



Validação de métodos bioanalíticos



PROGRAMA DE SEGURANÇA DE QUALIDADE ANALÍTICA

É toda a ação sistemática necessária para prover de confiança adequada uma análise, de modo a satisfazer sua finalidade.

Visa reduzir erros a limites aceitáveis – engloba o Controle de Qualidade – QC – procedimentos executados no laboratório para garantir o controle do sistema de medidas.



Validação: o que é?

Processo que busca assegurar a obtenção de resultados confiáveis, válidos, pelo uso de determinado método analítico.

É um item essencial do PROGRAMA DE SEGURANÇA DE QUALIDADE ANALÍTICA - BPL



PROGRAMA DE SEGURANÇA DE QUALIDADE ANALÍTICA - BPL

BPL – Boas Práticas de Laboratório

Compreende os requisitos fundamentais relativos ao processo organizacional do laboratório

POP's – Procedimentos Operacionais Padronizados – constituem a descrição detalhada de todas as operações unitárias do laboratório.



MOTIVOS PARA VALIDAR O MÉTODO:

Definir o procedimento analítico - adequado a sua aplicação

- O que está sendo analisado***
- Porque a análise está sendo realizada***
- Assegura que o valor correto será medido***



MOTIVOS PARA VALIDAR O MÉTODO:

Define a robustez do método

-Assegura que o método pode ser utilizado por outros

-Identifica os parâmetros fundamentais que afetam o resultado

Exigência legal



ETAPAS CRÍTICAS DO PROCEDIMENTO ANALÍTICO

• AMOSTRAGEM

•PREPARO DA AMOSTRA (61% do tempo gasto em um método e 30% das causas de erros)

•QUANTIFICAÇÃO



VALIDAÇÃO OU REVALIDAÇÃO

•Antes da introdução do método na rotina

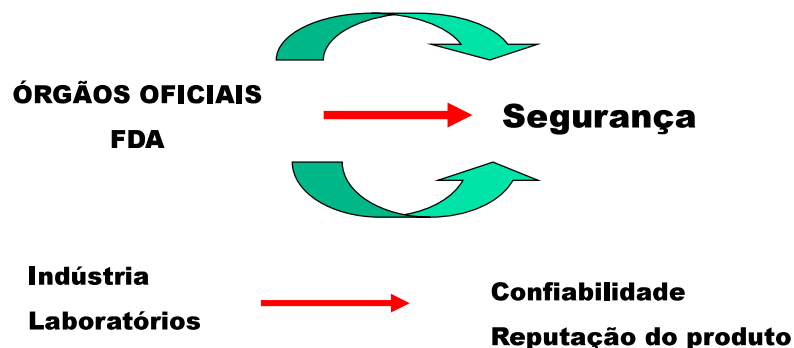
•Mudanças nas condições para as quais o método foi validado ou na finalidade do método

- Transferência do método entre laboratórios***
- Mudança no sistema de detecção***
- Mudança no processamento da amostra***
- Mudança na faixa de concentração***

PROGRAMA DE SEGURANÇA DE QUALIDADE ANALÍTICA - BPL

QUALIDADE:

Conjunto de atributos que determina a aceitação de um produto



CONFORMIDADE DO SISTEMA *System Suitability*

Conjunto de testes que devem ser realizados para garantir que o equipamento utilizado está apto a gerar resultados exatos e precisos

ICH: parte integrante da validação
USP: separado da validação

Ex: calibração de vidrarias, balanças etc

GUIAS PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

US Pharmacopoeia

International Conference on Harmonisation

US Food and Drug Administration

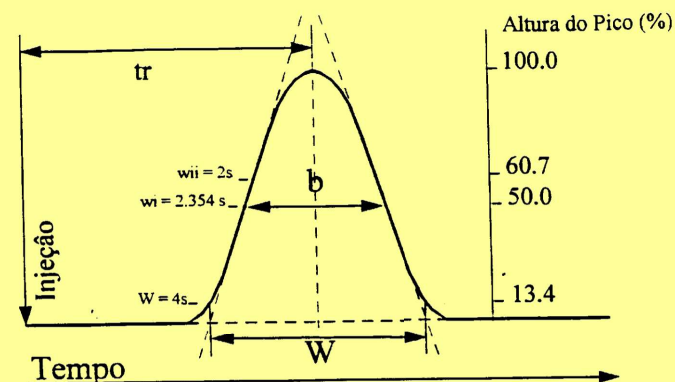
Eurachem

Resolução 899 de 29/05/03 – ANVISA

INMETRO

IUPAC

NÚMERO DE PRATOS = EFICIÊNCIA



$$N \geq 2000$$

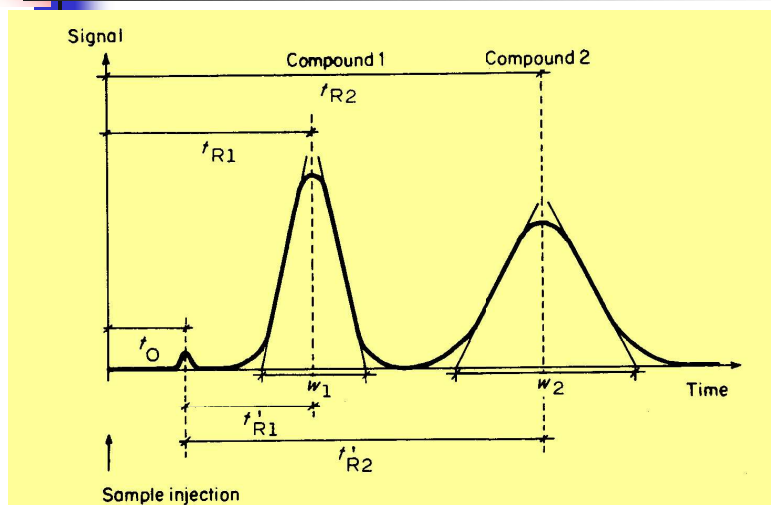
$$N = 16 \left(\frac{tr}{W} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{tr}{b} \right)^2$$

b = largura do pico a meia altura

RESOLUÇÃO

$$R_s = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_2 + w_1}$$

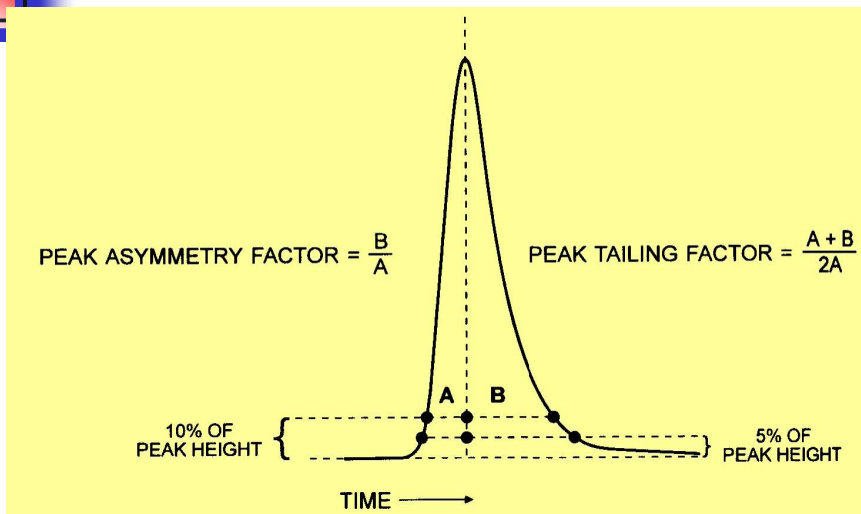
$$R_s \geq 2$$



FATOR DE CAUDA OU DE ASSIMETRIA

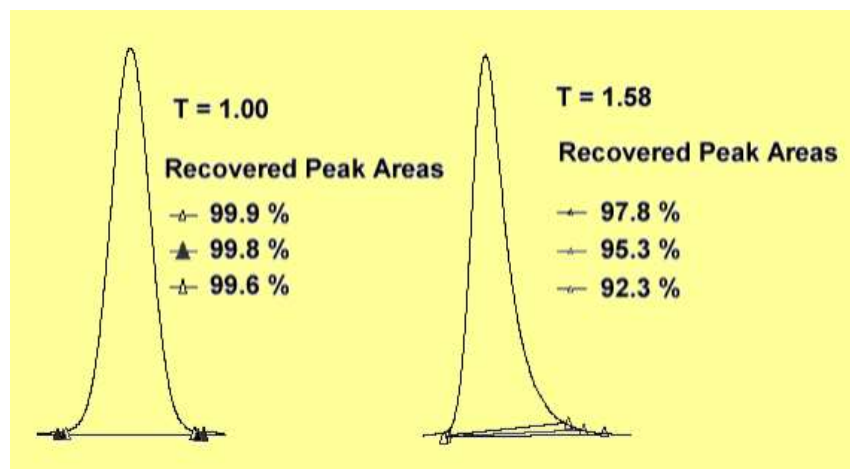
$$\text{PEAK ASYMMETRY FACTOR} = \frac{B}{A}$$

$$\text{PEAK TAILING FACTOR} = \frac{A+B}{2A}$$

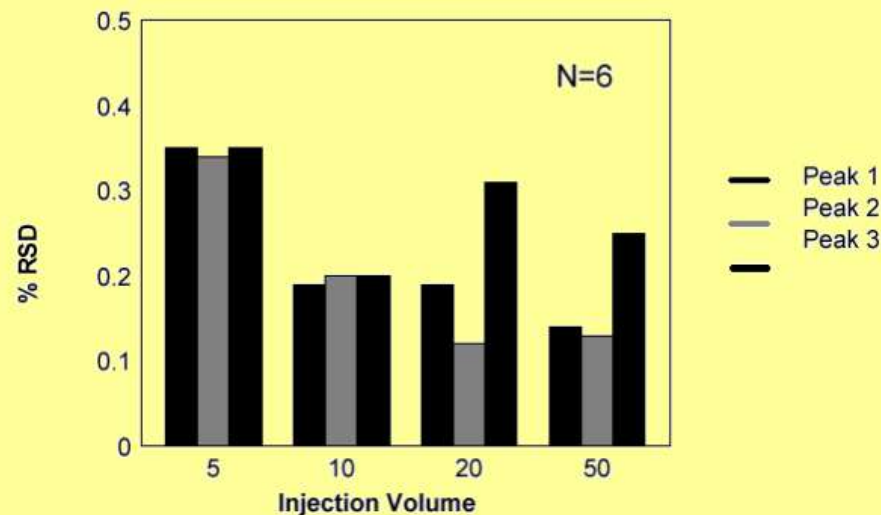


$$0,5 \leq T \leq 2$$

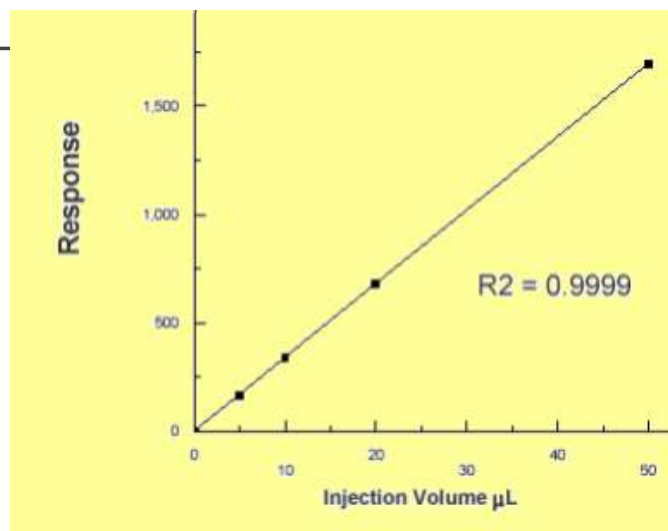
ERROS DE INTEGRAÇÃO CAUSADOS POR ASSIMETRIA



PRECISÃO NA INJEÇÃO



LINEARIDADE



VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Processo dinâmico e contínuo

ESTÁGIOS:

1. Delineamento experimental
2. Padronização analítica
3. Controle de qualidade dos resultados

VALIDAÇÃO ANALÍTICA

1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

É o planejamento propriamente dito: escolha e adequação da metodologia às condições laboratoriais, com vistas às finalidades a que se propõe.

Requer conhecimentos de toxicocinética (escolha de amostras e definição da amostragem)

VALIDAÇÃO ANALÍTICA

2. PADRONIZAÇÃO ANALÍTICA

Parâmetros principais:

- Linearidade/ curva de calibração
- limites de detecção e de quantificação
- precisão
- exatidão
- recuperação

VALIDAÇÃO ANALÍTICA

2. PADRONIZAÇÃO ANALÍTICA

Parâmetros de interesse:

- efeito das matriz
- estabilidade do analito
- seletividade
- robustez

VALIDAÇÃO ANALÍTICA

SELETIVIDADE

Método que fornece uma resposta para diversas substâncias químicas, mas é capaz de distinguir a resposta do analito da resposta de outros componentes

ESPECIFICIDADE

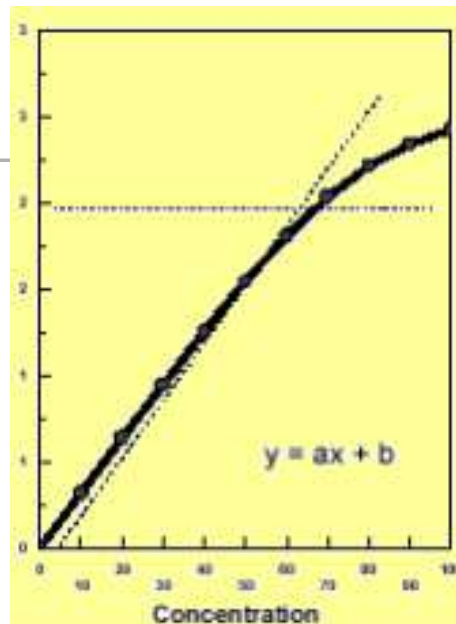
Método específico é o que fornece uma única resposta para um único analito

EXISTE ???



LINEARIDADE

Habilidade de obter resultados (dentro de uma determinada faixa) que são diretamente proporcionais a concentração da amostra



VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Linearidade

É a capacidade do método de gerar resultados proporcionais à concentração do analito. Haverá uma correlação linear entre:

Variável **independente** (concentração do analito)

Variável **dependente** (leitura ou medida)



Curva analítica → coeficiente de regressão linear



LINEARIDADE

- amostra zero (adição de PI)
- cinco, seis ou mais amostras com concentrações intermediárias cobrindo a faixa esperada, incluindo o limite de quantificação e 120 % da concentração mais alta esperada



LINEARIDADE

- Padronização interna

Soluções padrão de concentrações conhecidas do analito, com adição de padrão interno sempre na mesma quantidade



LINEARIDADE

- Padronização externa

Compara a área do analito na amostra com as áreas obtidas com soluções de concentrações conhecidas preparadas a partir de um padrão.



LINEARIDADE

- Superposição de matriz

Adição do padrão do analito, em diversas concentrações, em uma matriz similar à da amostra, isenta da substância

** Pode ser usada com ou sem adição de padrão interno*

VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Efeito Matriz

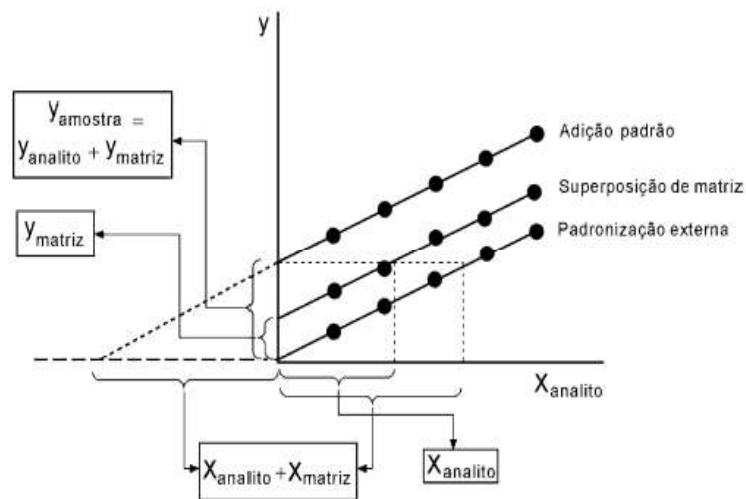
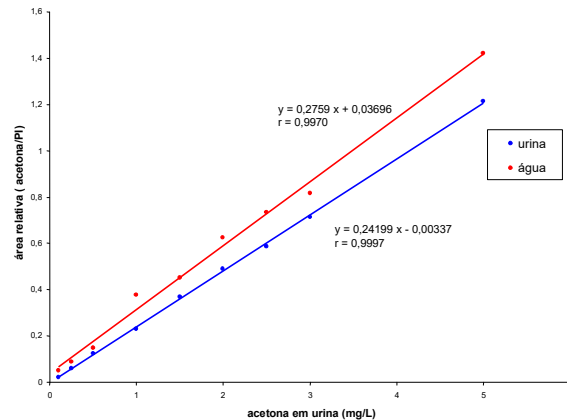


Figura 2. Interrelação entre os diferentes métodos de construção da curva analítica

LINEARIDADE

- Adição de padrão

Adição de quantidades conhecidas de analito a quantidades conhecidas de amostra, antes de seu preparo

Linearidade

Faixa de concentração: desde o LOQ até 3 ordens de magnitude deste valor, por exemplo: de 1 a 1000 ng/mL.

Tratamento estatístico da curva analítica:

- intercessão (b)  equação de regressão linear ($y = ax + b$)
- inclinação (a) 
- r ou r^2
- concentrações dos calibradores (x)
- valor da medida usada (y)
- desvio padrão ou intervalo de confiança 95% de cada ponto

VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Linearidade: faixa linear

Recomenda-se de 5 a 6 calibradores (concentrações crescentes) e de 4 a 5 replicatas/calibrador

A faixa linear é determinada pelo coeficiente de correlação de Pearson (r) ou coeficiente de determinação (r^2) da curva de calibração, sendo:

- limite inferior é o limite de quantificação (LOQ)
- limite superior é obtido pela remoção sucessiva dos mais altos valores até que se obtenha um

$$r^2 = 0,98$$

LINEARIDADE

Regressão dos mínimos quadrados: a melhor curva traçada pelos dados que minimiza a soma dos quadrados dos resíduos

*linear: mais comum
logarítmico
exponencial*

Linearidade

Cálculo de r (coeficiente de correlação)

$$r = \frac{n \sum x_1 y_1 - \sum x_1 \sum y_1}{\sqrt{n \sum x_1^2 - (\sum x_1)^2} \cdot \sqrt{n \sum y_1^2 - (\sum y_1)^2}}$$

Cálculo de a e b

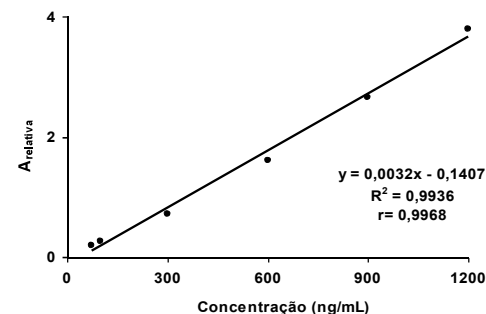
$$a = \frac{n \sum x_1 y_1 - \sum x_1 \sum y_1}{n \sum x_1^2 - (\sum x_1)^2}$$

$$b = \bar{y} - a\bar{x}$$

VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Linearidade

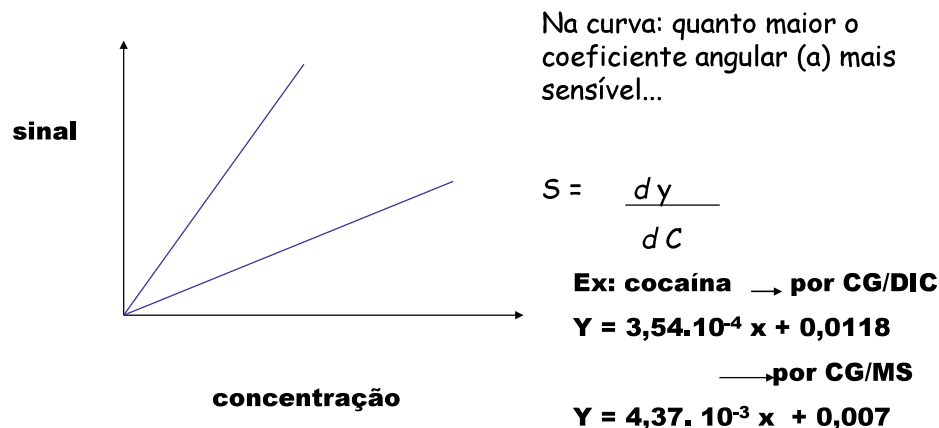
ELL



Clonazepam em plasma

VALIDAÇÃO ANALÍTICA: SENSIBILIDADE (sensitivity)

Parâmetro que descreve a variação da resposta (sinal) em função da variação da concentração do analito



VALIDAÇÃO ANALÍTICA limite de detecção - LOD

Relação sinal/ruído

A determinação é feita pela relação sinal – ruído, normalmente estabelecida como a proporção

3:1

3 desvios – padrão da leitura de um branco

Altura da linha de base x 3 (CG, HPLC)

VALIDAÇÃO ANALÍTICA limite de detecção - LOD

É a menor quantidade do analito que pode ser identificada por um procedimento analítico com um determinado grau de confiança

DEPENDE DO MÉTODO ANALÍTICO

COMO CALCULAR ??

Método visual (!)
 Relação sinal/ruído
 Curva analítica

VALIDAÇÃO ANALÍTICA limite de detecção - LOD

Curva analítica

Considera a estimativa do desvio padrão da curva analítica e o coeficiente angular da equação da reta:

$$\text{LOD} = \frac{3 \text{ DP}_{(\text{resposta})}}{S} \quad 3 \text{ ou } 3,3 \rightarrow \text{fator de segurança}$$

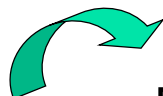
S ("slope"= inclinação)

VALIDAÇÃO ANALÍTICA

limite de quantificação - LOQ

É a menor concentração do analito que pode ser quantificada e geralmente constitui o primeiro ponto da curva.

COMO CALCULAR ??



Método visual (!)
Relação sinal/ruído
Curva analítica

- Com base numa precisão aceitável* (15-20%)
- Primeiro ponto da curva de calibração

VALIDAÇÃO ANALÍTICA

limite de quantificação - LOQ

Curva analítica

Considera a estimativa do desvio padrão da curva analítica e o coeficiente angular da equação da reta:

$$\text{LOQ} = \frac{10 \text{ DP}}{S} \quad (\text{resposta}) \quad 10 \rightarrow \text{fator de segurança}$$

S ("slope"= inclinação)

VALIDAÇÃO ANALÍTICA

limite de quantificação - LOQ

Relação sinal/ruído

A determinação é feita pela relação sinal – ruído, normalmente estabelecida como a proporção

10: 1

10 desvios – padrão da leitura de um branco

Altura da linha de base x 10 (CG, HPLC)

VALIDAÇÃO ANALÍTICA:

PRECISÃO (precision)

Representa o grau de concordância entre os resultados de análises individuais quando o procedimento é aplicado repetidamente a múltiplas análises de replicatas de **uma mesma amostra**.

RELACIONADA A ERROS ALEATÓRIOS



Desvio padrão
Coeficiente de variação –
CV - desvio padrão relativo

Como avaliar a precisão???

$$\text{CV} = \frac{\text{DESVIO PADRÃO}}{\text{MÉDIA}} \times 100$$

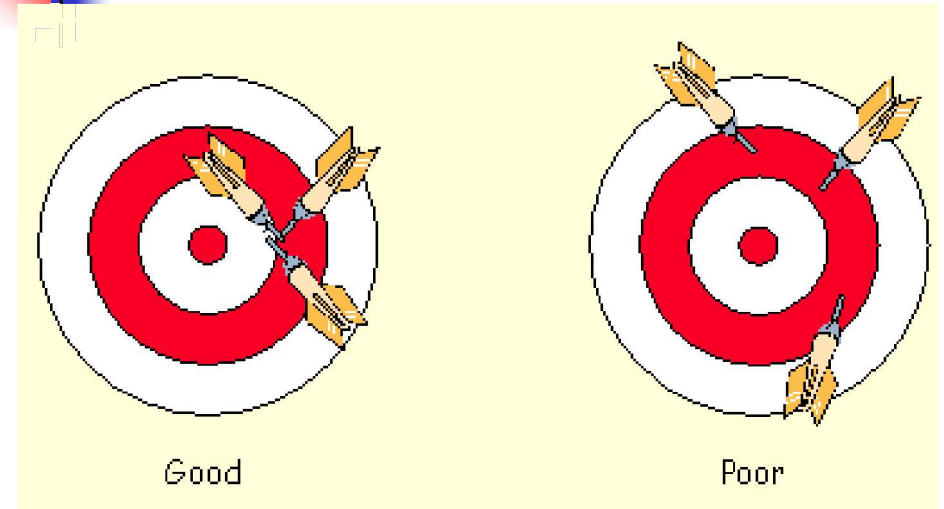
VALIDAÇÃO ANALÍTICA

PRECISÃO

Fatores que afetam a precisão de uma medida:

- experiência do analista;
- pureza de reagentes/ soluções;
- qualidade e aferição da vidraria volumétrica;
- qualidade do instrumento de medida;
- intervalo de tempo entre a análise de replicatas;
- outros

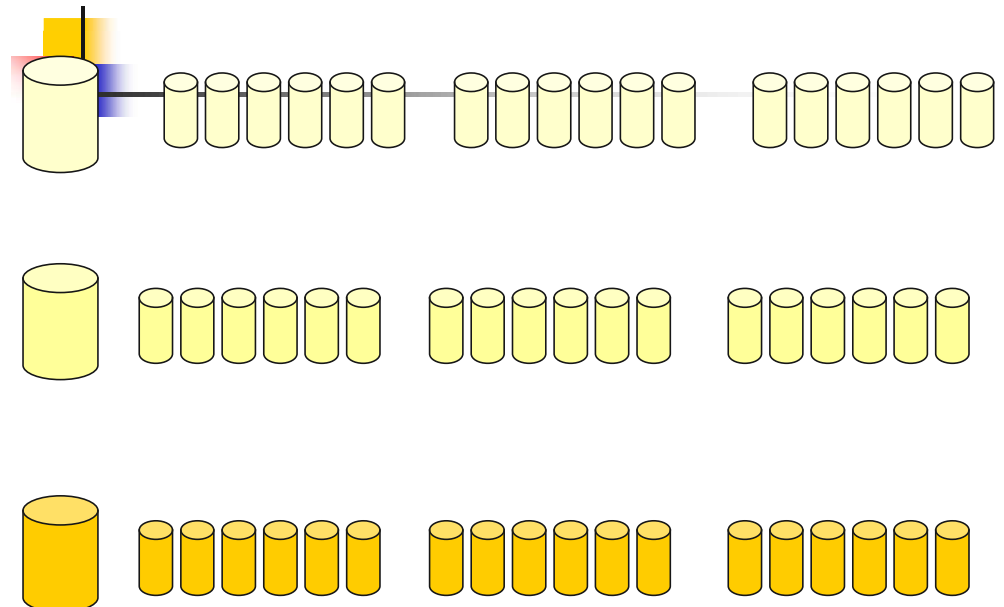
PRECISÃO



PRECISÃO

1. Repetibilidade (precisão intra-ensaio ou intra-dia)
2. Precisão intermediária (precisão inter ensaios ou inter-dias)
3. Reprodutibilidade (precisão entre laboratórios)

PRECISÃO - Procedimento



PRECISÃO

Coefficiente de variação

$$CV = s \times 100 / \bar{X}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1}}$$

s = estimativa do desvio padrão

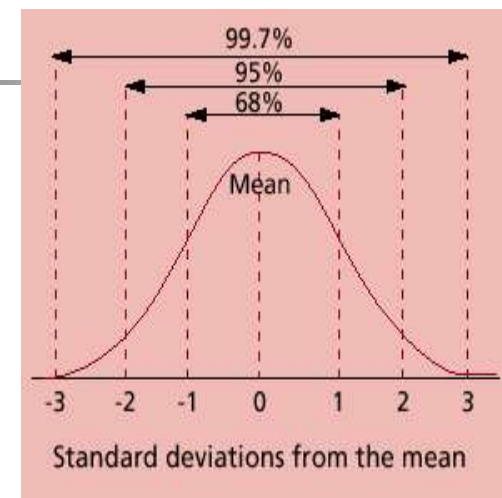
N = número de dados

x_i = cada medida individual

$\bar{X}$ = média das medidas

PRECISÃO

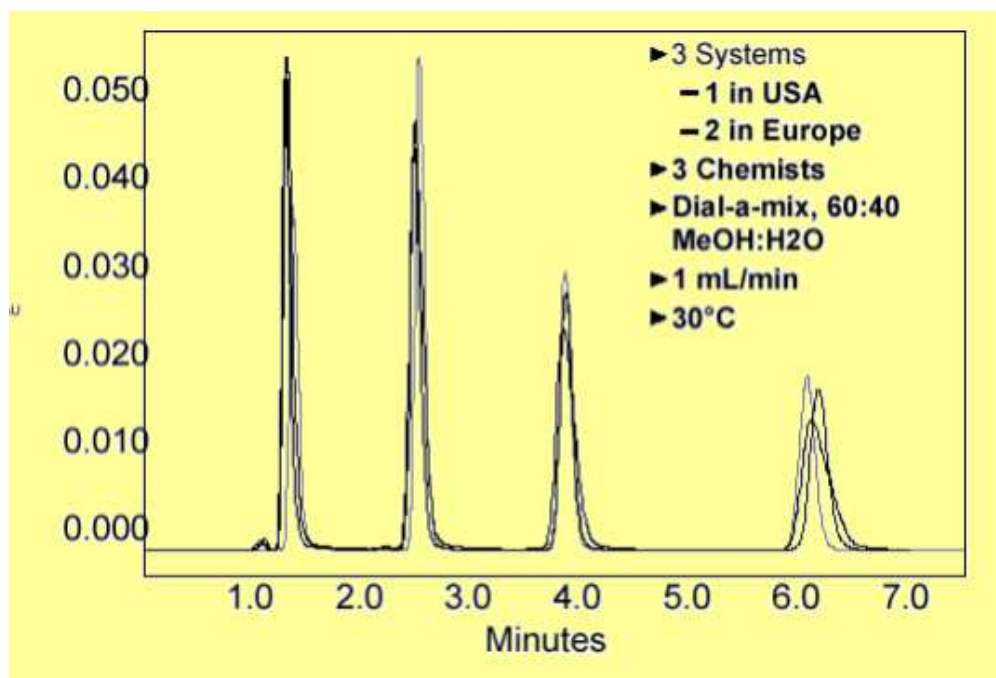
Relação entre
distribuição
normal, média e
estimativa
do desvio padrão



VALIDAÇÃO ANALÍTICA PRECISÃO / REPETIBILIDADE

Coefficientes de variação obtidos no estudo de precisão intra-ensaio, utilizando-se urina sem adição e enriquecidas com 1,0 e 3,0 mg/L de acetona.

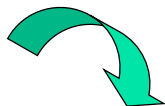
acetona em urina (mg/L)		coeficiente de variação %
adicionado	real	
sem adição	1,47	5,0
1,0	2,22	4,0
3,0	3,66	5,0



VALIDAÇÃO ANALÍTICA PRECISÃO

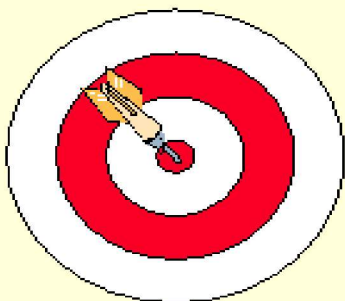
N ???

Mais recomendado: 6-10 replicatas de mesma amostra em 3 níveis diferentes de concentração (baixa, média e alta) no intervalo linear da curva analítica



EXATIDÃO

Concordância entre o valor real e o determinado



VALIDAÇÃO ANALÍTICA: PRECISÃO

A precisão depende da concentração do analito...

No CQ de fármacos em matéria prima: CV aceitável é **menor de 1%**

Na análise de substâncias químicas ou fármacos em material biológico:

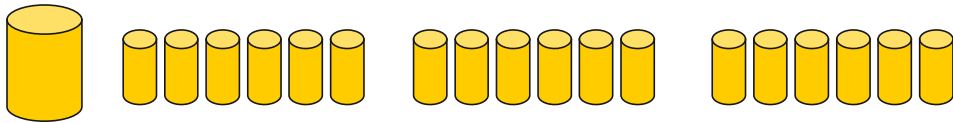
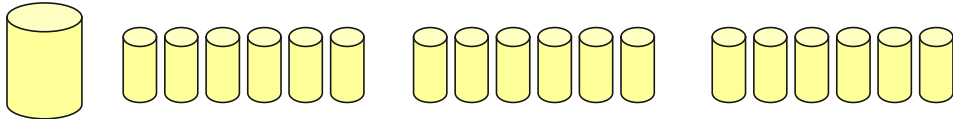
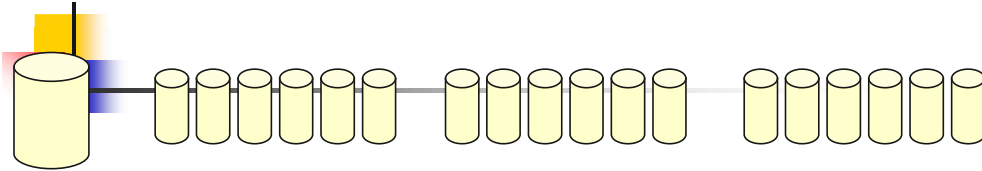
Nível de ppm (mg/kg) = aceitável até **16%** de CV

Nível de ppt ($\mu\text{g/Kg}$) = aceitável em torno de **30 e até 50%** de CV

EXATIDÃO

1. Intra-ensaio ou intra-dia
2. Inter ensaios ou inter dias
3. Entre laboratórios

EXATIDÃO - Procedimento



EXATIDÃO

$$\% \text{ exatidão} = \frac{\text{média dos valores obtidos} - \text{valor nominal}}{\text{valor nominal}} \times 100$$

EXATIDÃO

Valor nominal:

- 1. Material de referência***
- 2. Comparação com os resultados obtidos com outro procedimento já bem caracterizado***
- 3. Exatidão pode ser inferida se houver precisão, linearidade e especificidade***

EXATIDÃO

CrITÉRIOS para aceitação

Exatidão < 15%, exceto se a menor concentração for igual ao LOQ, para a qual aceita-se 20 %

VALIDAÇÃO ANALÍTICA EXATIDÃO

CAUSAS DE INEXATIDÃO ANALÍTICA:

- perdas por baixa recuperação da extração;
- soluções-padrão inadequadas;
- aparelhagem volumétrica imprecisa;
- falta de aferição da balança;
- falta de calibração dos instrumentos;
- presença de interferente na amostra;
- outros

SELETIVIDADE

Habilidade do método analítico em medir e diferenciar os analitos na presença de outros componentes da matriz (metabólitos, impurezas, produtos de degradação, componentes endógenos, etc).

VALIDAÇÃO ANALÍTICA EXATIDÃO

SELETIVIDADE

Método que fornece uma resposta para diversas substâncias químicas, mas é capaz de distinguir a resposta do analito da de outros componentes

ESPECIFICIDADE

Método específico é o que fornece uma única resposta para um único analito

EXISTE ???



VALIDAÇÃO ANALÍTICA: ROBUSTEZ (robustness)

É a capacidade do método de permanecer inalterado (fornecer os mesmos resultados), frente a pequenas variações de seus parâmetros (temperatura da sala, vazão da fase móvel na cromatografia, diferentes marcas de reativos, entre outros).

ROBUSTEZ

Variáveis

Força da fase móvel (% solvente orgânico)

Temperatura

Vazão

pH e força iônica da FM

Solvente da amostra

Volume injetado

Comprimento de onda de detecção

Parâmetro medido

Resposta (área/concentração)

Tempo de retenção ou fator de retenção

Seletividade e/ou resolução

VALIDAÇÃO ANALÍTICA: ABRANGÊNCIA

Um método se mostra abrangente quando se mostra capaz de determinar um ou mais analitos em diferentes matrizes OU diversos analitos numa mesma matriz.

ROBUSTEZ

Etapa de preparação da amostra

Duração da extração

Meio de extração

Temperatura

VALIDAÇÃO ANALÍTICA: RECUPERAÇÃO

Entende-se por recuperação de um método o percentual do analito na amostra que alcança a etapa final da marcha analítica

Relacionada à exatidão do método

É feita para cada tipo de matriz, em concentrações correspondentes a baixa e alta da faixa linear ($n = 4$ ou 5 para cada concentração)

RECUPERAÇÃO

Eficiência do processo de preparação da amostra

- Resultados de amostras submetidas ao processo de extração em comparação a soluções padrão não processadas
- Avaliada para pelo menos 3 concentrações do analito
- A menor concentração deve ser no máximo 3 vezes o LOQ

VALIDAÇÃO ANALÍTICA RECUPERAÇÃO

Um dos processos mais usados:

- 5 amostras em que o analito é adicionado à amostra que então é submetida a todas as etapas do método (x %) – amostra de **controle interno**;
- 5 amostras submetidas ao processo de extração, sendo o analito adicionado *no extrato* obtido (100%)
– amostra de **controle externo**

$$\% \text{ recuperação} = \text{ACI} / \text{ACE} \times 100$$

VALIDAÇÃO ANALÍTICA RECUPERAÇÃO

CÁLCULO: por comparação entre

1. A média dos resultados obtidos para a concentração estudada
2. A concentração *inicialmente presente na matriz* (não-extraída)

VALIDAÇÃO ANALÍTICA: Estabilidade

Trata-se da estabilidade do analito na matriz (ou em soluções)

Geralmente usa-se o calibrador de concentração média (com relação à curva de calibração)

Como FAZER ???
por QUANTO TEMPO ???

Exemplo: para amostras congeladas:

sangue total/ plasma

3, 6, 24 h

para urina:

0 mesmo + 1 semana após

ESTABILIDADE

Soluções padrão do fármaco e PI

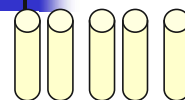
Temperatura ambiente, tempo $\geq 6H$

Temperatura de estocagem, tempo máximo usado

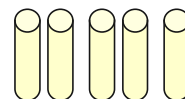
ESTABILIDADE

Ciclos de congelamento e descongelamento

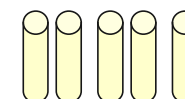
Concentração baixa



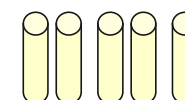
Amostra recém-preparada



Primeiro ciclo: amostra congelada 24 H, descongelada e deixada a temp. ambiente por 1 H



Segundo ciclo: amostra congelada 24 H, descongelada e deixada a temp. ambiente por 1 H

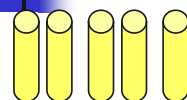


Terceiro ciclo: amostra congelada 24 H, descongelada e deixada a temp. ambiente por 1 H

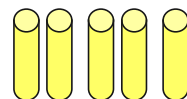
ESTABILIDADE

Ciclos de congelamento e descongelamento

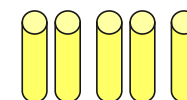
Concentração alta



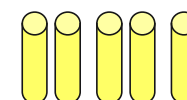
Amostra recém-preparada



Primeiro ciclo: amostra congelada 24 H, descongelada e deixada a temp. ambiente por 1 H



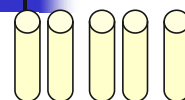
Segundo ciclo: amostra congelada 24 H, descongelada e deixada a temp. ambiente por 1 H



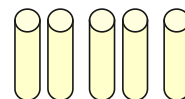
Terceiro ciclo: amostra congelada 24 H, descongelada e deixada a temp. ambiente por 1 H

ESTABILIDADE

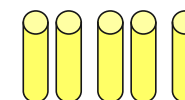
Estabilidade a temperatura ambiente



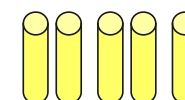
Amostra recém-preparada



Amostra deixada a temp. ambiente durante o tempo da análise



Amostra recém-preparada



Amostra deixada a temp. ambiente durante o tempo da análise



ESTABILIDADE

Amostras consideradas estáveis quando não se observar desvios superiores a 15 % (ou 20% para o LOQ) em relação as soluções recém-preparadas

Teste estatístico = teste t