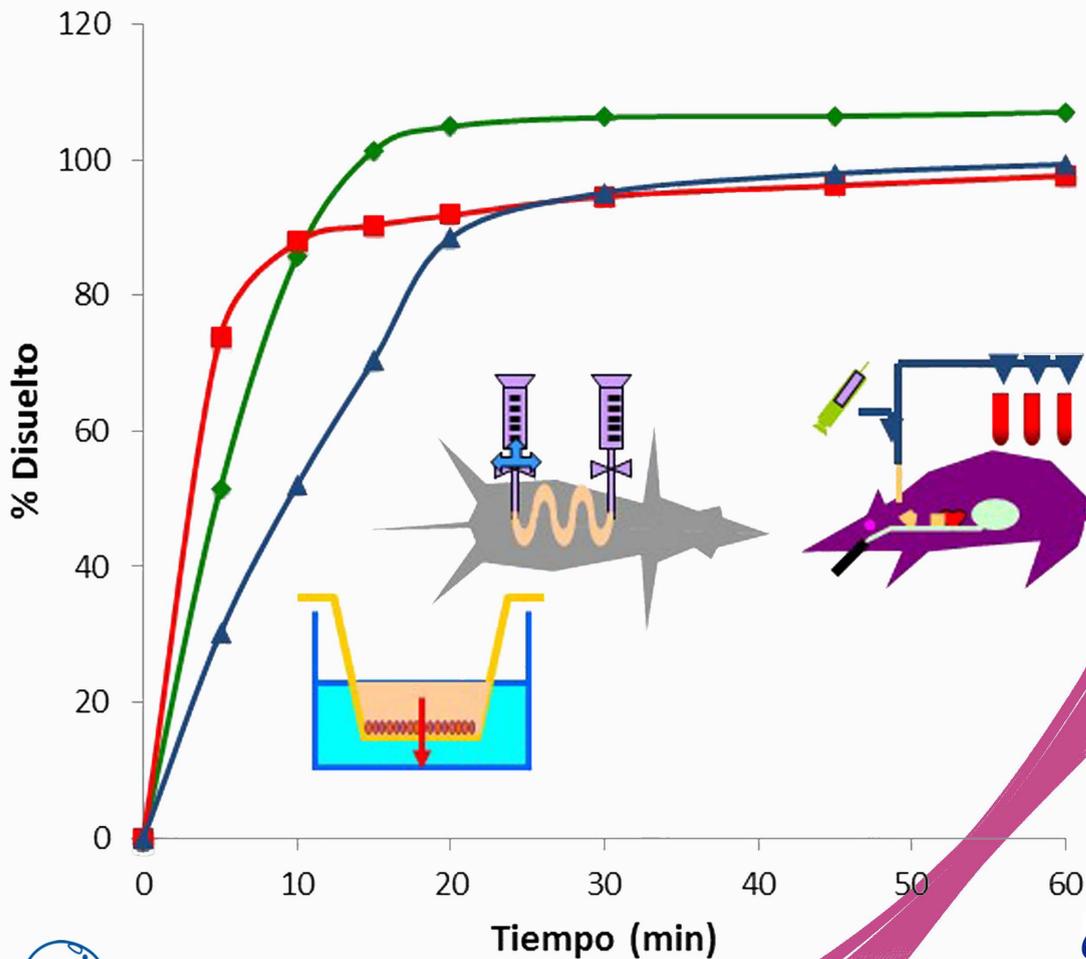


Metodologías Biofarmacéuticas en el desarrollo de medicamentos



Isabel González Álvarez
Miguel Ángel Cabrera Pérez
Marival Bermejo Sanz



Metodologías Biofarmacéuticas en el desarrollo de medicamentos

Autores:

Isabel González Álvarez

Miguel Ángel Cabrera Pérez

Marival Bermejo Sanz

ISBN:

978-84-16024-16-2

Edita:

Universidad Miguel Hernández de Elche

Maquetación:

Servicio de Innovación y Apoyo Técnico a la Docencia y a la Investigación UMH

Nota del editor:

Los textos de esta publicación y su revisión ortográfica son responsabilidad de los autores

Edición:

20/04/2015

Índice de contenidos

GENERALIDADES

1. Absorción gastrointestinal de fármacos

1.1 Absorción gastrointestinal

1.1.1 Anatomofisiología del tracto digestivo

1.1.2 Secreciones digestivas y pH local

1.1.3 Progresión del contenido digestivo

1.1.3.1 Velocidad de vaciado gástrico

1.1.3.2 Motilidad intestinal

1.1.4 Perfusión sanguínea del tracto gastrointestinal

1.2 Procesos de degradación de los fármacos

1.3 Mecanismos de absorción de los fármacos a través de la membrana intestinal

1.3.1 Difusión pasiva y difusión convectiva

1.3.2 Absorción por endocitosis

1.3.3 Mecanismos especializados de transporte

1.3.4 Cinética combinada: difusión pasiva y transporte activo

1.4 Transportadores intestinales

1.4.1 Transportadores SLC

1.4.1.1 Transportadores de oligopéptidos (SLC15A/PEPT)

1.4.1.2 Transportadores de ácidos monocarboxílicos (SLC16A/MCT)

1.4.1.3 Transportadores de solutos orgánicos (SLC22A)

1.4.1.4 Transportadores de aniones orgánicos polipeptídicos (SLC21A/OATP)

1.4.2 Sistemas de secreción de los fármacos (transportadores ABC)

1.4.2.1 Glicoproteína-P (MDR1/ABCB1)

1.4.2.2 Sistema de resistencia múltiple a fármacos (MRP/ABCC)

1.4.2.3 Proteína de resistencia de cáncer de mama (ABCG2/BCRP)

Referencias

2. Predicción de la fracción oral absorbida

2.1 Introducción

2.2 Modelos de predicción de la fracción oral absorbida basados en descriptores moleculares y parámetros fisicoquímicos

- 2.3 Modelos de predicción de la fracción oral absorbida tiempo-independientes o en estado estacionario.
- 2.4 Modelos de predicción de la fracción oral absorbida dinámicos.
- 2.5 Conclusión y perspectivas futuras.

Referencias

3 Fundamentos científicos del BCS y de la Bioequivalencia *in vitro*: Aspectos teóricos.

- 3.1 El sistema de clasificación biofarmacéutica
 - 3.1.1 Fundamentos teóricos del BCS
- 3.2 Definición de las magnitudes adimensionales An, Dn y Do.
- 3.3 Clases del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS) e implicaciones farmacéuticas.
- 3.4 Solicitudes de Bioexención: Bioequivalencia In Vitro.
- 3.5 Extensiones y aplicaciones futuras del BCS

Referencias

4 Fundamentos científicos del BCS y de la Bioequivalencia *in vitro*. Ejemplos de clasificación según el BCS

- 4.1 Introducción
- 4.2 El Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB)
- 4.3 Bioexenciones
 - 4.3.1 Solubilidad
 - 4.3.2 Permeabilidad
 - 4.3.3 Disolución
 - 4.3.3.1 Metodología para determinar las características de disolución de los productos medicamentosos
- 4.4 Ejemplos de clasificación de fármacos según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica
 - 4.4.1 Clase 1 del SCB: Verapamilo hidrocloreto
 - 4.4.2 Clase 2 del SCB: Ketoprofeno
 - 4.4.3 Clase 3 del SCB: Pirazinamida
 - 4.4.4 Clase 4 del SCB: Furosemida
- 4.5 Clasificación provisional fármacos esenciales de la OMS

Referencias

5 Estrategias tecnológicas para la modulación de la biodisponibilidad de fármacos

5.1 Introducción

5.2 Metodologías aplicables en la mejora de la biodisponibilidad de fármacos

5.2.1 Reducción del tamaño de partículas

5.2.2 Mezclas eutécticas

5.2.3 Dispersiones sólidas

5.3 Nanosuspensiones

5.4 Fluidos supercríticos-SCF

5.5 Técnicas criogénicas

5.6 Formación de complejos de inclusión

5.7 Formas amorfas y polimorfismo

5.8 Vehículos lipídicos

5.9 Conclusiones

Referencias

6 Capacitación en Metodologías Biofarmacéuticas

6.1 Introducción

6.1.1 Diarrea

6.1.2 Estreñimiento

6.2 Evaluación de actividad en la motilidad intestinal

6.2.1 Tránsito intestinal

6.2.2 Evaluación de la actividad laxante

6.3 Animales

6.3.1 Tránsito intestinal con carbón activo

6.3.2 Tránsito intestinal con carbón activo modificado

6.3.3 Tránsito intestinal en jaula metabólica

Referencias

7 Validación de métodos bioanalíticos

7.1 Historia de las regulaciones sobre métodos analíticos

7.2 Introducción a la validación de métodos bioanalíticos

7.3 Prácticas de validación

7.3.1 Validación completa

7.3.2 Validación parcial

7.3.3 Validación cruzada

7.4 Definiciones, metodología, diseño experimental y criterios de aceptación

7.4.1 Selectividad

7.4.2 Efecto de la matriz

- 7.4.3 Efecto de arrastre
- 7.4.4 Exactitud y precisión
- 7.4.5 Recuperación
- 7.4.6 Curva de calibración
- 7.4.7 Integridad de dilución
- 7.4.8 Estabilidad

Referencias

8. Investigación animal para el desarrollo de nuevos fármacos: reducir, refinar o reemplazar

- 8.1 Introducción
- 8.2 Uso de animales en experimentación en el desarrollo de un medicamento
- 8.3 Aspectos éticos
- 8.4 La regla de las 3 R
 - 8.4.1 Reemplazo
 - 8.4.1.1 Técnicas con material insensible
 - 8.4.1.2 Investigación en sujetos humanos
 - 8.4.1.3 Investigación con organismos inferiores
 - 8.4.2 Reducción
 - 8.4.3 Refinamiento
- 8.5 Legislación
 - 8.5.1 Legislación Europea
 - 8.5.2 Legislación Española
- 8.6 Los comités éticos
 - 8.6.1 Componentes del Comité ético de experimentación animal
 - 8.6.2 Funciones del Comité ético de experimentación animal
 - 8.6.3 Comisión ética de bienestar animal
- 8.7 Conclusiones

Referencias

9. Correlaciones *in vitro-in vivo*: conceptos generales, metodologías y su aplicación en las guías regulatorias

- 9.1 Introducción
- 9.2 Definiciones
- 9.3 Aplicaciones
- 9.4 Niveles de IVIVC
 - 9.4.1 Nivel A de Correlación
 - 9.4.2 Nivel B de Correlación
 - 9.4.3 Nivel C de Correlación
 - 9.4.4 Nivel C Múltiple de Correlación
- 9.5 Sistema de clasificación biofarmacéutica (BCS)

- 9.6 Evaluación de la predicción de las IVIVC
 - 9.6.1 Validación interna
 - 9.6.2 Validación externa
- 9.7 Recomendaciones de las agencias regulatorias sobre las IVIVC
- 9.8 Factores que afecta a la disolución del fármaco
- 9.9 Metodologías
 - 9.9.1 Métodos en dos etapas
 - 9.9.1.1 Wagner-Nelson
 - 9.9.1.2 Loo-Riegelman
 - 9.9.2 Métodos de deconvolución modelo-independiente
 - 9.9.2.1 Deconvolución de las transformadas analíticas de Laplace
 - 9.9.2.2 Deconvolución por ajustado de los perfiles
 - 9.9.2.3 Deconvolución Punto-Area
 - 9.9.3 Métodos de convolución
 - 9.9.4 Modelos basados en ecuaciones diferenciales
- 9.10 Ventajas y limitaciones de una IVIVC

Referencias

10. Sección solubilidad: Solubilidad de principios activos: consideraciones generales y su relación con el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico aplicado a Bioexenciones

- 10.1 El contexto biofarmacéutico y la importancia de los medicamentos genéricos o multifuentes
- 10.2 Definiciones
- 10.3 La solubilidad y los factores que inciden en ella.
 - 10.3.1 Factores relevantes en la formulación de medicamentos
 - 10.3.2 Factores que condicionan la absorción de los medicamentos
 - 10.3.3 Factores farmacotécnicos que inciden en la solubilidad del API.
 - 10.3.3.1 Disminución del tamaño de partícula
 - 10.3.3.2 Polimorfismo
 - 10.3.3.3 pH y temperatura
- 10.4 Métodos para la determinación de la solubilidad
 - 10.4.1 Shake Flask o método de agitación hasta saturación en matraces.
 - 10.4.1.1 Shake Flash y SCB
 - 10.4.2 Método potenciométrico
 - 10.4.2.1 Identificación y funcionalidad de equipo potenciométrico
- 10.5 Reflexión

Referencias

11. Métodos *in silico* para la predicción de la solubilidad de fármacos. Aproximaciones al Sistema de Clasificación Biofarmacéutico

- 11.1 Introducción
 - 11.2 Desarrollo de los modelos computacionales para la predicción de la solubilidad
 - 11.2.1 Metodología general para los estudios QSPR
 - 11.2.2 Bases de datos de solubilidad
 - 11.2.3 Descriptores moleculares
 - 11.2.4 Metodologías estadísticas para la obtención de los modelos computacionales
 - 11.2.5 Validación de los modelos computacionales
 - 11.3 Ventajas y desventajas de los modelos computacionales
 - 11.4 Aplicación a la predicción de la solubilidad dentro del BCS
 - 11.5 Clasificación provisional del BCS basado en modelos *in silico* de solubilidad
 - 11.5.1 Selección de la base de datos
 - 11.5.2 Desarrollo de los modelos computacionales
 - 11.5.3 Resultados
 - 11.6 Conclusiones y Perspectivas
 - 11.7 Agradecimientos
- Referencias

12. Estudios de permeabilidad en humanos

- 12.1 Introducción
- 12.2 Métodos para estudiar la permeabilidad intestinal en humanos
 - 12.2.1 Métodos indirectos
 - 12.2.1.1 Estudio de balance de masas farmacocinético
 - 12.2.1.2 Estudio farmacocinético comparativo
 - 12.2.1.3 Cápsulas inteligentes
 - 12.2.2 Métodos directos
 - 12.2.2.1 Método de perfusión abierta
 - 12.2.2.2 Método semiabierto de tubo multi-lumen con un balón de oclusión proximal
 - 12.2.2.3 Método de doble balón con tubo multi-lumen
- 12.3 Cálculo de la permeabilidad
- 12.4 Buenas Prácticas Clínicas en los estudios de permeabilidad en humanos
 - 12.4.1 Personal
 - 12.4.2 Documentos
 - 12.4.3 Instalaciones
- 12.5 Permeabilidad en humanos y datos obtenidos en modelos *in vitro*, *in situ* e *in vivo* en animales
- 12.6 Aplicaciones de los estudios de permeabilidad en humanos

- 12.7 Permeabilidad en humanos: investigaciones y retos futuros

Referencias

13. Cultivos celulares

- 13.1 Introducción
- 13.2 Ventajas e inconvenientes
- 13.3 Tipos de cultivos
- 13.4 Fases del crecimiento
- 13.5 Acondicionamiento para cultivos celulares
 - 13.5.1 Instalaciones
 - 13.5.2 Equipamiento
 - 13.5.3 Material
 - 13.5.4 Medio de cultivo
 - 13.5.5 Parámetros físicos
- 13.6 Contaminación
- 13.7 Buenas prácticas de trabajo
- 13.8 Los cultivos celulares para ensayos de permeabilidad
 - 13.8.1 Línea celular Caco-2
 - 13.8.2 Factores que afectan a la permeabilidad *in vitro*
 - 13.8.2.1 Factores pre-experimentales
 - 13.8.2.2 Factores experimentales
 - 13.8.2.3 Factores postexperimentales
 - 13.8.3 Aplicaciones de los ensayos de permeabilidad *in vitro*
 - 13.8.3.1 Determinación de la permeabilidad intestinal y mecanismos de transporte
 - 13.8.3.2 Estudios de mecanismos de inhibición
 - 13.8.3.3 Transfección para simular ventanas de absorción
 - 13.8.3.4 Estudio de degradación en lumen intestinal
 - 13.8.4 Correlaciones *in vitro-in vivo*
- 13.9 Otras aplicaciones y usos
 - 13.9.1 Ensayos de proliferación/citotoxicidad
 - 13.9.2 Biología del desarrollo
 - 13.9.3 Animales transgénicos
 - 13.9.4 Infecciones virales
 - 13.9.5 Diagnóstico temprano
- 13.10 Conservación
 - 13.10.1 Congelación
 - 13.10.2 Descongelación
 - 13.10.3 Organización y mantenimiento de un banco de células congeladas
- 13.11 Bancos de almacenaje de líneas celulares

Referencias

14. Sección permeabilidad: Métodos *in vitro* de estimación de la permeabilidad intestinal: membranas PAMPA

- 14.1 Introducción
- 14.2 Diferentes sistemas PAMPA
 - 14.2.1 Sistemas PAMPA comerciales
 - 14.2.1.1 BD Gentest™ Pre-coated PAMPA Plate System
 - 14.2.1.2 Pion Instruments
- 14.3 Factores críticos de los sistemas PAMPA
 - 14.3.1 Composición lipídica de la membrana
 - 14.3.2 Capa de agua estática sobre la superficie de la membrana (UWL)
 - 14.3.3 pH
 - 14.3.4 Condición de sumidero (“sink condition”)
- 14.4 Análisis de los datos

Referencias

15. Absorción transdérmica: Modelos *in vitro*

- 15.1 Introducción
- 15.2 Estructura de la piel y sus anexos
- 15.3 Vías de penetración cutánea
- 15.4 Factores implicados en la absorción transdérmica
- 15.5 Técnica *in vitro* para la evaluación del grado de penetración a través de la piel
 - 15.5.1 Piel o membranas alternativas
 - 15.5.2 Realización del ensayo de absorción transdérmica
- 15.6 Cálculo de los parámetros representativos de la difusión

Referencias

16. Métodos *in situ* de estimación de la permeabilidad (1). Sistemas de perfusión de un solo paso

- 16.1 Introducción
- 16.2 Biodisponibilidad oral
 - 16.2.1 Factores que afectan la biodisponibilidad oral de un fármaco
- 16.3 Fracción de dosis absorbida (f_a)
- 16.4 Permeabilidad intestinal efectiva (P_{eff})
- 16.5 Perfusión intestinal de un solo paso
 - 16.5.1 Fundamentos de la perfusión intestinal de un solo paso (PISP)
- 16.6 Modelos utilizados para determinar la concentración luminal del fármaco

- 16.6.1 Modelo del tanque bien mezclado
- 16.6.2 Modelo del tubo paralelo
- 16.6.3 Ventajas y limitaciones de la técnica de perfusión intestinal de un solo paso
 - 16.6.3.1 Ventajas
 - 16.6.3.2 Limitaciones
- 16.6.4 Estandarización y validación de la técnica de perfusión intestinal de un solo paso
 - 16.6.4.1 Elección de la velocidad de flujo
 - 16.6.4.2 Corrección de la concentración del fármaco en las muestras de perfundido recolectadas
- 16.6.5 Correlación entre los valores de Peff determinados in situ con la absorción intestinal en humanos
- 16.7. Conclusión

Referencias

17. Perfusión in situ sin recirculación

- 17.1 Introducción
- 17.2 Ventajas e inconvenientes
- 17.3 Acondicionamiento
 - 17.3.1 Instalaciones
- 17.4 Equipamiento y material
- 17.5 Personal
- 17.6 Buenas prácticas de trabajo
- 17.7 Tipos de animales
- 17.8 Técnica experimental
- 17.9 Aplicaciones de los ensayos *in situ*
 - 17.9.1 Determinación de la permeabilidad intestinal y mecanismos de transporte
 - 17.9.2 Estudios de mecanismos de inhibición
 - 17.9.3 Detección de ventanas de absorción
 - 17.9.4 Correlaciones
- 17.10 Factores que afectan a la técnica experimental
 - 17.10.1 Factores pre-experimentales
 - 17.10.2 Factores experimentales
 - 17.10.3 Factores post-experimentales
- 17.11 Cálculo de la permeabilidad intestinal

Referencias

18. Estudios de balance de masas y estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia. Método de canulación de la vena yugular en rata.

- 18.1 Introducción
- 18.2 Estudios de balance de masa
 - 18.2.1 Objetivo
 - 18.2.2 Diseño de los estudios
 - 18.2.2.1 Diseño experimental
 - 18.2.2.2 Selección y preparación de la dosis
 - 18.2.2.3 Obtención de muestras experimentales
 - 18.2.2.4 Valoración analítica en las muestras biológicas
 - 18.2.3 Análisis de datos
- 18.3 Estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia
 - 18.3.1 Objetivo
 - 18.3.2 Factores que influyen en la biodisponibilidad
 - 18.3.3 Diseño y análisis de datos
 - 18.3.3.1 Estudios farmacocinéticos
- 18.4 Modelos animales in vivo

Referencias

19. Métodos *in silico* para la predicción de la permeabilidad de fármacos. Aproximaciones al Sistema de Clasificación Biofarmacéutico

- 19.1 Introducción
- 19.2 Desarrollo de los modelos computacionales para la predicción de la permeabilidad
 - 19.2.1 Metodología general para los estudios QSPR
 - 19.2.2 Bases de datos de solubilidad
 - 19.2.3 Descriptores moleculares
 - 19.2.4 Metodologías estadísticas para la obtención de los modelos computacionales
 - 19.2.5 Validación de los modelos computacionales
- 19.3 Ventajas y desventajas de los modelos computacionales
- 19.4 Aplicación a la predicción de la permeabilidad intestinal dentro del BCS
- 19.5 Clasificación provisional del BCS basado en modelos *in silico* de permeabilidad
 - 19.5.1 Selección de la base de datos
 - 19.5.2 Desarrollo de los modelos computacionales
 - 19.5.3 Resultados
- 19.6 Conclusiones y Perspectivas
- 19.7 Agradecimientos

Referencias

20. Sección velocidad de disolución: Metodologías de obtención de perfiles de disolución. Aparatos, parámetros del ensayo. Cinética y comparación

- 20.1 Disolución
- 20.2 Comparación de perfiles de disolución
- 20.3 Uso del factor de similitud
- 20.4 Aparatos y procedimientos
- 20.5 Validación de los estudios de disolución
- 20.6 Modelos cinéticos

Referencias

PARTE APLICADA

21. Validación de métodos analíticos

- 21.1 Especificidad (selectividad)
- 21.2 Linealidad
- 21.3 Estabilidad de las soluciones
- 21.4 Precisión
- 21.5 Exactitud
- 21.6 Robustez
- 21.7 Resultados
 - 21.7.1 Especificidad
 - 21.7.2 Linealidad
 - 21.7.3 Estabilidad
 - 21.7.4 Precisión
 - 21.7.5 Exactitud
 - 21.7.6 Robustez

Anexo 1

Anexo 2

22. Cálculo de fracción absorbida

- 22.1 Estimación del área bajo la curva concentración plasmática-tiempo
 - 22.1.1 Cálculo del AUC mediante el método de los trapecios (integración numérica).
- 22.2 Estimación de la fracción de dosis absorbida. Método de Wagner-Nelson
- 22.3 Estimación de la fracción de dosis absorbida. Método de Loo-Riegelman

23. Cálculos en bioequivalencia

23.1 Fundamento

24. Cálculos de números adimensionales

25. Cálculos de la permeabilidad intestinal *in vitro*

Referencias

26. Cálculos de permeabilidad en células de Franz

27. Cálculo de permeabilidad en rata: perfusión de un solo paso

28. Cálculo de permeabilidad en rata: perfusión sin recirculación

29. Cálculos de velocidad de disolución

29.1 Introducción

29.2 Aparato I y II con reposición de medio

29.3 Aparato I y II sin reposición de medio

29.4 Aparato IV (acumulado)

29.5 Cálculo de resultados promedio y Factor de Similitud (f_2)

29.5.1 Resultados promedio

29.5.2 Factor de Similitud (f_2)

Referencias

30. Ajuste no lineal por mínimos cuadrados en Excel. Uso de herramienta Solver

ANEXOS

Anexo A

Anexo B

Anexo C

Anexo D

Anexo E

Anexo F

Anexo G

Anexo H

Anexo I

Anexo J

Anexo K

Anexo L

Anexo M

Anexo N

7. Validación de métodos bioanalíticos

Marcela Longhi^a, Claudia Garnero^a, Ariana Zoppi^a

^a *Universidad Nacional de Córdoba.
Argentina.*

7.1 Historia de las regulaciones sobre métodos analíticos

La historia de la validación de los métodos bioanalíticos se puede trazar desde 1990 hasta el presente. Anterior a 1990 no había uniformidad en los criterios que adoptaba la industria farmacéutica para la validación de los métodos, por lo tanto no era pareja la calidad de las presentaciones a las agencias regulatorias. El primer workshop sobre validación de métodos bioanalíticos, realizado en diciembre de 1990 en Arlington [Estados Unidos de América (EUA)], reunió a representantes de las siguientes organizaciones: American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS), Food and Drug Administration (FDA) de EUA, International Pharmaceutical Federation (FIP), Health Protection Branch y Association of Analytical Chemists. Este taller, que tuvo como objetivo debatir sobre la armonización de los requisitos y los procedimientos para la validación de los métodos bioanalíticos, fue un éxito, ya que se alcanzaron consensos sobre los parámetros esenciales y los procedimientos requeridos.

El informe de este workshop se convirtió en la referencia para la industria hasta 1999, cuando la FDA publicó el borrador de la guía sobre validación de métodos bioanalíticos, la cual se basó en el documento de 1990.

En el año 2000, luego de la publicación del documento preliminar de la guía, se desarrolló el segundo workshop sobre validación bioanalítica organizado por AAPS y FDA. El objetivo de este taller fue impulsar la discusión sobre la versión preliminar de la guía, así como también la valoración de los avances tecnológicos que acontecieron en la década luego del workshop de 1990. La guía de validación de métodos bioanalíticos de la FDA, publicada en 2001, representa la síntesis final de los dos talleres realizados en 1990 y 2000, ya que incorpora la mayor parte de

las recomendaciones contenidas en los informes de los mismos³. A partir de la publicación de la guía FDA en 2001, la AAPS y la FDA continuaron con la organización de talleres, siete hasta el año 2013, para debatir sobre las directrices de la guía y ayudar a la industria a su interpretación, así como también para compartir experiencias y ofrecer posibles soluciones para los problemas actuales en bioanálisis. A partir de las conclusiones y consensos alcanzados en estos workshops se generaron los libros blancos (white papers) de bioanálisis^{4,5,6,7,8,9}.

Si bien la guía de la FDA de validación de métodos bioanalíticos, publicada en 2001, es actualmente el documento más reconocido por la industria en diversos países, necesita ser actualizada para adecuarse a los avances registrados en este campo a través de los años.

Por su parte, en julio de 2011, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) emitió su propia guía de validación de métodos bioanalíticos¹⁰. Para la elaboración de la misma se consideraron la guía de la FDA³ y los libros blancos de bioanálisis^{4,5,6}. Esta guía define los criterios para la validación de los métodos analíticos, utilizados para determinar la concentración de analitos en matrices biológicas (plasma, suero, sangre, orina, etc.), en estudios toxicocinéticos y farmacocinéticos, que se realizan para registrar productos nuevos y/o genéricos, o bien para documentar variaciones introducidas en los existentes.

Las diferencias observadas entre las guías de la EMA y de la FDA 2001 no son significativas, se deben más al avance registrado en la ciencia en los últimos 10 años, como también a una mejor comprensión de las necesidades específicas y los desafíos que presenta el bioanálisis, que a diferencias de criterio entre ambas agencias reguladoras. Debido a que ambas guías, FDA y EMA, son muy similares, se infiere que un proceso de armonización de ambas es factible y bastante sencillo¹¹.

7.2 Introducción a la validación de métodos bioanalíticos

Los laboratorios deben demostrar que los métodos analíticos que utilizan proveen resultados fiables y adecuados para la finalidad y el propósito perseguidos, ya que muchas de las decisiones que se toman están basadas en la información que estos datos proporcionan. La validación de las metodologías, junto a otras actividades englobadas en el aseguramiento de la calidad, permite demostrar a los laboratorios que sus métodos analíticos proporcionan resultados fidedignos.

Validar un método consiste en verificar y documentar su validez, esto es, su adecuación a unos requisitos determinados, establecidos previamente por el usuario, para resolver un problema analítico particular. Estos requisitos son los que definen los parámetros o criterios de calidad que debe poseer un método a utilizar para resolver el problema analítico.

Según la norma ISO 17025¹², los laboratorios deben validar todos los métodos que utilicen, tanto los desarrollados en el mismo ámbito, como aquellos obtenidos de fuentes bibliográficas, o desarrollados por otros laboratorios. Incluso, es aconsejable validar los métodos de referencia, aunque en estos casos, no es necesario realizar una validación completa, sino que se determinarán solo los parámetros más susceptibles a variar, como la exactitud y la precisión. Además, para la validación del procedimiento analítico, el laboratorio debe considerar el rango de concentraciones a ser utilizadas, así como las matrices de las muestras.

La validación debe ser tan exhaustiva como sea necesario para responder a las necesidades de aplicación. La validación debe incluir procedimientos para el muestreo, manejo y transporte, de manera de asegurar la integridad y representatividad de las muestras.

La validación de métodos bioanalíticos es un procedimiento utilizado para demostrar que un método analítico, utilizado para la cuantificación de analitos en una matriz biológica, es fiable y reproducible para lograr su propósito, o sea para cuantificar el analito con un grado de exactitud y precisión apropiado a la tarea.

Los datos de validación, a través de investigaciones de laboratorio específicas, demuestran que el desempeño de un método es adecuado y fiable para las aplicaciones analíticas a las que estará destinado.

Todos estos controles se deben realizar para garantizar la fiabilidad de la selectividad y la sensibilidad del método bioanalítico antes de su aplicación para la evaluación cuantitativa de los fármacos y sus metabolitos. Los datos generados por estos métodos deben ser reproducibles y confiables, ya que tienen un rol significativo en la evaluación y la interpretación de la biodisponibilidad, bioequivalencia, farmacocinética y en estudios preclínicos^{13,14,15}. Se deben validar todos los métodos bioanalíticos que emplean técnicas analíticas tales como cromatografía de gases (CG); cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE), espectrometría de masas (EM) como sistema de detección en métodos tales como CLAE-EM, CLAE-EM/EM, CG-EM y CG-EM/EM; o procedimientos inmunológicos y microbiológicos, para la determinación cuantitativa de fármacos

y/o metabolitos en matrices biológicas tales como sangre, suero, plasma, orina, heces, saliva, esputo, líquido cefalorraquídeo, tejidos y muestras de piel.

Los métodos de análisis empleados para la determinación cuantitativa de fármacos y sus metabolitos en muestras biológicas deben generar datos reproducibles y fiables con el fin de permitir la interpretación válida de los estudios que sustentan. Es esencial emplear métodos de análisis bien caracterizados y completamente validados para producir resultados fiables que puedan ser satisfactoriamente interpretados. Se reconoce que las técnicas y los métodos analíticos están sujetos a cambios y mejoras constantes, a la vez que se encuentran a la vanguardia de la tecnología. También es importante destacar que cada técnica analítica tiene sus propias características, que variarán de analito a analito, por lo cual, en algunas oportunidades, es necesario desarrollar criterios de validación específicos para cada analito. Por otra parte, la adecuación de la técnica también puede estar influenciada por el objetivo del estudio.

Si bien la validación de cada método se sustenta en sí misma, pueden existir situaciones en las que sea necesaria la comparación de métodos. Además, cuando el análisis de la muestra para un estudio dado se lleva a cabo en más de un laboratorio, es necesario validar el método analítico en cada sitio y suministrar la información apropiada sobre la validación en cada uno, a fin de establecer la confiabilidad inter-laboratorios.

Se identifican claramente dos fases distintas de validación de métodos bioanalíticos:

1. el desarrollo de los métodos analíticos (validación pre-estudio), mediante lo cual se genera el método bioanalítico apropiado, con sus diversos parámetros especificados y se define el ensayo, y
2. la aplicación del método de bioanálisis a la determinación de muestras reales en estudios de biodisponibilidad, bioequivalencia, o farmacocinético.

Los parámetros esenciales, para asegurar la confiabilidad en el desempeño de un método bioanalítico, son exactitud, precisión, selectividad, sensibilidad, reproducibilidad y estabilidad. Las guías de las agencias regulatorias, como FDA y EMA^{3,10}, proporcionan la información necesaria para la determinación de estos parámetros. La estabilidad del analito debe establecerse en la matriz biológica, tanto para las condiciones de almacenamiento previstas, así como para las operativas. Las guías también establecen los requisitos para la obtención de la curva de calibración, la cual debe estar basada en la matriz y constar de un mínimo

de 5 puntos estándar, sin incluir los blancos, utilizando muestras simples o replicadas, las cuales deben cubrir todo el rango de concentraciones esperado. Todos estos parámetros deben estar definidos durante la validación completa de un método de bioanálisis. El límite inferior de cuantificación (LIC) puede ser establecido como la concentración menor en la curva de calibración y no debe confundirse con el límite de detección (LD).

Muchos de los principios, procedimientos y requisitos de validación de métodos bioanalíticos son comunes a todos los tipos de metodologías analíticas.

7.3 Prácticas de validación

Se reconoce que el método bioanalítico definido experimente muchas modificaciones durante el transcurso de un programa típico de desarrollo de medicamentos. Estos cambios evolutivos (por ejemplo, la adición de un metabolito, la reducción del LIC) requieren diferentes niveles de validación para demostrar la continuidad de la validez de los resultados de un ensayo. Por otra parte, si un método bioanalítico no se utiliza de forma regular requerirá, antes del análisis de las muestras en estudio, una adecuada revalidación de los datos cuando sea necesario, con el fin de documentar y demostrar que el método sigue siendo válido. Se definen y caracterizan tres niveles o tipos diferentes de validación de métodos: validación completa, validación parcial y validación cruzada, de acuerdo a lo establecido en el manuscrito publicado por Shah y colaboradores.

7.3.1 Validación completa

- La validación completa es necesaria cuando se desarrolla y aplica un método de bioanálisis por primera vez.
- La validación completa se requiere para un nuevo ingrediente farmacéutico activo.
- Si se agregan metabolitos a un ensayo ya existente para cuantificación, entonces será necesaria la validación completa del ensayo para todos los analitos medidos.

7.3.2 Validación parcial

Las validaciones parciales se deben realizar cuando se producen modificaciones de métodos bioanalíticos validados, que no requieran necesariamente revalidaciones completas. La validación parcial puede variar, desde algo tan insignificante como la determinación de la precisión y exactitud intra-ensayo, a una validación "casi" completa. Los cambios típicos de un método bioanalítico, que entran en esta categoría incluyen, aunque no se limitan, a:

- Transferencia del método bioanalítico entre laboratorios o analistas.
- Cambio de instrumento y /o plataforma de software.
- Variación de la especie de la que proviene la matriz (por ejemplo, plasma de rata a plasma de ratón).
- Cambios de la matriz dentro de la misma especie (por ejemplo, plasma humano a orina humana).
- Demostración de la selectividad de un analito en presencia de metabolitos específicos.
- Demostración de la selectividad de un analito en presencia de medicación concomitante.
- Cambios en la metodología analítica (por ejemplo, cambios en el sistema de detección).
- Cambio del procedimiento de procesado de la (s) muestra (s).
- Matrices raras.
- Cambio del anticoagulante usado en la toma de muestra del fluido biológico.
- Cambios de volumen limitado (por ejemplo, estudio pediátrico en proyecto).

7.3.3 Validación cruzada

La validación cruzada es una comparación de dos métodos bioanalíticos. Las validaciones cruzadas son necesarias cuando dos o más métodos bioanalíticos se utilizan para generar los datos dentro del mismo estudio. Por ejemplo, un método bioanalítico original validado sirve como "referencia" y el método bioanalítico revisado es el "comparador". Las comparaciones deben ser realizadas de ambas maneras. Validación cruzada con la matriz adicionada y muestras reales:

- Debe realizarse en cada sitio o laboratorio para determinar la confiabilidad inter-laboratorio, cuando el análisis de las muestras de un mismo estudio se realice en más de un sitio, o en más de un laboratorio.
- Se considera cuando los datos generados por distintas técnicas analíticas (por ejemplo, CLAE-EM/EM vs ELISA) en diferentes estudios se incluyen en una presentación regular.

De acuerdo a lo establecido en las normativas, se debe hacer una descripción detallada y específica del método bioanalítico. Los siguientes parámetros de validación deben estar definidos en un protocolo, en un plan de estudio o en un procedimiento operativo estándar, junto con los criterios de aceptación, previo a la ejecución de los experimentos: selectividad, efectos de la matriz, exactitud, precisión, reproducibilidad, sensibilidad, linealidad y rango, límite inferior de cuantificación, límite superior de cuantificación y evaluación de la estabilidad.

La validación del método puede incluir un único analito, múltiples analitos, o un compuesto principal y sus metabolitos. En cualquier caso, la validación debe llevarse a cabo utilizando la misma matriz prevista para el análisis de la muestra en estudio.

Todos los temas, mencionados previamente, deben ser abordados a fondo durante el desenvolvimiento del procedimiento analítico, aunque con frecuencia son pasados por alto o abordados inadecuadamente, debido al tiempo insuficiente que se le asigna al desarrollo y validación de los métodos. Debido a ello, es importante destacar que un método bioanalítico mediocre brindará datos erróneos del estudio, los cuales tendrán un impacto significativo sobre la calidad de las decisiones que se tomarán durante el proceso de desarrollo del medicamento.

7.4 Definiciones, metodología, diseño experimental y criterios de aceptación

A pesar de que en la actualidad no existe una guía global armonizada, se hace evidente que las pautas individuales presentan elevada similitud. No obstante, se hace necesario aclarar el significado y la interpretación de criterios bioanalíticos de validación de métodos.

A continuación se hace referencia a los criterios analíticos fundamentales para realizar la validación de métodos bioanalíticos. Se expondrán definiciones, metodología, diseño experimental y criterios de aceptación.

7.4.1 Selectividad

Existe una cierta discusión acerca de la interpretación de la terminología de este criterio de validación¹⁶. Algunas organizaciones definen de manera diferente a los términos especificidad y selectividad, mientras que otras a menudo los emplean de manera indistinta. A pesar de esta controversia, hay un amplio acuerdo de que especificidad /selectividad es la base fundamental de cada método analítico¹⁷. Por lo tanto, los laboratorios bioanalíticos deben optar por diferenciar selectividad y especificidad en su documentación o considerarlos como términos equivalentes y utilizarlos indistintamente.

Especificidad y Selectividad dan idea de la fiabilidad del método para discriminar el analito de componentes interferentes en la matriz. Entre los potenciales componentes interferentes en una matriz biológica se incluyen los componentes endógenos de la matriz, metabolitos de fármacos, productos de degradación del analito formados durante la preparación de la muestra, cualquier otro fármaco co-administrado y otros xenobióticos exógenos^{3,10}.

Este parámetro debe ser evaluado desde el comienzo del desarrollo del método, teniendo en cuenta las propiedades tanto del analito como de la matriz, y puede continuar determinándose durante el análisis de rutina de muestras analíticas. El analista debe usar su experiencia y datos de la literatura con el fin de probar sistemáticamente las interferencias que tienen más probabilidades de afectar el método.

Especificidad se define como la capacidad del método para evaluar inequívocamente al analito en presencia de otros componentes que pueden estar presentes en la matriz. Generalmente, hace referencia a un método que produce respuesta sólo para un analito.

Selectividad se define como la capacidad del método para medir y diferenciar al analito en presencia de otros componentes que pueden estar presentes en la matriz. Generalmente, se utiliza para un método que produce respuestas para diferentes analitos y puede distinguir entre ellos, es decir que mide exactamente un analito en presencia de interferencias.

En general, los métodos analíticos son selectivos, y solamente en algunos casos también son específicos.

Se debe demostrar que el método no se ve afectado por la presencia de interferentes; es decir, que el método permite establecer en forma exacta el

contenido o potencia del analito en la matriz. Si el método es desarrollado para cuantificar más de un analito, cada analito debe ser evaluado para asegurar que no hay interferencias.

Para la validación del método debe utilizarse, siempre que sea posible, la misma matriz biológica en la que se encuentra la muestra analítica. En tanto que matrices de disponibilidad limitada, como médula ósea, pueden ser sustituidas por matrices fisiológicamente apropiadas.

En general la selectividad del método puede ser demostrada y documentada a través de diferentes procedimientos:

- El primero consiste en demostrar la ausencia de señal de detector en una matriz blanco. Deben analizarse por separado de 6 a 10 fuentes independientes de la misma matriz biológica (plasma, orina u otra matriz). Para cada muestra se debe demostrar la ausencia de compuestos que interfieran con la cuantificación del analito.
1. Todas las muestras deberían cumplir el criterio de aceptación.
 2. Si 2 de las muestras blanco no cumplen con el criterio, el método debe volver a la etapa de desarrollo y se debe mejorar su selectividad (aumento de limpieza/etapa de extracción/o separación cromatográfica).
 3. Si 2 de las muestras blanco no cumplen con el criterio, otros 6 a 10 lotes adicionales pueden ser evaluados, y todos deben cumplir con el criterio de aceptación o será necesario un desarrollo adicional para eliminar el origen de la interferencia.
 4. Si 2 de las muestras blanco no cumplen con el criterio, otros 6 a 10 lotes adicionales pueden ser evaluados, y si 2 o más de las muestras adicionales no cumplen con el criterio de aceptación el método debe volver a la etapa de desarrollo y se debe mejorar su selectividad.
- Sin embargo, es evidente que todas las fuentes posibles de interferencia propias de las diversas matrices no estarán presentes en las 6-10 fuentes estudiadas. Por lo tanto, otro enfoque recomienda evaluar muestras blanco de la matriz biológica enriquecida con la máxima concentración probable de posibles metabolitos, productos de degradación, fármacos de uso común y co-administrados en estudios clínicos u otros componentes de la matriz. En caso de productos de degradación desconocidos o que no puedan aislarse, pueden producirse degradaciones forzadas (fotólisis, hidrólisis ácida y básica, oxidación, termólisis) de los analitos.

- Otro planteo propone no demostrar la ausencia completa de interferencias sino que permite una pequeña cantidad de compuestos interferentes. Se requiere analizar hasta 20 fuentes independientes de la matriz biológica enriquecida con potenciales compuestos interferentes así como el analito en estudio en una concentración igual a su límite inferior de cuantificación (LIC)¹⁶.

En adición, se recomienda considerar dos aspectos relacionados a selectividad:

- Interferencia específica de sustancias fisicoquímicamente similares al analito: deben evaluarse individualmente y en combinación con el analito de interés los siguientes interferentes: metabolitos de reactividad cruzada, fármacos co-administrados o compuestos endógenos.
- Efectos no específicos de la matriz:
 1. Se deberían comparar las curvas del estándar en fluidos biológicos y en solución amortiguadora para detectar efectos de la matriz.
 2. Se debería evaluar el paralelismo de muestras de estudio diluidas con estándares diluidos para detectar efectos de la matriz.
 3. Se deberían determinar uniones no específicas.

Normalmente, el criterio de aceptación establece ausencia de componentes interferentes si:

- La respuesta de señales interferentes es menor al 20% de la respuesta del analito al LIC, o la respuesta del analito a la concentración del LIC es al menos cinco veces mayor que cualquier interferencia en blancos.
- Las respuestas de señales interferentes son 5% menores a la respuesta de la concentración de estándar interno utilizada en el estudio.

Puede resultar necesario reevaluar este parámetro en algunos casos, como el análisis de muestras de diferentes estadios de una enfermedad o modificaciones del método.

7.4.3 Efecto de la matriz

La confirmación del efecto de la matriz es importante para la validación del método. Se debe evaluar utilizando al menos 6 fuentes individuales de matriz

blanco. Si es difícil conseguir la matriz, se pueden utilizar menos de 6 fuentes realizando una justificación adecuada.

La metodología propuesta por Matuszweski y colaboradores para su determinación consiste en medir la respuesta del analito en 3 tipos diferentes de muestras¹⁸:

- Tipo 1: matriz blanco,
- Tipo 2: matriz blanco extraída de diferentes fuentes y enriquecida con el analito luego de la extracción,
- Tipo 3: matriz blanco extraída de las mismas fuentes y enriquecida con el analito antes de la extracción.

Definen efecto matriz como la relación de la respuesta de muestras Tipo 2 sobre Tipo 1, recuperación, como la relación de la respuesta de muestras Tipo 3 sobre Tipo 2 y eficiencia del proceso, como la relación de la señal del detector para muestras Tipo 3 sobre la señal de Tipo 1.

Esta metodología fue recientemente mejorada por Marchi y colaboradores¹⁹. Sugiere el análisis de una solución suplementaria (Tipo 4) que permite evaluar el rendimiento de extracción, particularmente útil en caso de determinación de analitos múltiples. Se analiza una cuarta muestra:

- Tipo 4: matriz blanco sometida a extracción.

Definen rendimiento de extracción como la relación de la respuesta de muestras Tipo 4 sobre Tipo 1.

Otra alternativa propuesta para evaluar y medir el efecto de la matriz consiste en comparar la variabilidad de las pendientes de curvas de calibración preparadas con matrices de diferentes fuentes²⁰.

Las pautas formuladas por EMA¹⁰ establecen calcular, para cada analito y el estándar interno, el factor de matriz (FM) en cada lote de matriz biológica. Para ello, se calcula la relación entre la respuesta en presencia de matriz (matriz blanco adicionada con analito/estándar interno después de la extracción) y la respuesta en ausencia de matriz (solución pura del analito/estándar interno). Luego, se debe calcular el FM normalizado dividiendo el FM del analito por el FM del estándar interno. El coeficiente de variación del FM normalizado, calculado para las 6 fuentes de matriz, no debe ser superior al 15%. Esta determinación se debe realizar a niveles bajos y altos de concentración.

En caso de que sea necesario administrar a los pacientes o animales una formulación inyectable conteniendo excipientes que se conoce son responsables de efecto de matriz, como polietilenglicol y polisorbato, EMA recomienda evaluar el efecto de matriz empleando una matriz conteniendo dichos excipientes y la matriz blanco. La matriz utilizada para esta determinación se debe obtener de pacientes o animales a los que se les han administrado los excipientes, a menos que se haya demostrado que el excipiente no es metabolizado o transformado *in vivo*. El efecto del excipiente puede ser estudiado mediante la determinación del FM o por dilución de una muestra en estudio de alta concentración con matriz blanco libre del excipiente. Sin embargo, en general, este tipo de investigación no se lleva a cabo ya que se considera innecesaria, pues el impacto, si lo hay, se debe principalmente a la presencia del excipiente y no a su metabolismo o transformación *in vivo*. Además, como diferentes formulaciones podrían ser administradas en varios estudios, se incrementaría el tipo de matrices que deben evaluarse para efecto de la matriz.

En adición, es recomendable estudiar matrices provenientes de poblaciones especiales, como por ejemplo plasma hemolizado o hiperlipidémico. Si se deben analizar muestras de pacientes con fallas hepáticas o renales, se sugiere estudiar el efecto de matriz utilizando matrices obtenidas de dichas poblaciones.

Cuando se utilizan métodos de espectrometría de masas el efecto de la matriz está lejos de ser despreciable. Se recomienda evaluar este efecto durante el desarrollo del método mediante la infusión continua post-columna. Se debe monitorear la disminución o el aumento de la señal del detector cuando eluyen compuestos interferentes de la columna al suprimir o intensificar la ionización, respectivamente^{21,22,23}. Estos resultados orientarán en la selección del procedimiento de preparación y limpieza de la muestra.

7.4.3 Efecto de arrastre

Este efecto consiste en la aparición de la señal correspondiente al analito (o al estándar interno) en muestras blanco, causada por su presencia residual proveniente de muestras analizadas anteriormente. Debido a que el efecto de arrastre puede afectar a la exactitud y a la precisión del método, es importante su investigación durante el desarrollo del método. En caso de detectarse este efecto es necesario tomar medidas para garantizar que sea eliminado o minimizado. También debe ser evaluado durante la validación del método. Con este objetivo se procede al análisis de muestras blanco con posterioridad al de muestras de alta concentración o de

patrones de calibración cuya concentración se encuentre en el límite superior de cuantificación (LSC). El porcentaje de arrastre en las muestras blanco no deberá ser mayor al 20% del LIC para el analito y 5% para el estándar interno¹⁰.

Cuando el efecto de arrastre es inevitable, deben adoptarse procedimientos específicos en la aplicación del método con el objetivo de controlar su efecto.

7.4.4 Exactitud y precisión

Los resultados analíticos en general se pueden ver afectados por la combinación de dos tipos diferentes de errores experimentales: el error sistemático y el error aleatorio. La exactitud describe tanto los errores sistemáticos como aleatorios del método, y se estudia en dos componentes: la veracidad y la precisión¹⁶. Con respecto a este punto es necesario hacer la aclaración de que en muchos casos, como ocurre en las normas de validación de métodos bioanalíticos de FDA y EMA, el término exactitud es empleado para describir sólo los errores sistemáticos del método, y así será utilizado en este capítulo. Los errores aleatorios se asocian con la precisión del método analítico. A continuación se presenta la definición de exactitud y precisión:

- La exactitud (o veracidad) de un método analítico expresa la cercanía entre el valor que es aceptado, ya sea como un valor convencional verdadero o como un valor de referencia aceptado, y el valor obtenido al aplicar el método analítico¹⁰. La exactitud puede informarse como error relativo porcentual (ER%), $[(\text{valor determinado} / \text{valor real}) - 1] \times 100$.
- La precisión de un método analítico está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio y corresponde al grado de concordancia, o grado de dispersión, entre los resultados del ensayo individual, cuando el método se aplica repetidamente a varias alícuotas de una muestra homogénea³. En general, la precisión se expresa como coeficiente de variación [CV, $(\text{desviación estándar} / \text{media}) \times 100$] de una serie de mediciones, también puede expresarse como desviación estándar, varianza o desviación estándar relativa¹⁶.

La diferenciación de los dos tipos de errores es útil cuando se necesitan tomar medidas que permitan corregir el rendimiento durante la etapa de desarrollo del método bioanalítico. Por ejemplo, la precisión se puede mejorar aumentando el número de repeticiones, sin cambiar el procedimiento de análisis. Sin embargo, si el mal rendimiento del método se debe a errores sistemáticos, el método necesita ser revisado para encontrar el origen de estos errores y permitir el mejoramiento

del mismo. Existen numerosas causas que pueden introducir errores sistemáticos a las mediciones, entre las que pueden mencionarse²⁴:

- Errores en la preparación de los patrones de calibración, por ejemplo mediciones erróneas del peso de los patrones de calibración;
- La presencia de moléculas en la muestra que puedan interferir con los reactivos utilizados en el proceso de medición;
- Pérdida del analito durante el proceso de extracción;
- Inestabilidad de la muestra durante el transporte o almacenamiento.

Procedimiento y criterios de aceptación

Las normas internacionales requieren la valoración de la exactitud^{3,10} y la precisión^{3,10} a dos niveles: intra-ensayo, donde se evalúan estos parámetros en una serie analítica, e inter-ensayo, donde se evalúan estos parámetros con el tiempo en diferentes series analíticas y pueden implicar diferentes analistas, equipos, reactivos, y laboratorios¹⁶. En forma general cuando se calculan la exactitud y la precisión a nivel inter-ensayo durante la validación del método, es habitual cambiar el tiempo, algunas veces el operador, raramente el instrumento y excepcionalmente el laboratorio⁴.

Para evaluar la exactitud y la precisión se prepararán muestras enriquecidas con cantidades conocidas de analito en la matriz biológica, denominadas muestras de control de calidad (CC).

Se recomienda utilizar un mínimo de 5 muestras por nivel, en un mínimo de 4 niveles de concentración, que cubran todo el rango de la curva de calibración. Por ejemplo, podemos utilizar las concentraciones correspondientes a: el LIC, tres veces el LIC (CC bajo), cercano al 50% del rango de concentración (CC medio) y como mínimo el 75% del patrón de calibrado de mayor concentración de la curva de calibración (CC alto). Para determinar la exactitud y la precisión inter-ensayo, se deberán realizar tres ensayos, en al menos dos días diferentes.

Las concentraciones de las muestras de CC se analizarán utilizando la curva de calibración.

En lo que respecta al criterio de aceptación, la exactitud (intra e inter-ensayo), expresada como ER%, debe estar comprendida entre el $\pm 15\%$ del valor de la

concentración nominal para las muestras de CC, salvo para el LIC que deberá estar dentro del 20% del valor nominal.

En el caso de la precisión (intra e inter-ensayo) el CV no debe exceder de 15% para las muestras de CC, salvo el LIC que no debe exceder el 20%.

7.4.5 Recuperación

Este parámetro indica la eficiencia en la extracción del analito a partir de la matriz biológica. El conocimiento de la recuperación no es esencial para la validación de un método bioanalítico, pero proporciona información útil sobre la cantidad real de analito que se está analizando. La evaluación de este parámetro en cada etapa del procesamiento de las muestras, en las que puedan producirse pérdidas del analito, proporciona una herramienta útil para mejorar el método, si es necesario.

Procedimiento

Para determinar la recuperación se compara la respuesta del analito y/o estándar interno, extraído de una matriz biológica y la respuesta de la misma cantidad de analito y/o estándar interno sin extraer (recuperación del 100%). En los casos en que la respuesta del analito se vea afectada por la matriz biológica, se considerará como la recuperación del 100%, a la respuesta de un blanco de la matriz biológica extraída, a la que posteriormente se adicione el analito. Para la determinación de este parámetro se recomienda emplear tres concentraciones diferentes del analito (baja, media y alta) dentro del rango de la curva de calibración.

Es importante señalar que no es necesario que la recuperación del analito sea del 100%, mientras que el grado de recuperación del analito y del estándar interno sea uniforme, preciso y reproducible.

El descubrimiento de diferencias significativas en la recuperación entre el analito y el estándar interno, en las diferentes etapas de procesamiento de las muestras, podría implicar un posible fallo del método durante la validación. La selección del estándar interno es una etapa muy importante en el desarrollo de un método bioanalítico, ya que si es bien elegido, las pérdidas que se produzcan durante el procesamiento de las muestras no tendrán ningún impacto en la cuantificación, ya que será similar para el analito y el estándar interno y por lo tanto se anulan entre sí.

7.4.6 Curva de calibración

La curva de calibración para un procedimiento bioanalítico es la relación existente, bajo condiciones específicas, entre los valores de respuesta analítica y los valores conocidos de concentración de analito, denominándose calibración al conjunto de operaciones que establecen dicha relación.

El objetivo de la calibración es el establecimiento de la función de calibración, también llamada función respuesta, $y=f(x)$, en la que y es la respuesta analítica medida (señal, por ejemplo, área bajo la curva, altura del pico, absorción) y x la concentración en estudio, correspondiente a los patrones de calibración. Entre las posibles funciones de calibración, la función $y=mx+b$, correspondiente a la ecuación de una recta (función lineal), será la elegida en lo posible, pero debe tenerse en cuenta que podemos tener funciones respuesta no lineales.

La linealidad se define como la capacidad de un método de producir resultados proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo dado, ya sea directamente o por medio de una transformación matemática definida²⁵.

El método de mínimos cuadrados se aplica con frecuencia para obtener la ecuación de la recta. Este método se basa en determinadas suposiciones. La primera es que hay en realidad una relación lineal entre la respuesta medida y la concentración del analito. Además, supone que los valores de x (concentraciones) tienen una incertidumbre considerablemente menor que los valores del eje y (respuesta analítica). Este supuesto pone de manifiesto la importancia de que las concentraciones de los patrones de calibración se conozcan con la máxima precisión posible. Es necesario considerar que siempre que haya una incertidumbre importante en los datos de concentración, el análisis básico lineal de mínimos cuadrados podría no dar la mejor recta. En tal caso, sería necesario un análisis de correlación complejo.

Otro supuesto que se hace es que la variancia de la variable y es aproximadamente constante u homocedástica. Pero en muchos casos, esto no se cumple y los errores en los valores de la respuesta analítica aumentan con el incremento en la concentración del analito. Cuando existe heterocedasticidad, se utilizará el método de mínimos cuadrados ponderados. Este método se basa en dar más importancia (más peso) a los datos con menor error, frente a los de mayor error.

Finalmente, en los casos en que los datos no se ajusten a un modelo lineal, se deberá recurrir a los métodos de regresión no lineal. Algunos de estos utilizan polinomiales o procedimientos de regresión múltiple.

El ajuste de los datos de una curva de calibración se debe realizar comenzando por la regresión más simple posible. La selección de regresiones más complejas deberá ser justificada adecuadamente^{3,10}.

Resulta relevante destacar que las funciones de calibración se pueden utilizar dentro de un determinado rango de concentraciones. Se define como rango de un procedimiento analítico al intervalo, entre la concentración superior e inferior de analito (incluidas estas concentraciones), para las que se ha demostrado que el procedimiento analítico cumple con los requisitos de precisión, exactitud y función respuesta. En este contexto se define al límite inferior de cuantificación (LIC) y al límite superior de cuantificación (LSC) como la cantidad más baja y más alta, respectivamente, de un analito en una muestra que puede ser determinada cuantitativamente con precisión y exactitud adecuada. Mientras que el Límite de detección (LD) es la mínima concentración de un analito que el procedimiento bioanalítico puede diferenciar del ruido de base de manera confiable³.

El estándar más bajo de la curva de calibración es aceptado como el límite de cuantificación, si se cumplen los siguientes requisitos:

- La respuesta del analito en el LIC debe ser por lo menos 5 veces la señal de una muestra blanco, y
- La precisión y exactitud del límite de cuantificación debe ser inferior al 20 % (CV) y ± 20 % del valor nominal (ER %), respectivamente.

El rango se determinará en base a las concentraciones esperadas en las muestras para las cuales se desarrolló el procedimiento bioanalítico.

Procedimiento y criterios de aceptación

En los métodos bioanalíticos la curva de calibración deberá evaluarse en la matriz biológica para la que se ha desarrollado el método, cubriendo todo el rango de calibración. En el caso de la determinación simultánea de varios analitos, debe haber una curva de calibración para cada analito estudiado.

Para la realización de la curva de calibración se requiere un mínimo de cinco a ocho niveles de concentración, para lo cual se utilizarán patrones de calibración [matrices a las cuales se adiciona concentraciones conocidas del analito y estándar interno (EI)], además de una muestra blanco (matriz procesada sin el EI) y una muestra cero (matriz procesada con el EI). Las muestras blanco y cero no se

utilizan para el cálculo de los parámetros de la curva de calibración, solo se emplean para evaluar la presencia de interferencias.

Durante la validación se deben realizar como mínimo tres curvas de calibrado independientes. Cuando se obtiene una función lineal para la curva de calibración se deben informar los siguientes parámetros: pendiente de la regresión, intercepto y coeficiente de correlación. Además, se informará el error relativo porcentual de cada uno de los patrones de calibración, esto es, la desviación en porcentaje de los valores calculados frente a los teóricos.

La curva de calibración debe cumplir los siguientes criterios para ser aceptada:

- El error relativo porcentual de cada uno de los patrones de calibración no deberá ser superior al 15 % de la concentración nominal, excepto para el LIC, que podrá ser como máximo del 20 %.
- Este criterio deberá cumplirse para al menos el 75 % de los patrones de calibración de cada una de las curvas, con un mínimo de cinco patrones de calibración incluyendo los límites superior e inferior del rango.

7.4.7 Integridad de dilución

Cuando el analito está presente en la muestra a concentraciones superiores al LSC, la muestra debe ser diluida a fin de estar dentro del rango válido de concentración. Se deberá demostrar que esta manipulación adicional de la muestra no afecta la exactitud y la precisión del método.

La metodología propuesta, para demostrar la integridad de la dilución, consiste en adicionar a la matriz biológica blanco una concentración de analito superior a la del LSC y posteriormente, realizar la dilución de esta solución con matriz blanco. Deben realizarse al menos 5 determinaciones por factor de dilución, abarcando el rango de dilución aplicado a las muestras en la utilización de rutina del método.

7.4.8 Estabilidad

Evaluar la estabilidad del analito es un requisito fundamental para obtener un método bioanalítico fiable. Por lo tanto, durante el desarrollo del método es esencial comenzar por investigar la estabilidad del analito. Mediante la evaluación de la estabilidad se debe asegurar que cada etapa, durante la preparación y el

análisis de la muestra, así como las condiciones de almacenamiento, no afectan la concentración de analito. Para ello, cada fase del método analítico, así como las condiciones empleadas en el estudio de estabilidad, deben ser similares a las que se emplearan en el uso de rutina del método. Los estudios deben evaluar la estabilidad durante un período de tiempo igual o superior al que deben permanecer almacenadas las muestras hasta su análisis. No se considera suficiente considerar datos publicados en la literatura, ya que la estabilidad de un fármaco en un fluido biológico es función de las condiciones de almacenamiento, las propiedades químicas del fármaco, la matriz biológica y el sistema contenedor. La estabilidad de un analito, en una matriz biológica y un sistema contenedor particular, sólo es pertinente para dicha matriz y dicho sistema contenedor, y no debe extrapolarse a otras matrices y sistemas contenedores.

Para realizar las determinaciones de estabilidad se debe evaluar al analito en muestras de bajas y altas concentraciones, preparadas a partir de una solución madre fresca del analito en la matriz biológica apropiada, libre de analito e interferencias. Dichas soluciones madres de analito deben ser preparadas en un solvente apropiado, mediante la adición a la matriz blanco del analito a una concentración máxima de 3 veces el LIC y cerca del LSC. Las muestras deben analizarse inmediatamente después de su preparación y luego, después de aplicar las condiciones de almacenamiento que se han de evaluar. Se debe realizar una curva de calibrado con estándares, y analizar las concentraciones obtenidas para las muestras sometidas al estudio mediante comparación con las concentraciones nominales. La concentración media a cada nivel debe estar comprendida dentro del $\pm 15\%$ de la concentración nominal.

Las normas internacionales^{3,10} brindan lineamientos que se toman como base para evaluar la estabilidad del analito en diferentes etapas, abarcando la recolección y manipulación de las muestras. Estas incluyen la evaluación de la estabilidad del analito en la matriz biológica a través de varios ciclos de congelación-descongelación, estabilidad a corto plazo (a temperatura ambiente o a la temperatura de preparación de las muestras), estabilidad a largo plazo (bajo las condiciones de almacenamiento de las muestras hasta su análisis) y la estabilidad de las muestras procesadas (en el muestreador automático). Las condiciones utilizadas en los experimentos de estabilidad deben reflejar las situaciones que puedan presentarse durante la manipulación y el análisis de la muestra en la rutina. El método debe incluir la evaluación de estabilidad del analito en la solución madre.

Se debe evaluar muestras, al menos por triplicado, a 2 niveles de concentración cercanos a los de los controles bajo y alto, considerando las siguientes condiciones:

- Estabilidad luego de ciclos de congelación-descongelación

Se debe determinar la estabilidad del analito después de 3 ciclos de congelación-descongelación. Para ello, se deben almacenar las muestras a la temperatura prevista durante 24 h, luego se permite, sin ayuda, que se descongelen a temperatura ambiente. Cuando se descongelan completamente, las muestras deben ser re-congeladas durante 12 a 24 h bajo las mismas condiciones. El ciclo de congelación-descongelación debe repetirse 2 veces y luego, analizar las muestras en el tercer ciclo. Si el analito es inestable a la temperatura de almacenamiento prevista, las muestras deben congelarse a -70°C durante los 3 ciclos de congelación-descongelación.

- Estabilidad a corto plazo

Para evaluar la estabilidad a corto plazo se deben descongelar a temperatura ambiente tres alícuotas a cada una de las concentraciones bajas y altas, mantenerlas a esta temperatura durante 4 a 24 h (según el tiempo previsto para que las muestras se mantengan a temperatura ambiente en el estudio) y luego, se las debe analizar.

- Estabilidad a largo plazo

En la evaluación de la estabilidad a largo plazo el tiempo de almacenamiento debería exceder el período comprendido entre la recolección de la muestra inicial y el análisis de la última muestra. Se deben almacenar al menos tres alícuotas a cada una de las concentraciones bajas y altas, bajo las mismas condiciones previstas para las muestras en el estudio. El volumen de las muestras debe ser suficiente para permitir realizar 3 veces el análisis.

- Estabilidad de soluciones almacenadas

Se debe evaluar la estabilidad de soluciones madre de fármaco y estándar interno, a temperatura ambiente, al menos durante 6 h. Su estabilidad debe ser documentada si las soluciones son refrigeradas o congeladas durante dicho período de tiempo. Después de transcurrido el tiempo de almacenamiento en cuestión, se debe evaluar la estabilidad mediante comparación de la respuesta con la de soluciones recién preparadas. Se debe realizar una dilución apropiada de la solución madre, considerando la linealidad y el rango de medición del detector.

- Estabilidad de muestras procesadas

Se debe determinar la estabilidad de las muestras procesadas, incluyendo el tiempo que residen en el inyector automático. La estabilidad del fármaco y el estándar interno, en las muestras de validación, debería evaluarse durante el

tiempo de ejecución esperado para el tamaño del lote, mediante la determinación de concentración de estándares de calibración originales. Además, se debe evaluar la reproducibilidad de reinyección, para determinar si una serie de análisis se podría volver a analizar en el caso de fallo del instrumento.

Además, se debe evaluar la reproducibilidad de re-inyección, para determinar si una serie de análisis se podría volver a analizar en el caso de fallo del instrumento. En el caso de muestras de volumen pequeño, para las cuales la re-inyección no sería posible, se puede realizar una comparación entre estándares de calibración frescos y las muestras almacenadas.

Los extractos secos generalmente se reconstituyen en el momento del análisis, por lo que no sería necesario evaluar su estabilidad, a menos que exista un problema potencial de estabilidad por la composición química del analito.

En el caso de estudios de muestras conteniendo analitos múltiples y en estudios específicos de bioequivalencia, se debe prestar atención especial a la estabilidad de los analitos en la matriz biológica conteniendo todos los analitos. Este tratamiento se debe aplicar a la determinación de la estabilidad del analito en la matriz biológica, muestreada directamente del paciente o animal que se somete a la preparación, antes del almacenamiento, para asegurar que las concentraciones obtenidas por el método analítico reflejan las concentraciones del analito en el paciente o animal al momento del muestreo.

Recientemente, fueron recopilados datos cuantitativos, provenientes de numerosos laboratorios de servicios bioanalíticos, sobre la estabilidad de la matriz en presencia de fármacos co-formulados o co-administrados. Todos los datos demostraron que la presencia de fármacos co-formulados o co-administrados no afecta la estabilidad. Por lo tanto, el Consejo Global de la Comunidad Bioanalítica recomienda que la realización adicional de tales experimentos de estabilidad, en la validación de rutina del método bioanalítico, debe limitarse a situaciones en las que el compuesto co-formulado o co-administrado puede afectar la estabilidad debido al proceso de recolección.

La inestabilidad del analito puede producirse por diversas razones:

- a) Evaporación de compuestos volátiles.
- b) Reacción de oxidación con el aire.

- c) Interacción con la superficie del sistema contenedor, como adsorción selectiva, adhesión al vidrio o plástico, lixiviación de contaminantes del vidrio o plástico.
- d) Descomposición fotolítica.
- e) Descomposición térmica.
- f) Actividad catalítica y enzimática.
- g) Reacciones fisicoquímicas con otros componentes de la muestra.

Esta dificultad puede ser minimizada o eliminada mediante:

- a) Disminución de la temperatura de almacenamiento para inhibir reacciones de degradación, tanto químicas como enzimáticas.
- b) Trabajar sobre hielo.
- c) Enfriamiento del automuestreador.
- d) Pre-enfriamiento de viales, tubos y sistemas contenedores.
- e) Conservación de las soluciones y muestras analíticas a -70°C .
- f) Proteger al analito de la luz.
- g) Adición de agentes estabilizantes (antioxidantes o anticoagulantes).
- h) Ajuste del pH para minimizar la hidrólisis.
- i) Adición de inactivadores enzimáticos o inhibidores.
- j) Realización de reacciones de derivatización química para estabilizar el analito.

¹ Shah, P. V., Midha, K. K., Findlay, J. W. A., Hill, H. M., Hulse, J. D., McGilveray, I. J., McKay, G., Miller, K. J., Patnaik, R. N., Powell, M. L., Tonelli, A., Viswanathan, C. T. & Yacobi, A. Bioanalytical Method Validation – A Revisit with a Decade of Progress. *Pharmaceutical Research*, Vol. 17, No. 12, 2000, pp. (1551–1557).

² Shah, P.V., Midha, K.K., Dighe, S., McGilveray, I.J., Skelly, S.P., Yacobi, A., Layloff, T., Viswanathan, C.T., Cook, C.E., McDowall, R.D., Pittman, K.A. & Spector, S. Analytical method validation: bioavailability, bioequivalence and pharmaceutical studies. *Pharmaceutical Research*, Vol. 9, 1992, pp. (588–592).

³ US Department of Health and Human Services, US FDA, Center for Drug Evaluation and Research FDA Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, 2001, Rockville, MD, USA.

⁴ Garofolo, F. Bioanalytical Method Validation, in: Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification, Chan, C., Lam, H., Lee, Y., Zhang, X., 2004, pp. (105-138), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

⁵ Savoie, N., Booth, B.P., Bradley, T., Garofolo, F., Hughes, N.C., Hussain, S., King, S.P., et al.. The 2nd Calibration and Validation Group Workshop on recent issues in Good Laboratory Practice bioanalysis. *Bioanalysis*, Vol. 1, No. 1, 2009, pp. (19-30).

⁶ Savoie N., Garofolo, F., van Amsterdam, P., Booth, B.P., Fast, D.M., Lindsay, M., Lowes, S., Masse, R., Mawer, L., Ormsby, E., Phull, R., Rocci, M.L., Vallano, P.T. & Yin, X. 2009 White Paper on Recent Issues in Regulated Bioanalysis from The 3rd Calibration and Validation Group Workshop. *Bioanalysis*, Vol. 2, No. 1, 2010, pp. (53–68).

⁷ Savoie, N., Garofolo, F., van Amsterdam, P., Bansal, S., Beaver, C., Bedford, P., et al.. 2010 White Paper on Recent Issues in Regulated Bioanalysis & Global Harmonization of Bioanalytical Guidance. *Bioanalysis*, Vol. 2, No. 12, 2010, pp. (1945–1960).

⁸ Garofolo, F., Rocci, M., Dumont, I., Martínez, S., Lowes, S., et al. 2011 White Paper on Recent Issues in Bioanalysis and Regulatory Findings from Audits and Inspections. *Bioanalysis*, Vol. 3, No. 18, 2011, pp. (2081–2096).

⁹ De Silva, B., Garofolo, F., Rocci, M., Martinez, S., Dumont, I., Landry, F., Dicaire, C., Szekely-Klepser, G., Weiner, R., Arnold, M., Bansal, S., Bateman, K., Bauer, R., Booth, B., Davis, S., Duda, S., Gouty, D., Grundy, J., Haidar, S., Hayes, R., Jemal, M., Kaur, S., Kelley, M., Knutsson, M., Le Blaye, O., Lee, J., Lowes, S., Ma, M., Mitsuoka, T., Tavares Neto, J., Nicholson, R., Ormsby, E., Sailstad, J., Stevenson, L., Tang, D., Welink, J., Viswanathan, C., Wang, L., Woolf, E. & Yang, E. 2012 White Paper on Recent Issues in Bioanalysis and Alignment of Multiple Guidelines. *Bioanalysis*, Vol. 4, 2012, pp. (2213-2226).

¹⁰ EMA. Guideline on Bioanalytical Method Validation. EMA, Committee for Medicinal Products for Human Use, 2011, London, UK.

¹¹ Garofolo, F., Michon, J., Leclaire, V., Booth, B., Lowes, S., Viswanathan, C.T., Welink, J. & Desilva, B. Conference Report: US FDA/EMA harmonization of their bioanalytical guidance/guideline and activities of the Global Bioanalytical Consortium. *Bioanalysis*, Vol. 4, No. 3, pp. (231–236).

¹² ISO/IEC 17025, General Requirements for the Compliance of Testing and Calibration Laboratories, 1999.

-
- ¹³ Brooks, M.A. & Weifeld, R.E. A validation process for data from the analysis of drugs in biological fluids. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, Vol. 11, 1985, pp. (1703–1728).
- ¹⁴ Karnes, S.T., Shiu, G. & Shah, V.P. Validation of bioanalytical methods, *Pharmaceutical Research*, Vol. 8, 1991, pp. (421–426).
- ¹⁵ Pachla, L.A., Wright, D.S. & Reynolds, D.L. Bioanalytic considerations for pharmacokinetic and biopharmaceutic studies, *Journal of Clinical Pharmacology*, Vol. 26, 1986, pp. (332–335).
- ¹⁶ Rozet, E., Marini, R.D., Ziemons, E., Boulanger, B. & Hubert, Ph. Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, No. 55, Vol. 4, 2011, pp. (848–858).
- ¹⁷ Ermer, J. Performance Parameters, Calculations and Tests, in: *Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practice*, Ermer, J., McB. Miller, J.H., 2005, pp. (21–194), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, ISBN: 3-527-31255-2, Weinheim.
- ¹⁸ Matuszewski, B.K., Constanzer, M.L. & Chavez-Eng, C.M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC–MS/MS. *Analytical Chemistry*, Vol. 75, 2003, pp. (3019–3030).
- ¹⁹ Marchi, I., Viette, V., Badoud, F., Fathi, M., Saugy, M., Rudaz, S. & Veuthey, J.-L. Characterization and classification of matrix effects in biological samples analyses. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1217, 2010, pp. (4071–4078).
- ²⁰ Matuszewski, B.K. Standard line slopes as a measure of a matrix effect in quantitative HPLC–MS bioanalysis. *Journal of Chromatography B*, Vol. 830, 2006, pp. (293–300).
- ²¹ Dams, R., Huestis, M.A., Lambert, W.E. & Murphy, C.M. Matrix effect in bioanalysis of illicit drugs with LC–MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, Vol. 14, 2003, pp. (1290–1294).
- ²² Mallet, C.R., Lu, Z. & Mazzeo, J.R. A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Vol. 18, 2004, pp. (49–58).
- ²³ Souverain, S., Rudaz, S. & Veuthey, J.L. Matrix effect in LC–ESI–MS and LC–APCI–MS with off-line and on-line extraction procedures. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1058, 2004, pp. (61–66).
- ²⁴ Theodorsson, E. Validation and verification of measurement methods in clinical chemistry. *Bioanalysis*, Vol. 4, No. 3, 2012, pp. (305–320).
- ²⁵ IUPAC Technical Report. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. *Pure and Applied Chemistry*, Vol. 74, 2002, pp. (835–855).