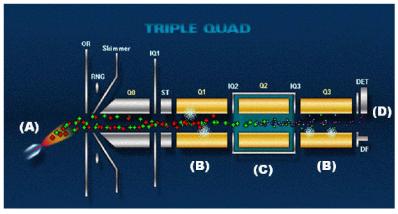
- fase móvel líquida;
- tipos básicos:
  - cromatografia líquido-líquido ou de partição;
  - cromatografia líquido-sólido;
  - cromatografia de troca iônica;
  - cromatografia de exclusão.

CLAE

Detectores:

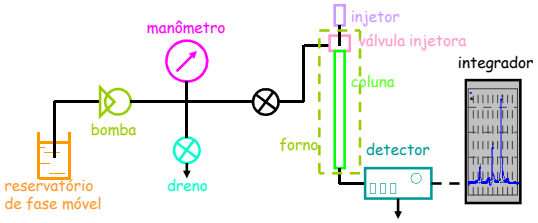
- absorbância no ultravioleta e visível (UV-VIS);
- arranjo de diodos (DAD);
- fluorescência;
- espectrometria de massas (LC/MSMS).

LC/MSMS



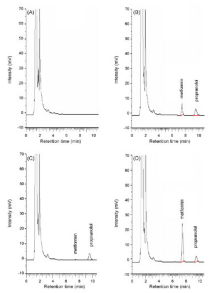
CLAE

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



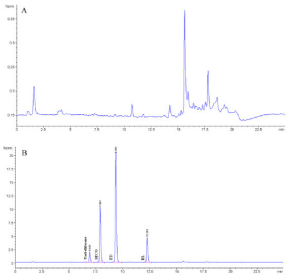
CLAE

CLAE – Cromatogramas



UV-vis

CLAE – Cromatogramas

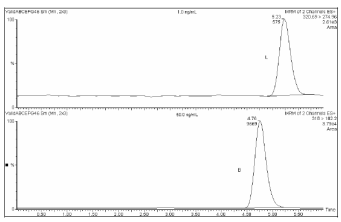


fluorescência

CLAE – Cromatogramas

lorazepam m/z=321

bromazepam m/z=318



LC-MSMS

Cromatografia gasosa

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

Imunoensaios

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

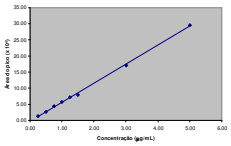
Desenvolvimento de métodos

Parâmetro importantes:

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

Quantificação do Fármaco

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



Etapa Analítica - Resumo

preparação das amostras:
- ✓ precipitação de proteínas
- ✓ extração líqüido-líqüido
- ✓ extração por fase sólida

↓

análise por CLAE/GC/IE

↓

quantificação do fármaco:
- ✓ curva de calibração
- ✓ controle de qualidade

} Validação

Validação

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

Abrange os seguintes itens:

- especificidade/seletividade;
- recuperação;
- linearidade;
- precisão;
- exatidão;
- limites de detecção e quantificação;
- estabilidade;
- robustez.