

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Leandro Schiavo Vilhena

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA BIOANALÍTICA POR
LC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE SOFOSBUVIR EM PLASMA HUMANO:
APLICAÇÃO A UM ESTUDO DE FARMACOCINÉTICA NA POPULAÇÃO
BRASILEIRA**

RIO DE JANEIRO

2019

Leandro Schiavo Vilhena

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA BIOANALÍTICA POR
LC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE SOFOSBUVIR EM PLASMA HUMANO:
APLICAÇÃO A UM ESTUDO DE FARMACOCINÉTICA NA POPULAÇÃO
BRASILEIRA

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadores: Dr. Fábio Coelho Amendoeira

Dra. Laís Bastos da Fonseca

Rio de Janeiro

2019

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Vilhena, Leandro Schiavo

Desenvolvimento e validação de metodologia bioanalítica por LC-MS/MS para determinação de sofosbuvir em plasma humano: aplicação a um estudo de farmacocinética na população brasileira. / Leandro Schiavo Vilhena. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2019. 152 f. : fig. ; tab.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

Orientador: Fábio Coelho Amendoeira.
Co-orientador: Laís Bastos da Fonseca.

1. Sofosbuvir. 2. LC-MS/MS. 3. Plasma. 4. Farmacocinética. 5. Hepatite C. I. Título.

Bioanalytical method development and validation of sofosbuvir in human plasma by LC-MS/MS detection: application to a pharmacokinetic study in Brazilians.

Leandro Schiavo Vilhena

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA BIOANALÍTICA POR
LC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE SOFOSBUVIR EM PLASMA HUMANO:
APLICAÇÃO A UM ESTUDO DE FARMACOCINÉTICA NA POPULAÇÃO
BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 26/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Fausto Klabund Ferraris (Doutor)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – Fundação Oswaldo Cruz.

Tailane Sant'Anna Moreira (Doutor)

Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Jorge Carlos Santos da Costa (Doutor)

Presidência - Fundação Oswaldo Cruz.

ORIENTADORES

Fábio Coelho Amendoeira - (Doutor)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – Fundação Oswaldo Cruz.

Laís Bastos da Fonseca - (Doutor)

Serviço de Farmacocinética - Fundação Oswaldo Cruz.

AGRADECIMENTOS

A Deus que guia e ilumina meus caminhos.

A Minha mãe Ione que é um exemplo de garra e superação. Aos meus irmãos Igor, Marina e Silvia que me apoiam incondicionalmente. Minha gratidão eterna. Vocês são fundamentais em minha vida.

Aos meus amigos de infância Kiko, Cuza e Mono. Mesmo distantes se fizeram presentes em minha vida e me ajudaram a tornar os dias mais leves.

A minha amiga Fabiana Almeida, por todo apoio. Sempre muito solícita desde a época em que foi minha orientadora na iniciação científica.

Aos meus amigos Carlos, Emanuel, Fábio, Elias, Pedro (*in memoriam*) por me apoiarem e tornarem meus dias mais divertidos.

Aos meus amigos Marcelo e Cláudio pelo apoio e pela amizade.

Aos meus amigos Wilian, Pedro e Nicolas pela amizade fraterna.

Ao meu amigo e parceiro para todos os momentos Jader, por me dar todo o suporte necessário, pelo carinho e por sempre ter acreditado em mim.

Ao meu orientador Fábio, pelo suporte e confiança, viabilizando o cumprimento dessa importante etapa.

A minha chefe e orientadora Laís, por acreditar em mim desde o início do trabalho e por me apoiar em tudo que foi possível.

Ao meu chefe Douglas, pelo apoio diário e pelo enorme aprendizado durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Renato, pelo apoio e pelas risadas que tornavam os dias no trabalho mais leves.

Ao Gabriel, pelo apoio durante o tratamento e discussão dos resultados.

A toda equipe do SEFAR que foi fundamental nas análises. Em especial, agradeço à Aline, ao João, ao Diego, à Viviane, à Estephane, à Karen, à Letícia e à Joyce.

Aos estagiários Lorenzo e Juliana pelo apoio.

A todos do INCQS e da FIOCRUZ.

GRATIDÃO.

No meio do caminho tinha uma pedra
tinha uma pedra no meio do caminho
tinha uma pedra
no meio do caminho tinha uma pedra.

Nunca me esquecerei desse acontecimento
na vida de minhas retinas tão fatigadas.
Nunca me esquecerei que no meio do caminho
tinha uma pedra
tinha uma pedra no meio do caminho
no meio do caminho tinha uma pedra.

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

A hepatite C é uma doença causada pelo vírus da hepatite C (HCV) e acomete pessoas em todo o mundo. O Relatório Global sobre as Hepatites (2017) publicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), estima que, em 2015, havia 71 milhões portadores de hepatite C crônica. No Brasil, a estimativa é que 1,4 a 1,7 milhões de pessoas são afetadas pelo vírus HCV. A hepatite C e outras hepatites virais constituem um grande problema global de saúde pública e precisam ser erradicadas. Atualmente, não existe vacina para a hepatite C. Logo, a prevenção e o tratamento são importantes ferramentas no combate à doença. Segundo a OMS, apenas 5,5 milhões de pessoas receberam tratamento para a hepatite C e o número de pessoas que receberam tratamento com antivirais de ação direta é ainda menor: apenas meio milhão de pessoas. Estes fármacos de ação direta incluem o sofosbuvir, o ledipasvir, o daclatasvir e outros compostos os quais são melhor tolerados e mais efetivos. Este trabalho objetivou desenvolver e validar uma metodologia bioanalítica para quantificar o sofosbuvir em plasma humano segundo as diretrizes da Resolução RDC nº 27 de 17/maio/2012, o guia de validação de métodos bioanalíticos editado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e aplicar o método a um estudo de farmacocinética na população brasileira. Uma metodologia utilizando a extração líquido-líquido com éter metil terc-butílico/acetato de etila (70:30) v/v foi desenvolvida e empregada para extrair o sofosbuvir e o padrão interno cimetidina da matriz biológica. A análise foi executada utilizando uma coluna Gemini® NX C18 4,6 mm x 50,0 mm, 5µm de tamanho de partícula (Phenomenex®, Torrence, USA). A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma fase móvel composta por (solvente A) 0,1 % ácido fórmico em água e (solvente B) metanol/acetonitrila (80:20) v/v, solvente A/solvente B (30:70) v/v. O tempo de corrida foi de 2,5 min. A detecção ocorreu por espectrometria de massas utilizando a técnica de varredura denominada monitoramento de reações múltiplas (MRM). As transições selecionadas para análise foram m/z 529,9>242,8 para o sofosbuvir e m/z 253,0>116,9 para a cimetidina. A faixa linear de trabalho utilizada neste trabalho foi de 0,50-1000,00 ng/mL de sofosbuvir em plasma. As curvas de calibração foram construídas aplicando-se a regressão linear utilizando o método dos mínimos quadrados com a ponderação de $1/x^2$. Uma vez que o método foi desenvolvido e validado, ele pode ser aplicado no estudo de farmacocinética após a administração oral de 400 mg de sofosbuvir em 69 voluntários.

O sangue foi coletado em 22 tempos de coleta pré-determinados: 0h:00 min, 0h:05 min, 0h:10 min, 0h:15 min, 0h:20 min, 0h:30 min, 0h:40 min, 0h:50 min, 01h:00 min, 01h:15 min, 01h:30 min, 01h:45 min, 02h:00 min, 02h:30 min, 03h:00 min, 03h:30 min, 04h:00 min, 04h:30 min, 05h:00 min, 06h:00 min, 08h:00 min and 10h:00 min. Então, foram obtidos os parâmetros farmacocinéticos do sofosbuvir na população brasileira os quais, para a surpresa dos autores, mostraram grandes diferenças quando comparados a outras populações.

Palavras-chave: Sofosbuvir. LC–MS/MS. Plasma. Farmacocinética. Extração líquido-líquido. Hepatite C. População brasileira.

ABSTRACT

Hepatitis C is a disease caused by the hepatitis C virus (HCV) and affects people all over the world. The World Health Organization (WHO) Global Hepatitis Report (2017) estimates that, in 2015, 71 million people were living with chronic HCV infection. In Brazil, it is estimated that 1.4 to 1.7 million people are affected by the HCV. Therefore, hepatitis C and other viral hepatitis are an important public health problem and it must be eradicated. Nowadays, there is no vaccine for Hepatitis C. Then, the prevention and treatment of this disease has a great importance. According to WHO, only 5.5 million people had received treatment for HCV and the number of persons who had been treated with the new direct-acting antivirals is much smaller: only half a million. These drugs, includes sofosbuvir, ledipasvir, daclatasvir and others and they are better tolerated and more effective drugs. The aim of this work was to develop and validate a method for sofosbuvir quantification in human plasma by LC-MS/MS technique in accordance with Resolution RDC n ° 27 of 17/may/2012, a guideline for bioanalytical methods validation defined by the Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA) and apply the method to a pharmacokinetic study in the Brazilian population. A method using liquid-liquid extraction with methyl tert-butyl ether/ethyl acetate (70:30) (v/v) was developed and employed to extract sofosbuvir and the internal standard cimetidine from the biological matrix. The analysis was accomplished using a Gemini® NX C18 4.6 mm x 50.0 mm, 5µm particle size column (Phenomenex®, Torrence, USA). Chromatographic separation was achieved using a mobile phase composed by (solvent A) 0.1 % formic acid in water and (solvent B) methanol/acetonitrile (80:20) (v/v), solvent A/solvent B (30:70) (v/v). The runtime was 2.5 min. The detection was done by mass spectrometry using multiple reaction monitoring (MRM). The transitions selected were m/z 529.9>242.8 for sofosbuvir and m/z 253.0>116.9 for cimetidine. The linear range of 0.50-1000.00 ng/mL was used in the present work. Calibration curves were constructed by applying least-squares linear regression method with a weighting factor (1/x²). Since the method was developed and validated, it could be applied in the pharmacokinetic study after oral administration of sofosbuvir 400 mg in 69 human volunteers. Blood was collected at 22 specific times: 0h:00 min, 0h:05 min, 0h:10 min, 0h:15 min, 0h:20 min, 0h:30 min, 0h:40 min, 0h:50 min, 01h:00 min, 01h:15 min, 01h:30 min, 01h:45 min, 02h:00 min, 02h:30 min, 03h:00 min, 03h:30 min, 04h:00 min, 04h:30 min, 05h:00 min, 06h:00 min, 08h:00 min and 10h:00 min. Then, it was

obtained pharmacokinetic parameters for the drug in the Brazilian population. To the authors' surprise the pharmacokinetic parameters obtained for the population in the study showed great differences when compared with other populations.

Keywords: Sofosbuvir. LC–MS/MS. Plasma. Pharmacokinetics. Liquid-liquid extraction. Hepatitis C. Brazilian population.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação do HCV	27
Figura 2 - Óbitos por hepatites virais, por vírus e por tipo de complicação	30
Figura 3 - Número de óbitos por hepatites, tuberculose, HIV e malária ao redor do mundo	31
Figura 4 - Fluxograma de diagnóstico laboratorial da infecção pelo Vírus da Hepatite C.....	32
Figura 5 - Estrutura química do Sofosbuvir	37
Figura 6 - Via de biotransformação do sofosbuvir	40
Figura 7 - Estrutura química do metabólito GS-331007	42
Figura 8 – Fatores envolvidos nas diferenças entre raças/etnias na exposição e/ou resposta aos fármacos	44
Figura 9 - Esquema básico de um sistema de cromatografia líquida	47
Figura 10 - Formação do Cone de Taylor na ionização por <i>Electrospray</i>	50
Figura 11 - Analisador do tipo quadrupolo mostrando a trajetória dos íons	51
Figura 12 - Esquema de um instrumento triplo quadrupolo. Q1 e Q3 são separadores de massa e q2 é a câmara de colisão	52
Figura 13 - Fluxograma representando as etapas de extração das amostras	66
Figura 14 – Estrutura química da famotidina.....	87
Figura 15 - Estrutura química da cimetidina.....	88
Figura 16 - Espectro da transição de íons do analito sofosbuvir ($C_{22}H_{29}FN_3O_9P$) em $530,2 > 243,1$	90
Figura 17 - Espectro da transição de íons do padrão interno cimetidina ($C_{10}H_{16}N_6S$) em $253,1 > 117,2$	91
Figura 18 - Cromatogramas obtidos nos testes iniciais de cromatografia. Coluna Gemini C18 de 50 mm de comprimento. Fase móvel B, contendo 100 % de acetonitrila e fase móvel como um todo contendo 50 % de água.....	92
Figura 19 - Cromatogramas obtidos nos testes iniciais de cromatografia. Coluna Omnispher C18 de 150 mm de comprimento. Fase móvel B, contendo 100 % de acetonitrila e fase móvel como um todo contendo 50 % de água	92
Figura 20 - Cromatogramas obtidos nos testes iniciais de cromatografia. Coluna Gemini C18 de 50 mm de comprimento. Fase móvel B, contendo 50 % de metanol e 50 % de acetonitrila e fase móvel como um todo contendo 50 % de água	93

Figura 21 - Cromatogramas obtidos nos testes iniciais de cromatografia. Coluna Gemini C18 de 50 mm de comprimento. Fase móvel B, contendo 80 % de metanol e 20 % de acetonitrila e fase móvel como um todo contendo 30 % de água	94
Figura 22 - Cromatogramas obtidos nos testes de preparo de amostras utilizando acetato de etila como solvente de extração	95
Figura 23 - Cromatogramas obtidos nos testes de preparo de amostras utilizando TBME como solvente de extração.....	96
Figura 24 - Cromatograma referente ao branco de plasma lipêmico e o LIQ em plasma lipêmico no ensaio TSE.....	100
Figura 25 - Cromatograma referente ao branco de plasma hemolisado e o LIQ em plasma hemolisado no ensaio TSE	100
Figura 26 - Cromatograma referente ao branco de plasma normal 01 e o LIQ em plasma normal 01 no ensaio TSE	101
Figura 27 - Cromatograma referente ao branco de plasma normal 02 e o LIQ em plasma normal 02 no ensaio TSE	101
Figura 28 - Cromatograma referente ao branco de plasma normal 03 e o LIQ em plasma normal 03 no ensaio TSE	102
Figura 29 - Cromatograma referente ao branco de plasma normal 04 e o LIQ em plasma normal 04 no ensaio TSE	102
Figura 30 - Cromatograma referente ao branco de plasma lipêmico e o LIQ em plasma lipêmico no ensaio TSEFC.....	105
Figura 31 - Cromatograma referente ao branco de plasma hemolisado e o LIQ em plasma hemolisado no ensaio TSEFC	105
Figura 32 - Cromatograma referente ao branco de plasma normal 01 e o LIQ em plasma normal 01 no ensaio TSEFC	106
Figura 33 - Cromatograma referente ao branco de plasma normal 02 e o LIQ em plasma normal 02 no ensaio TSEFC	106
Figura 34 - Cromatograma referente ao branco de plasma normal 03 e o LIQ em plasma normal 03 no ensaio TSEFC	107
Figura 35 - Cromatograma referente ao branco de plasma normal 04 e o LIQ em plasma normal 04 no ensaio TSEFC	107
Figura 36 - Cromatograma referente ao branco de plasma normal previamente à injeção de LIQ e LSQ	112
Figura 37 - Cromatograma referente ao LIQ em plasma normal.....	113

Figura 38 - Cromatograma referente ao LSQ em plasma normal	113
Figura 39 - Cromatograma referente à primeira injeção de branco de plasma normal após a injeção de LIQ e LSQ	113
Figura 40 - Cromatograma referente à segunda injeção branco de plasma normal após a injeção de LIQ e LSQ	114
Figura 41 - Variância em função da concentração	117
Figura 42 - Gráfico do erro relativo percentual dos resíduos (ER %) sem ponderação (None)	118
Figura 43 - Gráfico do erro relativo percentual dos resíduos (ER %) com ponderação $\ln y$	119
Figura 44 - Gráfico do erro relativo percentual dos resíduos (ER %) com ponderação $\ln x$	119
Figura 45 - Gráfico do erro relativo percentual dos resíduos (ER %) com ponderação $1/y$	120
Figura 46 - Gráfico do erro relativo percentual dos resíduos (ER %) com ponderação $1/y^2$	120
Figura 47 - Gráfico do erro relativo percentual dos resíduos (ER %) com ponderação $1/x$	121
Figura 48 - Gráfico do erro relativo percentual dos resíduos (ER %) com ponderação $1/x^2$	121
Figura 49 - Curva de calibração 01 - ponderação $1/x^2$	126
Figura 50 - Curva de calibração 02 - ponderação $1/x^2$	127
Figura 51 - Curva de calibração 03 - ponderação $1/x^2$	127
Figura 52 - Curva de concentração plasmática média de sofosbuvir em função do tempo após administração oral de 400 mg de sofosbuvir	144

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros farmacocinéticos do sofosbuvir e do metabólito GS-331007 após a administração oral, em jejum, de 400 mg de sofosbuvir (medicamento de referência)	39
Tabela 2 - Análise de sofosbuvir segundo diferentes autores	46
Tabela 3 - Guia de preparo das soluções de sofosbuvir	60
Tabela 4 - Guia de preparo das soluções de cimetidina	60
Tabela 5 - Guia de preparo das soluções mix de fármacos concomitantes	62
Tabela 6 - Guia de preparo da curva de calibração em matriz biológica (CCAL)	63
Tabela 7 - Guia de preparo dos controles de qualidade em matriz biológica	63
Tabela 8 – Guia de preparo das amostras em matriz biológica para os testes com fármacos concomitantes/interferentes.....	64
Tabela 9 - Dados da população	78
Tabela 10 - Condições do Espectrômetro de massas - parâmetros individuais dos íons monitorados em MRM no modo positivo definidos após a realização da infusão	89
Tabela 11 - Condições do Espectrômetro de massas – parâmetros dependentes da fonte de ionização definidos após a realização do FIA	90
Tabela 12 - Relação de colunas cromatográficas testadas durante o desenvolvimento do método bioanalítico	91
Tabela 13 – Condições estabelecidas para a determinação de sofosbuvir em plasma humano	97
Tabela 14 - Resultados obtidos no teste de seletividade	99
Tabela 15 - Resultados obtidos no teste de seletividade contendo fármacos concomitantes/interferentes	104
Tabela 16 - Área do sofosbuvir, área do padrão interno e resposta para as amostras preparadas em matriz – ensaio TEM	108
Tabela 17 - Área do sofosbuvir, área do padrão interno, resposta e média das respostas para as amostras preparadas em solução - ensaio TEM.....	109
Tabela 18 - Cálculo do FMN para cada amostra, média e CV para cada nível de concentração - ensaio TEM.....	109
Tabela 19 - Área do sofosbuvir, área do padrão interno e resposta para as amostras preparadas em matriz - ensaio TEMFC	110

Tabela 20 - Área do sofosbuvir, área do padrão interno, resposta e média das respostas para as amostras preparadas em solução - ensaio TEMFC.....	111
Tabela 21 - Cálculo do FMN para cada amostra, média e CV para cada nível de concentração - ensaio TEMFC.....	111
Tabela 22 - Resultados do Teste de efeito residual - Percentual de interferência da amostra TER0056 (limite superior de quantificação) nas injeções subsequentes TER0057 (branco) e TER0058 (branco)	112
Tabela 23 – Resposta (área do analito/área do padrão interno) de cada observação e o valor-p	115
Tabela 24 – Resultado de três curvas de calibração em duplicata (n=6) e a variância para cada nível de concentração	116
Tabela 25 - Teste-F: duas amostras para variâncias	118
Tabela 26 – Escolha da ponderação – Cálculo do erro residual relativo (ER %)(continua).....	123
Tabela 27 – Escolha da ponderação – Cálculo do erro residual relativo (ER %) (conclusão).....	124
Tabela 28 - Escolha da ponderação – Somatório do erro residual relativo (ER %).125	
Tabela 29 - Resultados da avaliação da linearidade.....	126
Tabela 30 - Resultados dos controles de qualidade empregados no teste de precisão e exatidão 01	129
Tabela 31 - Resultados dos controles de qualidade empregados no teste de precisão e exatidão 02.....	130
Tabela 32 - Resultados dos controles de qualidade empregados no teste de precisão e exatidão 03.....	131
Tabela 33 - Resultados do Teste de precisão e exatidão interdias	132
Tabela 34 - Resultados dos controles de qualidade empregados no teste de quantificação inicial - TQI	133
Tabela 35 - Resultados dos controles de qualidade empregados no teste de estabilidade de curta duração	134
Tabela 36 - Resultados dos controles de qualidade empregados no teste de estabilidade de pós-processamento - TEBPP	135
Tabela 37 - Registros de data, hora e temperatura dos ciclos de congelamento e descongelamento - TEBCCD	136

Tabela 38 - Resultados dos controles de qualidade empregados no teste de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento - TEBCCD	136
Tabela 39 - Resultados dos controles de qualidade empregados no teste de estabilidade de longa duração - TEBLD	137
Tabela 40 – Estabilidade do analito em matriz biológica.....	138
Tabela 41 - Resultados do teste de estabilidade de curta duração das soluções de trabalho – valores de área do analito e padrão interno - TEBCCDS.....	139
Tabela 42 - Resultados do teste de estabilidade das soluções de trabalho armazenadas – valores de área do analito e padrão interno - TEBSTA	140
Tabela 43 - Resultados dos testes de estabilidade em solução.....	140
Tabela 44 - Parâmetros farmacocinéticos médios (desvio padrão) após a administração oral de 400 mg de sofosbuvir	142
Tabela 45 – Regime de administração, tempos de coleta, nome / lote do medicamento e observações	143
Tabela 46 - Diferença, em percentual, entre os parâmetros farmacocinéticos de estudos da literatura e o presente estudo (considerado o referencial).....	146

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

4-MAA	4-N-metilaminoantipirina (principal metabólito da dipirona)
ANL	Analito
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização Química à Pressão Atmosférica
API	Ionização à pressão atmosférica
API	Ionização sob Pressão Atmosférica
APPI	Ionização por Fótons à Pressão Atmosférica
ASC _{0-∞}	Area sob a curva do tempo zero ao infinito
BCRP	Proteína de resistência ao câncer de mama
BM	Bolsa de matriz biológica
BPH	Branco de plasma hemolisado
BPL	Branco de plasma lipêmico
BPL	Boas Práticas de laboratório
BPN	Branco de plasma normal
BPZ	Branco de plasma normal adicionado do padrão interno (amostra zero)
CAD	Dissociação ativada por colisão
CAD gas	Gás de dissociação
CAF	Cafeína
Carboxilesterase 1	CES1
CatA	Catepsina A
CCAL	Curva de calibração em matriz biológica
CD81	Molécula <i>cluster</i> de diferenciação 81
CE	<i>Collision Energy</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CID	Dissociação induzida por colisão
CID gas	Gas de dissociação
C _{max}	Concentração plasmática máxima
CNS	Conselho nacional de saúde
CQ	Controle de qualidade
CQA	Controle de qualidade alto

CQA-FD	Controle de qualidade alto fortificado depois
CQB	Controle de qualidade baixo
CQB-FD	Controle de qualidade baixo fortificado depois
CQC	Controle de qualidade de concentração intermediária
CQD	Controle de qualidade de diluição
CHIKV	Vírus da Chikungunya
CQM	Controle de qualidade média concentração
Ct	Última concentração determinada experimentalmente
CUR gas	Cortina de Gas
CV	Coeficiente de variação
CXP	<i>Collision Cell Exit Potential</i>
CYP	Enzimas do Citocromo P-450
CYP3A4	Enzimas do Citocromo P4503A4
DAA	Antiviral de ação direta
DAD	Arranjo de fotodiodos
DENV	Vírus da dengue
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	<i>Declustering Potential</i>
Dwell time	Tempo de aquisição de sinal
ELL	Extração líquido-líquido
EP	<i>Entrance Potential</i>
EPR	Erro padrão relativo (desvio em relação à concentração nominal)
ER%	Erro relativo percentual dos resíduos
ESI	Ionização por <i>electrospray</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIA	<i>Flow injection analysis</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FMA	Fase móvel A (aquosa)
FMB	Fase móvel B (orgânica)
FMNA	Fator de matriz normalizado
GS1 gas	Gás da fonte 1
GS2 gas	Gás da fonte 2

GS-331007	Metabólito inativo do sofosbuvir
GS-461203	Metabólito ativo do sofosbuvir
GS-566500	Metabólito intermediário do sofosbuvir
GTP	Nucleotídeo de guanina
H0	Hipótese nula do teste de hipóteses
H1	Hipótese alternativa do teste de hipóteses
HAV	Vírus da hepatite A
HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
HDV	Vírus da hepatite D
HEV	Vírus da hepatite E
HINT1	Proteína ligante de nucleotídeo tríade de histidina 1
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ICH	Conselho Internacional de Harmonização
IL28B	Interleucina 28B
IMC	Índice de massa corporal
INF	Interferon
INF- α	Interferon alfa
INF-PEG	Interferon peguilado
IS	<i>Ionspray Voltage</i>
ISO	Organização Internacional de Normalização
K _e	Constante de eliminação do fármaco
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem
LDLR	Receptor de lipoproteína de baixa densidade
LIQ	Limite inferior de quantificação
LSQ	Limite superior de quantificação
MB	Matriz biológica
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas
MTC	Metoclopramida

NDPK	Nucleosídeo difosfato quinase
NIC	Nicotina
NPC1L1	<i>Receptor Niemann-Pick C1-like 1</i>
NS3	Proteína não estrutural do HCV com função de protease
NS5B	RNA polimerase do HCV
NS	Proteína não estrutural do HCV
OMS	Organização Mundial da Saúde
PEG	Polietilenoglicol
PCDT	Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas
PCT	Paracetamol
PDP	Parceria de Desenvolvimento Produtivo
P-gp	Glicoproteína P
PI	Padrão interno
r	Coefficiente de correlação
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
RVS	Resposta virológica sustentada
SCB	Sistema de classificação biofarmacêutica
SCQ	Substância química de referência caracterizada
SD	Solução de diluição da amostra (solução de ressuspensão)
SE	Solução de extração (solvente de extração)
SEFAR	Serviço de Equivalência e Farmacocinética da Fundação Oswaldo Cruz
SGB	Síndrome de Guillain–Barré
SIM	Monitoramento seletivo de íons
SL	Solução de lavagem do sistema cromatográfico
SME	Solução mestre/solução estoque
SQF	Substância química de referência farmacopeica
SR	Solução de diluição da amostra (solução de ressuspensão)
STB	Solução de trabalho

STB-MIX	Solução contendo as substâncias interferentes/concomitantes
STB-PI	Solução de trabalho do padrão interno
SUS	Sistema único de saúde
$T_{1/2\beta}$	Tempo de meia vida de eliminação
TBME	Eter etil-terc-butílico
TCLE	Termo de Consentimento livre e Esclarecido
TDMB	Teste de diluição em matriz biológica
TEBCCD	Teste de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento
TEBCD	Teste de estabilidade de curta duração
TEBCDS	Teste de estabilidade de curta duração das soluções de trabalho
TEBLD	Teste de estabilidade de longa duração
TEBPP	Teste de estabilidade de pós-processamento
TEBSTA	Teste de estabilidade das soluções de trabalho armazenadas
TEM	Teste de efeito de matriz
TEM	Temperatura da fonte do espectrômetro de massas
TEMFC	Teste de efeito de matriz contendo fármacos concomitantes/interferentes
TER	Teste de efeito residual
T_{max}	Tempo em que se observa a concentração plasmática máxima
TOFMS	Espectrometria de massas por tempo de voo
TQI	Teste de Quantificação Inicial
TSE	Teste de seletividade
TSEFC	Teste de seletividade contendo fármacos concomitantes/interferentes
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência
UMP-CMPK	Uridina monofosfato/citidina monofosfato quinase
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Ultra violeta

UV-VIS

Ultra violeta/visível

WHO

World Health Organization

YFV

Vírus da Febre amarela

ZIKV

Vírus da Zika

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	O vírus da hepatite C - virologia	27
1.2	O vírus da hepatite C - epidemiologia	29
1.3	O vírus da hepatite C - diagnóstico laboratorial	31
1.4	O vírus da hepatite C - tratamento	33
1.4.1	Monoterapia com Interferon (INF)	33
1.4.2	Terapia dupla - Interferon associado à ribavirina (INF-Ribavirina)	34
1.4.3	Terapia tripla – Associação de Interferon, ribavirina e os antivirais de ação direta (DAA) de primeira geração Boceprevir ou Telaprevir	35
1.4.4	Novos protocolos de tratamento - regimes isentos/livres de interferon: novos DAA.....	36
1.4.4.1	<i>Sofosbuvir – Características gerais</i>	37
1.4.4.2	<i>Sofosbuvir - Farmacocinética</i>	38
1.4.5	Variabilidade na resposta ao tratamento para hepatite C	42
1.5	Metodologia bioanalítica para análise de sofosbuvir	44
1.5.1	Cromatografia líquida de alta eficiência	47
1.5.2	Espectrometria de massas	48
1.5.3	Desenvolvimento de metodologia	52
1.5.4	Validação	53
2	OBJETIVOS	54
2.1	Objetivo geral	54
2.2	Objetivos específicos	54
3	METODOLOGIA	55
3.1	Materiais	55
3.1.1	Uso geral.....	55
3.1.2	Análise e identificação.....	55
3.2	Equipamentos e instrumentos	55
3.2.1	Uso geral.....	55
3.2.2	Análise	56
3.3	Padrões, medicamento, reagentes e solventes	56
3.3.1	Padrões analíticos.....	56
3.3.2	Medicamento utilizado no ensaio farmacocinético	57

3.3.3	Reagentes e Solventes	57
3.4	Ensaio preliminares	57
3.4.1	Otimização dos parâmetros no espectrômetro de massas	57
3.4.2	Preparo das soluções mestre e das soluções de trabalho	59
3.4.2.1	<i>Preparo das Soluções Mestre e das Soluções de trabalho do analito sofosbuvir</i>	<i>59</i>
3.4.2.2	<i>Preparo das Soluções Mestre e da Solução de trabalho do padrão interno</i>	<i>60</i>
3.4.2.3	<i>Preparo das Soluções Mestre e das Soluções de trabalho das substâncias interferentes (nicotina e cafeína) / fármacos concomitantes.....</i>	<i>61</i>
3.4.3	Confecção das amostras em matriz biológica.....	62
3.4.3.1	<i>Curva de calibração e controles de qualidade para uso geral</i>	<i>62</i>
3.4.3.2	<i>Amostras para uso no ensaio de avaliação da seletividade e efeito de matriz contendo fármacos concomitantes/substâncias interferentes</i>	<i>63</i>
3.4.4	Preparo de soluções adicionais	64
3.4.4.1	<i>Preparo de fase móvel (FMA e FMB)</i>	<i>64</i>
3.4.4.2	<i>Solução de lavagem (SL)</i>	<i>65</i>
3.4.4.3	<i>Solução de extração (SE).....</i>	<i>65</i>
3.4.4.4	<i>Solução de ressuspensão (SD ou SR)</i>	<i>65</i>
3.4.5	Fluxograma de preparo/extração das amostras em matriz biológica	66
3.5	Validação da metodologia bioanalítica	67
3.5.1	Teste de seletividade – TSE	67
3.5.2	Teste de seletividade contendo fármacos concomitantes/interferentes – TSEFC	68
3.5.3	Teste de efeito de matriz – TEM	69
3.5.4	Teste de efeito de matriz contendo fármacos concomitantes/interferentes – TEMFC.....	70
3.5.5	Teste de efeito residual – TER.....	70
3.5.6	Linearidade – Avaliação da curva de calibração e escolha do método de ponderação – CCAL.....	71
3.5.7	Teste de precisão e exatidão – TPE	72
3.5.8	Estabilidade em matriz biológica.....	73
3.5.8.1	<i>Teste de Quantificação Inicial – TQI.....</i>	<i>74</i>
3.5.8.2	<i>Teste de estabilidade de curta duração – TEBCD.....</i>	<i>74</i>

3.5.8.3	Teste de estabilidade de pós-processamento - TEBPP	74
3.5.8.4	Teste de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento – TEBCCD.....	75
3.5.8.5	Teste de estabilidade de longa duração – TEBLD	75
3.5.9	Estabilidade em solução	76
3.5.9.1	Teste de estabilidade de curta duração das soluções de trabalho – TEBDCS 76	
3.5.9.2	Teste de estabilidade das soluções de trabalho armazenadas – TEBSTA	77
3.6	Ensaio farmacocinético	77
3.6.1	Desenho do estudo	78
3.6.1.1	Dados da população (sujeitos participantes da pesquisa).....	78
3.6.1.2	Critérios de inclusão na pesquisa.....	79
3.6.1.3	Critérios de exclusão na pesquisa.....	80
3.6.1.4	Alimentação durante o confinamento	81
3.6.1.5	Ingestão de líquidos durante o confinamento	82
3.6.2	Coleta de matriz biológica (MB) branca	82
3.6.3	Coleta das amostras em tempos pré-estabelecidos.....	83
3.6.4	Acondicionamento e transporte das amostras	83
3.6.5	Análise das amostras dos voluntários em lotes	83
3.6.6	Determinação dos parâmetros farmacocinéticos	84
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
4.1	Desenvolvimento de metodologia bioanalítica.....	86
4.1.1	Otimização dos parâmetros no espectrômetro de massas	89
4.1.2	Otimização dos parâmetros cromatográficos	91
4.1.3	Otimização do preparo de amostras	94
4.1.4	Condições analíticas – Condições do Espectrômetro de massas, do sistema de cromatografia líquida e preparo de amostras	96
4.2	Validação da metodologia bioanalítica	97
4.2.1	Teste de seletividade – TSE	98
4.2.2	Teste de seletividade contendo fármacos concomitantes/interferentes – TSEFC	103
4.2.3	Teste de efeito de matriz – TEM	108
4.2.4	Teste de efeito de matriz contendo fármacos concomitantes/interferentes – TEMFC.....	110

4.2.5	Teste de efeito residual – TER.....	112
4.2.6	Linearidade – Avaliação da curva de calibração e escolha do método de ponderação – CCAL.....	114
4.2.7	Teste de precisão e exatidão – TPE	128
4.2.8	Estabilidade em matriz biológica	132
4.2.8.1	<i>Teste de Quantificação Inicial – TQI.....</i>	133
4.2.8.2	<i>Teste de estabilidade de curta duração – TEBCD.....</i>	133
4.2.8.3	<i>Teste de estabilidade de pós-processamento – TEBPP.....</i>	134
4.2.8.4	<i>Teste de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento – TEBCCD.....</i>	135
4.2.8.5	<i>Teste de estabilidade de longa duração – TEBLD</i>	137
4.2.8.6	<i>Testes de estabilidade em matriz biológica – Conclusão</i>	138
4.2.9	Estabilidade em solução	138
4.2.9.1	<i>Teste de estabilidade de curta duração das soluções de trabalho – TEBCDS</i> <i>139</i>	
4.2.9.2	<i>Teste de estabilidade das soluções de trabalho armazenadas – TEBSTA</i> <i>139</i>	
4.2.9.3	<i>Testes de estabilidade em solução – Conclusão.....</i>	140
4.3	Ensaio farmacocinético	141
5	CONCLUSÃO	147
	REFERÊNCIAS.....	149

1 INTRODUÇÃO

A hepatite C é um problema de saúde de grande relevância nacional e internacional, atingindo 71 milhões de pessoas ao redor do mundo e 1,4 milhões de pessoas no Brasil (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017; BRASIL, 2017a). Trata-se de uma doença causada por um microorganismo elucidado em 1989 o qual foi denominado de vírus da hepatite C (HCV). Sua ação vem ocasionando, devido às complicações como cirrose e carcinoma hepático, um significativo aumento no número de óbitos desde o ano 2000, conforme relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017).

Segundo estimativas da OMS (2017), o número de mortes anual por hepatites virais é de 1,34 milhões de pessoas, sendo 30 % desse montante correspondentes aos óbitos por HCV, o que corresponde a 400 mil pessoas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017). Dessa maneira, é forçoso o desenvolvimento de recursos terapêuticos como vacinas e de medicamentos que sejam eficazes na erradicação do vírus, resultando na cura do paciente.

Embora as vacinas ainda não estejam disponíveis, novos tratamentos foram, há pouco tempo, incluídos na prática clínica graças aos resultados de pesquisas, que conduziram ao desenvolvimento dos mais modernos antivirais de ação direta como o sofosbuvir, ledipasvir e o daclatasvir. Esses fármacos foram responsáveis pela redução no tempo de tratamento, pela maior facilidade posológica, pela menor incidências de efeitos adversos e pelo expressivo aumento na taxa de cura quando comparados aos esquemas de tratamentos convencionais (WEBSTER; KLENERMAN; DUSHEIKO, 2016; ECHEVERRIA *et al.*, 2015).

Segundo Ramamoorthy e colaboradores (2015), aproximadamente 20 % dos novos fármacos aprovados nos últimos seis anos revelaram diferenças na exposição ou resposta entre as raças/etnias, o que gerou, em alguns casos, uma prescrição diferenciada para determinado grupo. Para o tratamento da hepatite C, por exemplo, os pesquisadores verificaram que os indivíduos de origem africana apresentam menor taxa de cura quando comparados ao europeu e/ou asiático, mesmo utilizando as terapias mais novas como o sofosbuvir.

Além da atividade contra o vírus da hepatite C, pesquisas recentes mostraram a efetividade do sofosbuvir no combate a agentes envolvidos em doenças como as causadas pelo Vírus da Zika (ZIKV), vírus da Dengue (DENV), o vírus da Chikungunya

(CHIKV) e o vírus da Febre amarela (YFV). Essas enfermidades, cujos tratamentos não estão disponíveis até o momento, vêm ganhando grande destaque em função do aumento do número de casos no país. Vale ressaltar que a Febre amarela apresenta uma alta taxa de mortalidade e que a Zika está relacionada à Síndrome de Guillain-Barré (SGB) e à microcefalia. Assim, é indispensável o rápido desenvolvimento de recursos terapêuticos no combate a essas relevantes moléstias (SOUZA *et al.*, 2017a; SOUZA *et al.*, 2017b; XU *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2019a; SOUZA *et al.*, 2019b).

Diante do exposto, a presente pesquisa teve como objetivo desenvolver e validar uma metodologia bioanalítica para determinar os níveis de sofosbuvir em plasma humano a partir da administração oral, em jejum, de um comprimido de 400 mg da formulação de referência contendo o fármaco. Foram analisadas amostras de plasma dos participantes de um ensaio clínico, possibilitando determinar os parâmetros farmacocinéticos do sofosbuvir na população brasileira. Os resultados obtidos foram contrapostos aos dados da literatura, pontuando-se as diferenças entre as populações/etnias.

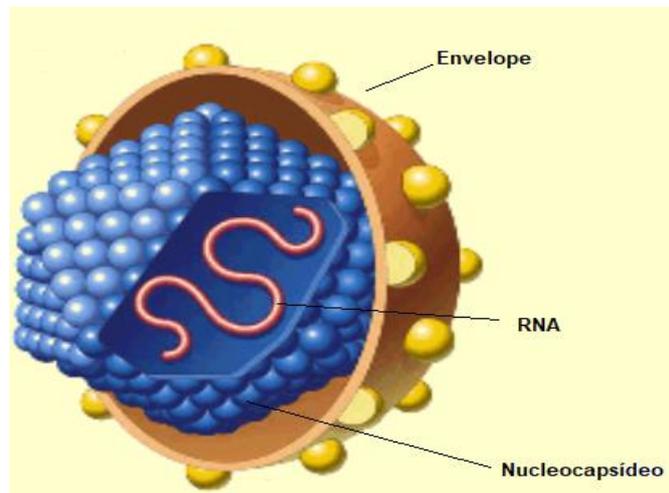
Outro ponto que merece destaque é que os resultados da presente pesquisa levaram ao questionamento quanto à certificação de Centros de Bioequivalência internacionais, como na Europa, Estados Unidos, América Latina e Índia. Tendo em vista as referidas certificações, é permitida a realização de Estudos de Bioequivalência com a participação de voluntários de outras etnias. Ocorre que essas populações normalmente apresentam diferentes hábitos alimentares, bem como, composição genética diversa da população brasileira. Dessa maneira, verifica-se que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) poderá eventualmente autorizar o uso de determinado medicamento no Brasil, genérico ou similar, fundamentada em parâmetros farmacocinéticos de outras etnias. Nesse sentido, uma vez que a agência não dispõe de dados reais, ou seja, dados da farmacocinética do medicamento em brasileiros, poderão surgir casos inesperados de toxicidade ou perda de eficácia.

Portanto, a realização de um ensaio avaliando a farmacocinética do sofosbuvir em voluntários brasileiros – um medicamento de grande importância para o Sistema Único de Saúde - contribuiu para a elucidação de importantes parâmetros do fármaco no Brasil, que até aqui encontravam-se desconhecidos.

1.1 O vírus da hepatite C - virologia

O HCV é um vírus, membro da família *Flaviviridae* e do gênero *Hepacivirus*, cujo material genético é formado por ácido ribonucleico (RNA). Seu genoma apresenta 9600 nucleotídeos¹ em fita simples e de polaridade positiva². Possui aproximadamente 50 nm de diâmetro e é composto por três elementos: o envelope, que é formado por uma bicamada lipídica na qual estão ancoradas as proteínas E1 e E2; o nucleocapsídeo, que é formado por múltiplas unidades de proteínas core (C) situadas abaixo do envelope e pelo material genético de RNA que é envolvido pelo nucleocapsídeo, conforme Figura 1 (JIMÉNEZ-PÉREZ *et al.*, 2016).

Figura 1 - Representação do HCV



Fonte: (HEPCENTRO, 2019).

O material genético do HCV é responsável por codificar uma única poliproteína de 3011 aminoácidos a qual é clivada por proteases, formando proteínas estruturais e não estruturais (NS), sendo um total de 10 proteínas. Cada uma dessas moléculas possui diferentes funções no processo replicativo ou de montagem da partícula viral. Três são proteínas estruturais, originadas pela clivagem causada por proteases do hospedeiro: proteínas do Core (C), envelope 1 (E1) e envelope 2 (E2) e sete proteínas

¹ Nucleotídeos são as unidades básicas formadoras do DNA ou do RNA. Cada nucleotídeo é formado por: um carboidrato (pentose: ribose ou desoxirribose), um grupo fosfato e uma base nitrogenada (purinas: Adenina, Guanina; Pirimidinas: Citosina, Timina e Uracila). No DNA, existem nucleotídeos de Adenina, Guanina, Citosina e Timina. No RNA, existem nucleotídeos de Adenina, Guanina, Citosina e Uracila (PIERCE, 2016).

² O HCV, por ser um vírus de RNA de polaridade positiva, apresenta o material genético infectante capaz de atuar como RNA mensageiro para a síntese de proteínas (TAN, 2006).

não estruturais, originadas pela clivagem causada por proteases virais: p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B, envolvidas na replicação viral (WEBSTER; KLENERMAN; DUSHEIKO, 2016)

As proteínas C formam o nucleocapsídeo e são responsáveis por encapsular o genoma viral. As proteínas E1 e E2 são glicoproteínas do envelope que se ligam a receptores da célula hospedeira. A proteína p7 forma um canal iônico denominado viroporina que, por permitir o fluxo de prótons, tem a função de proteger a partícula viral de acidificação durante o processo de maturação. As proteínas NS2, NS3 e NS4A são proteases virais enquanto a NS4B, juntamente com uma região da NS3, apresentam a função de helicase³. A proteína NS5A é essencial no processo replicativo do vírus por estar envolvida na regulação da replicação do genoma viral. Já a NS5B é a RNA polimerase viral (KHACHATOORIAN; FRENCH, 2016).

O vírus da hepatite C é hepatotrópico e infecta as células do fígado ligando-se, inicialmente, a receptores nas superfícies dessas células. Essa interação é mediada pela ligação entre as glicoproteínas E1 e E2 a receptores da superfície do hepatócito. A célula hepática apresenta os seguintes receptores que interagem com o HCV: receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDLR), glicosaminoglicanas, a molécula cluster de diferenciação 81 (CD81), o receptor scavenger B1, a claudina 1, a ocludina e o receptor Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1). Após a ligação à célula hospedeira, o vírus é internalizado e seu material genético é liberado no citoplasma do hepatócito. Ocorrerá a tradução⁴ deste material gerando uma poliproteína cuja clivagem por proteases virais e proteases do hospedeiro, irá formar as proteínas virais mencionadas anteriormente: as proteínas estruturais e não estruturais do HCV. A proteína NS5B formada, uma RNA polimerase, é responsável pela replicação do genoma viral. Uma vez ocorrida a tradução e a replicação do genoma viral, formam-se novos vírions que poderão atingir o meio extracelular e assim alcançar corrente sanguínea (KHACHATOORIAN; FRENCH, 2016).

³ As helicase do HCV é uma enzima que atua promovendo o desenrolamento do material genético, que é uma etapa imprescindível para a ocorrência da replicação viral (TAN, 2006).

⁴ O processo por meio do qual ocorre a leitura do material genético contido no RNA mensageiro é denominado de tradução cujo resultado é a síntese de proteína (PIERCE, 2016).

1.2 O vírus da hepatite C - epidemiologia

A hepatite viral C constitui um importante problema de saúde em todo o mundo, sendo estimado que 1 % da população mundial esteja infectada pelo vírus HCV, ou seja, 71 milhões de pessoas afetadas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017). No Brasil, a estimativa é que exista de 1,4 a 1,7 milhões de infectados pelo HCV (BRASIL, 2017a).

O HCV evoluiu a sete linhagens genéticas (genótipos 1 a 7), as quais se diferenciam em subtipos como 1a, 1b e 3a, contemplando mais de sessenta e sete subtipos. Essa alta variabilidade é responsável por diferentes formas de evolução e agressividade da doença e também por diferentes respostas aos tratamentos (ECHEVERRIA et al., 2015).

A principal forma de transmissão é através de contato direto ou indireto com sangue contaminado, por meio de transfusões, compartilhamento de seringas no uso de drogas intravenosas, uso de material cirúrgico mal esterilizado, transplante de órgãos, transmissão vertical da mãe para o filho, entre outros (ECHEVERRIA et al., 2015).

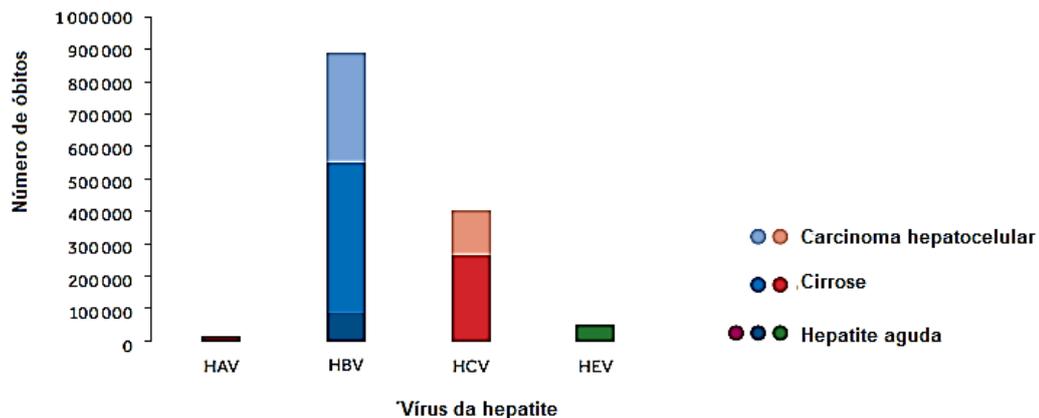
No Brasil, por meio de um estudo de soroprevalência, a ocorrência da hepatite C foi estimada em 1,38 %, o que significa a ocorrência de 1380 infectados a cada 100000 habitantes (CHERCHIGLIA et al., 2016). A maioria das pessoas acometidas desconhece o diagnóstico, pois a doença apresenta sintomas muito brandos ou mesmo nem os apresenta (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE INFECTOLOGIA, 2016). Esse fato é agravado pela existência de pessoas que são portadoras do vírus HCV e do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) simultaneamente, o que não é raro, pois compartilham as mesmas formas de transmissão. No Brasil, a estimativa é que 18,9 % dos soropositivos também estejam infectados com o vírus HCV (TENGAN et al., 2016).

A infecção pelo vírus HCV evolui de forma muito variável, podendo ocasionar desde mínimas alterações histológicas até fibrose avançada e cirrose, na presença ou não de carcinoma hepatocelular (ASSOCIAÇÃO EUROPEIA PARA O ESTUDO DO FÍGADO, 2015). No caso dos pacientes portadores do vírus do HIV, a infecção concomitante pelo HCV apresenta destaque entre as causas de doença hepática.

Nesses indivíduos, a imunossupressão acelera a progressão da hepatite C, promovendo a ocorrência de cirrose hepática e carcinoma hepatocelular. Além disso, eles são menos responsivos aos tratamentos, dificultando a erradicação do HCV (WEBSTER; KLENERMAN; DUSHEIKO, 2016).

Estima-se que as hepatites virais sejam responsáveis por 1,34 milhões de óbitos ao ano, comparando-se ao número de mortes por tuberculose e superando as mortes por HIV (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017). A Figura 2 ilustra o número de óbitos atribuído a cada hepatite viral, sendo as hepatites B e C, responsáveis por 66 % e 30 % (aproximadamente 400 mil óbitos) dos óbitos, respectivamente, totalizando 96% dos óbitos causados pelas hepatites virais. Diferentemente das mortes por HIV, tuberculose e malária, os óbitos por hepatites virais estão em ascensão como pode ser visto na Figura 3. Tal fato gera um alerta e a necessidade de disponibilização de tratamentos eficazes e seguros, minimizando os agravos à saúde e reduzindo a frequências de novas infecções e com isso contribuindo para a erradicação das hepatites B e C até 2030, uma meta da OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017).

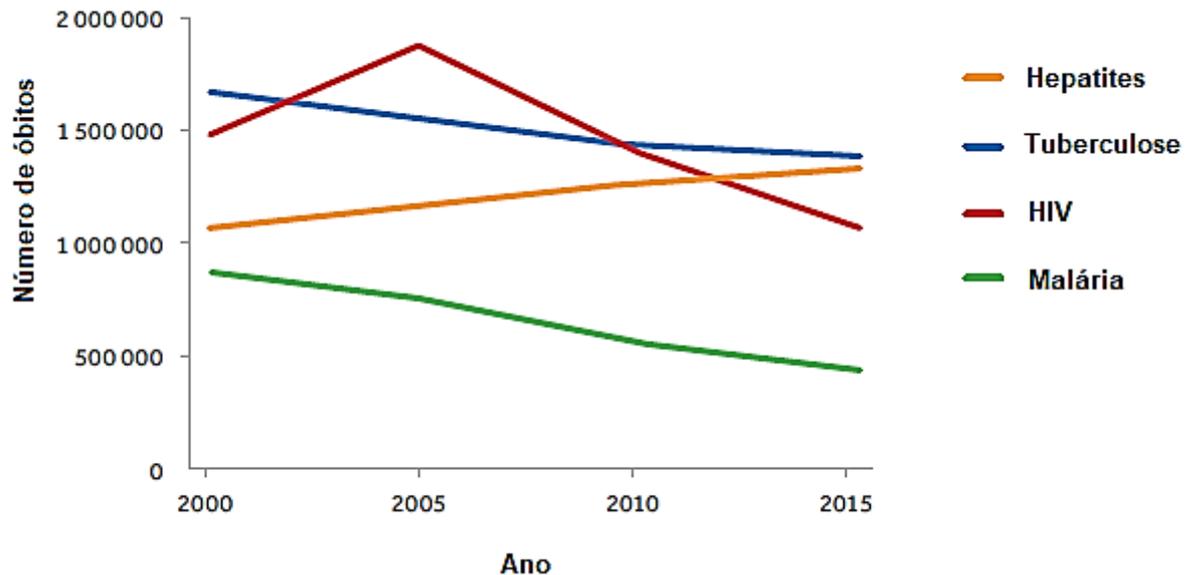
Figura 2 - Óbitos por hepatites virais, por vírus e por tipo de complicação



Fonte: (Adaptado de ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017).

Legenda: HAV – vírus da hepatite A; HBV – vírus da hepatite B; HCV – vírus da hepatite C; HEV – vírus da hepatite E.

Figura 3 - Número de óbitos por hepatites, tuberculose, HIV e malária ao redor do mundo

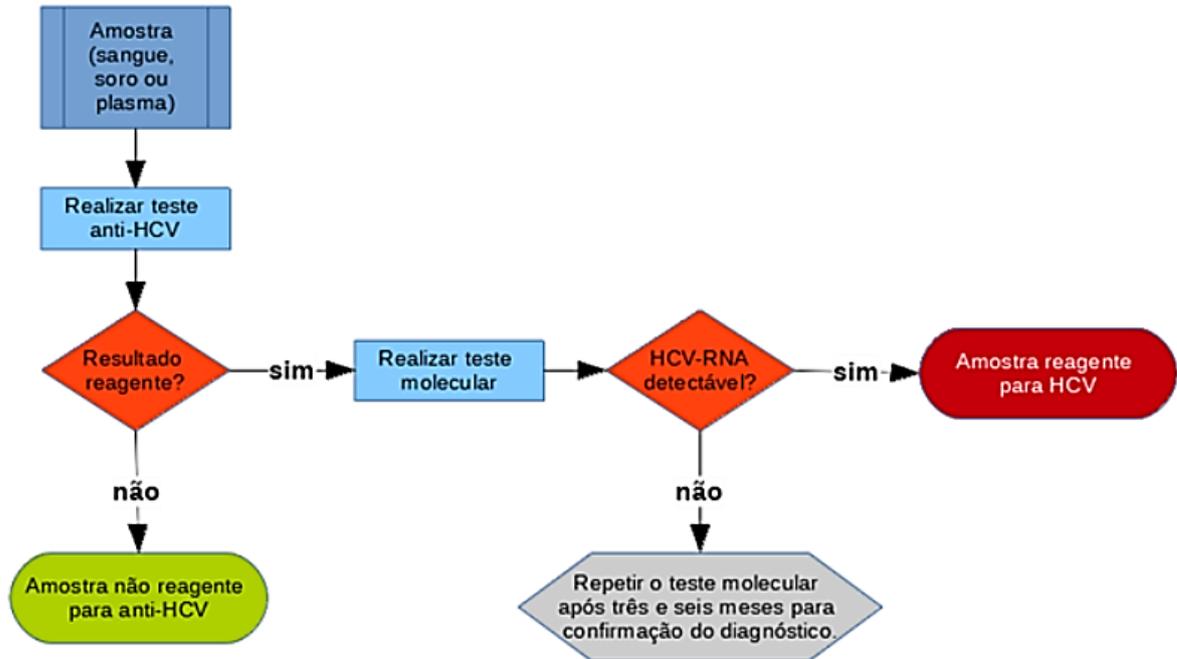


Fonte: (Adaptado de ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017).

1.3 O vírus da hepatite C - diagnóstico laboratorial

Na maioria dos casos a hepatite viral C aguda apresenta-se silenciosa, ou seja, não há manifestação de sintomas, dificultando a realização do diagnóstico. Uma pequena quantidade de indivíduos apresenta icterícia enquanto outros apresentam sintomas inespecíficos como anorexia e mal-estar, o que torna necessário a realização de testes sorológicos específicos para se chegar a uma conclusão correta do diagnóstico. O fluxograma geral para o diagnóstico da hepatite C é mostrado na Figura 4. Existem outros fluxogramas, definidos no Manual Técnico para o Diagnóstico das Hepatites Virais, os quais se encaixam nas condições de heterogeneidade regional observada no país, permitindo o diagnóstico conforme os diferentes perfis de pacientes que os profissionais podem encontrar (BRASIL, 2017a).

Figura 4 - Fluxograma de diagnóstico laboratorial da infecção pelo Vírus da Hepatite C



Fonte: (BRASIL, 2017a).

Os testes diagnósticos para o HCV baseiam-se na detecção sorológica de anticorpos específicos contra o vírus ou por meio de técnicas moleculares, que se baseiam na detecção do RNA viral. As técnicas baseadas na dosagem de anticorpos foram inicialmente aprovadas nos Estados Unidos em 1990 e evoluíram consideravelmente desde então. São ensaios imunoenzimáticos e ensaios de quimioluminescência, os quais fazem uma triagem inicial. A simples presença de anticorpos anti-HCV não é significado de infecção atual pelo vírus, mas contato prévio com o mesmo, ou até uma reação de falso positivo. Por outro lado, quando ocorre a detecção do RNA viral, conclui-se que há uma infecção atual pelo HCV. Nos casos de infecção recente, já é possível detectar material genético do vírus (duas semanas após a infecção aproximadamente), e apenas após seis semanas ocorre a soroconversão, isto é, a produção de anticorpos anti-HCV, permitindo o diagnóstico através de testes sorológicos. Nos casos específicos em que há coinfeção com HIV, a soroconversão pode ser tardia ou até mesmo não ocorrer, sendo assim, a detecção do RNA a forma de diagnóstico mais adequada (WEBSTER; KLENERMAN; DUSHEIKO, 2016).

1.4 O vírus da hepatite C - tratamento

O principal objetivo do tratamento é a erradicação do vírus, o que corresponde a alcançar um estado definido como Resposta Viroológica Sustentada (RVS). Tal resposta é um parâmetro de cura e consiste na indetectabilidade do RNA do HCV (viremia indetectável) 12 ou 24 semanas após o fim do tratamento, conforme regime terapêutico (BRASIL, 2017a).

A evolução dos fármacos utilizados no tratamento é apresentada nos itens 1.4.1, 1.4.2, 1.4.3 e 1.4.4.

1.4.1 Monoterapia com Interferon (INF)

O interferon é uma potente citocina⁵ que apresenta atividades antivirais, imunomoduladoras e antiproliferativas. Trata-se de um composto endógeno, produzido em resposta a infecção pelo HCV, o qual promove alterações bioquímicas, levando as células a produzir proteínas que contribuem para o combate ao vírus – o estabelecimento de um estado antiviral. Uma vez alcançado esse estado, são inibidos mecanismos virais de transcrição, tradução, processamento pós-tradução, maturação e brotamento (liberação de partículas virais da célula hospedeira). São conhecidas três classes de interferon humano com significativa atividade antiviral: α , β e γ (BRUNTON; KNOLLMANN; CHABNER, 2012).

O tratamento com interferon se baseia na administração, por via intramuscular ou subcutânea, de injeções contendo o fármaco posto que ele não é absorvido oralmente. A fim de promover melhor resposta e melhorar a adesão ao tratamento, as proteínas de interferon foram conjugadas a grandes moléculas inertes como o polietilenoglicol (PEG), formando o interferon peguilado (INF-PEG). Essa conjugação foi capaz de diminuir a velocidade de absorção e de eliminação do fármaco além de promover concentrações plasmáticas mais elevadas, viabilizando a administração semanal do medicamento (BRUNTON; KNOLLMANN; CHABNER, 2012).

O interferon alfa (INF- α) foi a primeira terapia empregada no tratamento da hepatite C até meados da década de 1990. Consistia em monoterapia que

⁵ Citocinas são glicoproteínas produzidas predominantemente pelos leucócitos que regulam a resposta imune, inflamação e hematopoiese (KHAN, 2008).

apresentava baixa resposta virológica sustentada (RVS), na faixa de 5 a 20% dos pacientes tratados (ALVES *et al.*, 2003).

Além da baixa taxa de cura e elevado índice de recidiva, o uso de interferon é frequentemente acompanhado de reações adversas como inflamação no local da injeção e síndrome aguda semelhante à influenza. Tal síndrome apresenta sintomas como febre, calafrios, cefaleia, mialgia, artralgia, náuseas, vômitos, diarreia e fadiga. Esses sintomas, apesar de dificultar a adesão ao tratamento, podem desaparecer ao longo do mesmo (BRUNTON; KNOLLMANN; CHABNER, 2012).

Pode ainda ocasionar hepatotoxicidade o que é evidenciado por elevações das enzimas hepáticas e dos triglicerídeos, sendo necessário o acompanhamento da função hepática através de exames clínicos e laboratoriais. Ademais, são observadas reações adversas como nefrite intersticial e proteínúria, o que exige maior cuidado no uso em pacientes com a função renal comprometida (BRUNTON; KNOLLMANN; CHABNER, 2012).

Há ainda sinais de toxicidade que podem limitar a dose administrada: mielossupressão (queda nos níveis plaquetários e leucocitários); neurotoxicidade (sonolência, confusão mental, distúrbios do comportamento e depressão); distúrbio autoimunes (tireoidite), sendo necessária a verificação de impacto na função tireoideana e efeitos cardiovasculares como hipotensão e taquicardia (BRUNTON; KNOLLMANN; CHABNER, 2012).

1.4.2 Terapia dupla - Interferon associado à ribavirina (INF-Ribavirina)

Em 1998, a ribavirina foi adicionada ao tratamento com interferon para promover um aumento na taxa de cura, que atingiu a marca de 50 % dos pacientes tratados. Portanto, foi recomendada pelas diretrizes de tratamento da época até o surgimento de novos fármacos (WEBSTER; KLENERMAN; DUSHEIKO, 2016).

Ela é um análogo do nucleosídeo⁶ de purina, mais precisamente ao nucleosídeo de guanina, contendo um açúcar D-ribose ligado a uma base nitrogenada modificada. Atua como inibidor da replicação viral de diversos vírus, sejam de DNA ou de RNA. Seu mecanismo de ação, embora não esteja totalmente elucidado, é relacionado a uma alteração dos reservatórios dos nucleotídeos e uma inibição da

⁶ Nucleosídeos são formados por um carboidrato (pentose) e uma base nitrogenada. Não possuem o grupo fosfato (PIERCE, 2016).

síntese de RNA mensageiro viral⁷ e ácidos nucleicos em geral. As formas ativas da molécula, representada por seus derivados mono, di e trifosfato, se formam no interior da célula em reações mediadas por enzimas do hospedeiro (BRUNTON; KNOLLMANN; CHABNER, 2012).

O uso da ribavirina pela via sistêmica – por via oral no caso da hepatite C - pode ocasionar uma anemia (anemia hemolítica) reversível dose dependente e supressão da medula óssea, sendo necessário a realização de hemograma para acompanhamento. A combinação INF-ribavirina, devido às reações adversas relacionadas, apresenta um índice de 20 % de abandono ao tratamento. Além da toxicidade do INF, a ribavirina por via oral eleva o risco de aparecimento fadiga, tosse, exantema, prurido, náusea, insônia, dispneia, depressão e, principalmente, anemia. Além disso, ensaios não clínicos demonstraram que a ribavirina é teratogênica, embriotóxica e oncogênica (BRUNTON; KNOLLMANN; CHABNER, 2012).

1.4.3 Terapia tripla – Associação de Interferon, ribavirina e os antivirais de ação direta (DAA) de primeira geração Boceprevir ou Telaprevir

A terapia dupla foi o padrão utilizado até surgimento dos primeiros antivirais de ação direta (DAA) telaprevir e boceprevir, que foram aprovados para uso pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 2011. Eles são fármacos que inibem a proteína não estrutural do HCV denominada NS3, uma importante macromolécula com função de protease viral. Esses fármacos foram agregados ao tratamento com interferon e a ribavirina, formando a terapia tripla a qual ampliou a taxa de cura para 70 - 80 % dos pacientes tratados (COPPOLA et al., 2014). Porém, são fármacos direcionados para o combate às infecções causadas apenas pelo genótipo 1 do HCV. Além disso, apresentam uma série de preocupantes reações adversas (SALAM; AKIMITSU, 2013).

A ocorrência de anemia é a principal reação adversa observada nos tratamentos envolvendo boceprevir ou telaprevir. Tais fármacos ainda apresentam um forte efeito inibitório sobre as enzimas do Citocromo P4503A4 (CYP3A4), ampliando a probabilidade ocorrência de interações medicamentosas. Quanto à

⁷ O RNA mensageiro é a molécula que orienta a tradução do material genético, resultando na síntese de proteínas (PIERCE, 2016):

posologia, são relacionados à necessidade de administração frequente, pois possuem um reduzido tempo de meia vida (SALAM & AKIMITSU, 2013).

Esses fármacos ainda apresentam uma baixa barreira genética à resistência quando comparados aos regimes atuais – mencionados no item 1.4.4 - o que significa dizer que possuem maior chance de falha terapêutica devido a ocorrência de resistência viral (JIMÉNEZ-PÉREZ *et al.*, 2016).

1.4.4 Novos protocolos de tratamento - regimes isentos/livres de interferon: novos DAA

Em 2014, houve um avanço no tratamento devido ao surgimento de regimes terapêuticos isentos de interferon. Eles foram iniciados com o sofosbuvir e posteriormente acrescidos de outras opções como simeprevir, daclatasvir, sofosbuvir/ledipasvir e uma combinação de fármacos ombitasvir/paritaprevir/ritonavir e dasabuvir (STAHMEYER *et al.*, 2017).

O sofosbuvir, por exemplo, teve seu registro concedido pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 2013 e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2015. Ele é capaz de promover um aumento na RVS, na faixa de 90 % dos pacientes tratados. Além disso, os recentes DAA também foram responsáveis por regimes terapêuticos de menor incidência de efeitos adversos, menor necessidade de tempo de tratamento e maior facilidade de administração - por via oral - diferentemente do interferon, que é administrado pela via intramuscular ou subcutânea. Ademais, esses fármacos viabilizaram o tratamento de indivíduos intolerantes ao interferon, indivíduos com cirrose avançada e apresentando outras comorbidades (STAHMEYER *et al.*, 2017).

Segundo estimativas da OMS, conforme relatório publicado em 2017, apenas 5,5 milhões de indivíduos já foram tratados contra a hepatite C até o presente momento, sendo que a maioria desses tratamentos foram realizados conforme recomendações dos regimes antigos, que são menos efetivos. Desse total, apenas meio milhão de pessoas receberam os mais novos antivirais de ação direta, que revelaram maior efetividade (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017).

Dessa forma, é de extrema importância a mobilização das autoridades de saúde para a ampliação dos tratamentos contra as hepatites com o objetivo de erradicá-las até 2030, que é uma das metas da Organização Mundial da Saúde

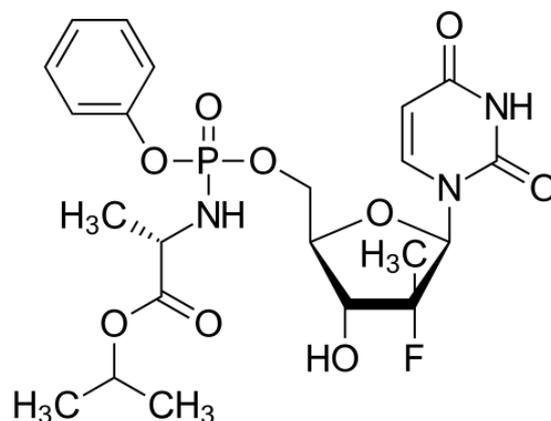
(ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017). Nesse sentido, o Ministério da Saúde elaborou o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) para Hepatite C e Coinfecções (2017). O objetivo deste protocolo é prover, no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS), as recomendações terapêuticas nacionais e orientar os profissionais de saúde no diagnóstico e manejo da hepatite C e coinfecções.

O PCDT opta por descontinuar os antivirais de ação direta de primeira geração (boceprevir e telaprevir) e insere ao arsenal terapêutico do SUS os mais recentes antivirais como o sofosbuvir, que agem interrompendo a replicação do HCV e constituem avanços recentes no tratamento da Hepatite C. Espera-se que o tratamento seja capaz de promover a erradicação do vírus, aumentando a expectativa e qualidade de vida, diminuindo a incidência de complicações como cirrose, carcinoma hepatocelular, e assim, reduzindo a transmissão do HCV, o número de óbitos e contribuindo para a erradicação do vírus (BRASIL, 2017a).

1.4.4.1 Sofosbuvir – Características gerais

O sofosbuvir ($C_{22}H_{29}FN_3O_9P$), Figura 5, é o β -d-2'-deoxy-2'- α -fluoro-2'- β -C-metiluridina, é um análogo de nucleotídeo que age inibindo a replicação do RNA viral, por inibir a proteína NS5B do HCV, uma RNA polimerase (KIRBY et al., 2015). Ele é classificado no grupo III do sistema de classificação farmacêutica (SCB), que inclui os fármacos que apresentam alta solubilidade aquosa e baixa permeabilidade (GERMAN et al., 2016).

Figura 5 - Estrutura química do Sofosbuvir



Fonte: (WISHART et al., 2006)

1.4.4.2 Sofosbuvir - Farmacocinética

A molécula de sofosbuvir é um pró-fármaco que, após absorção intestinal, é direcionado ao fígado. Seus parâmetros farmacocinéticos bem como os parâmetros de seu principal metabólito circulante, segundo dados da literatura, encontram-se apresentadas na Tabela 1 a seguir.

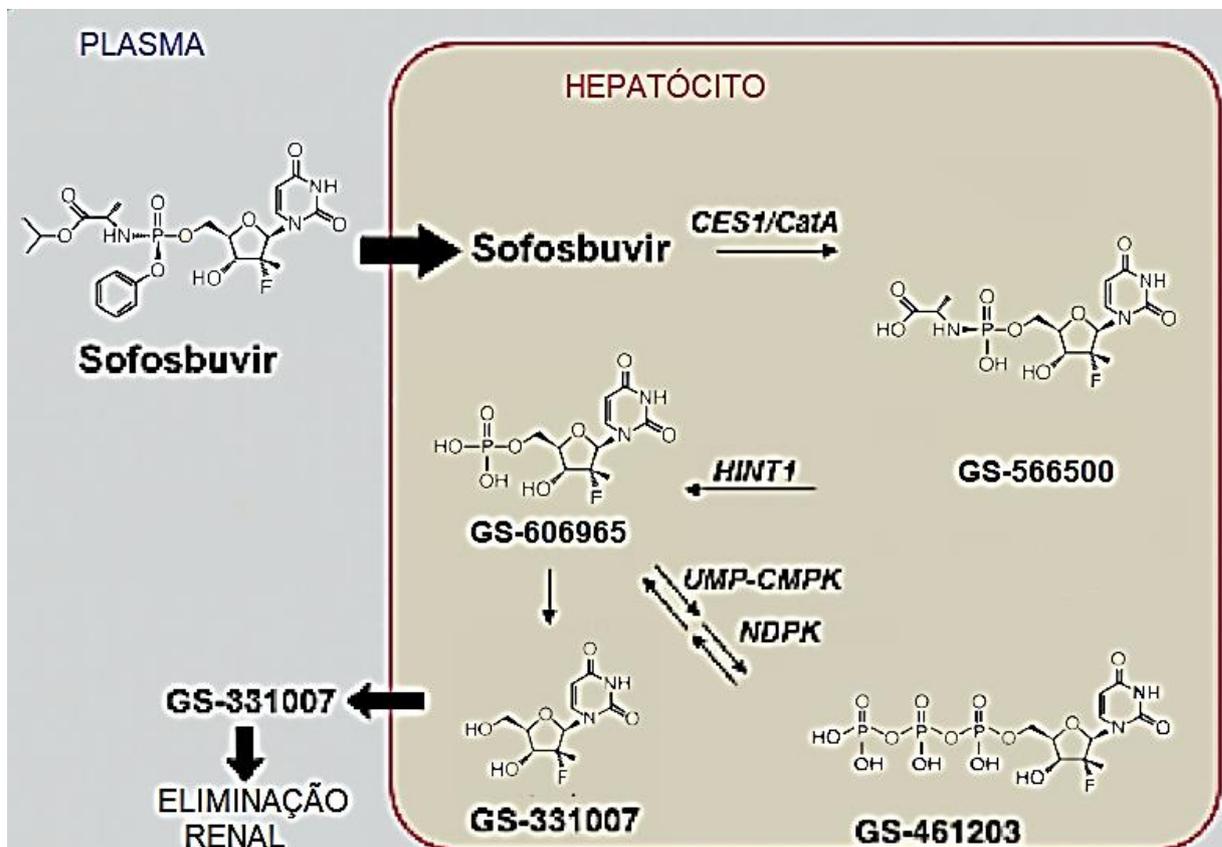
Tabela 1 - Parâmetros farmacocinéticos do sofosbuvir e do metabólito GS-331007 após a administração oral, em jejum, de 400 mg de sofosbuvir (medicamento de referência)

Parâmetros	Rezk, Basalious Karim (2015) n=24		Bahrami et al (2016) n=24		Miraghaei et al (2017) n=24		Kirby et al (2015) n=59		LI et al (2018) n=14	
	Sofosbuvir	GS-331007	Sofosbuvir	GS-331007	Sofosbuvir	GS-331007	Sofosbuvir	GS-331007	Sofosbuvir	GS-331007
C_{max} (ng/mL)	1860,1	1455,5	1283,0	Não avaliado	1359,0	Não avaliado	622,0	1110,0	1001,7	1096,9
$ASC_{0-\infty}$ hr* (ng/mL)	2078,8	21194,3	1481,0	Não avaliado	1434,5	Não avaliado	629,0	11100,0	861,0	10191,1
T_{max} (h)	0,75	4,0	1,28	Não avaliado	1,24	Não avaliado	0,5 – 2,0	2,0 – 4,0	0,50	2,5
$T_{1/2\beta}$ (h)	0,54	24,68	0,93	Não avaliado	1,02	Não avaliado	0,4	27,0	0,38	24,96

Fonte: (Do autor, 2018).

O pró-fármaco sofosbuvir é ativado intracelularmente pela ação sequencial de enzimas resultando na formação da molécula ativa trifosforilada (SUMMERS; BEAVERS; KLIBANOV, 2014). Primeiramente, as enzimas humanas catepsina A (CatA) e Carboxilesterase 1 (CES1) conduzem a formação do composto GS-566500. Este, por sua vez, pela ação da proteína ligante de nucleotídeo tríade de histidina 1 (HINT1) é convertido em GS-606965. Nesse composto, atuam enzimas que irão promover sua fosforilação: uridina monofosfato/citidina monofosfato quinase (UMP-CMPK) e nucleosídeo difosfato quinase (NDPK), formando o composto ativo trifosforilado GS-461203, conforme Figura 6. A defosforilação de GS-606965 resulta na formação do composto inativo GS-331007, que é o principal metabólito circulante. Esse metabólito não é eficientemente fosforilado, sendo eliminado pela via renal. Já a molécula trifosforilada (GS-461203), liga-se de forma seletiva ao RNA viral em replicação, competindo com os nucleotídeos de uracila pela incorporação ao RNA do HCV. Assim, essa molécula bloqueia a ligação de outros nucleotídeos, atuando como um terminador de cadeia (KIRBY *et al.*, 2015).

Figura 6 - Via de biotransformação do sofosbuvir



Fonte: (Adaptado de SUMMERS; BEAVERS; KLIBANOV, 2014).

Vale ressaltar que, durante o processo de biotransformação do sofosbuvir, não há participação de enzimas do citocromo P-450 (CYP). Além disso, o fármaco e seus produtos de biotransformação não são indutores da CYP, evidenciando que o mesmo apresenta uma baixa capacidade para se envolver em interações farmacológicas. Entretanto, já são conhecidas interações via transportadores de efluxo intestinais glicoproteína P (P-gp) e proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP) (KIRBY *et al.*, 2015).

O sofosbuvir, mas não o metabólito GS-331007, por ser substrato dos transportadores P-gp e BCRP, presentes nas células intestinais, pode apresentar alterações em sua farmacocinética, seja por maior ou menor absorção, na presença de inibidores ou indutores de tais transportadores (KIRBY *et al.*, 2015).

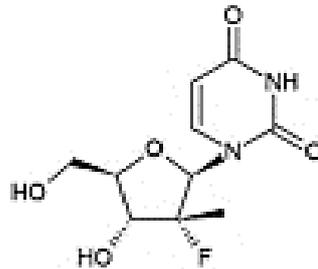
A ciclosporina, um fármaco utilizado para prevenir a rejeição pós transplante hepático, é um potente inibidor da P-gp e da BCRP intestinais, e com isso produz um aumento significativo na exposição ao sofosbuvir, evidenciado pelo aumento de 353 % da área sob a curva do tempo zero ao infinito ($ASC_{0-\infty}$). Além disso, esse imunossupressor causa um aumento de 154 % da concentração plasmática máxima (C_{max}) Porém, essa interação não é considerada clinicamente significativa, sendo desnecessário o ajuste de dose em caso de uso concomitante de ambos os fármacos (KIRBY *et al.*, 2015).

Diferentemente dos compostos inibidores da P-gp e BCRP intestinais, os indutores como a rifampicina, a carbamazepina, a oxcarbazepina, a fenitoína e até mesmo fitoterápicos a base de *Hypericum perforatum* (Erva de São João), não devem ser utilizados concomitantemente ao sofosbuvir, pois podem estar relacionados a uma menor exposição ao antiviral, evidenciada pela redução de 72 % da $ASC_{0-\infty}$. Além disso, esses indutores promovem uma redução de 77 % do C_{max} , resultando na perda do efeito terapêutico (KIRBY *et al.*, 2015).

O metabólito ativo trifosforilado GS-461203 é indetectável no plasma, mas dados obtidos de estudos envolvendo animais indicam que ele possui meia vida de 18 horas no hepatócito e com isso, a posologia recomendada para o sofosbuvir consiste em apenas um comprimido, uma vez ao dia (KIRBY *et al.*, 2015). Em um outro trabalho de 2014 é descrito que a meia vida do GS-461203 no hepatócito humano é de aproximadamente 38 horas (SUMMERS; BEAVERS; KLIBANOV, 2014).

O sofosbuvir é excretado primariamente na urina, na forma de seu metabólito inativo, o composto GS-331007 (Figura 7) que representa o principal metabólito circulante, podendo ser detectado no plasma. A formação desse composto também pode acontecer de forma pré-sistêmica, nas células do epitélio intestinal. Por esse motivo, acredita-se que ele seja oralmente biodisponível assim como o pro-fármaco sofosbuvir (KIRBY *et al.*, 2015).

Figura 7 - Estrutura química do metabólito GS-331007



Fonte: (KIRBY *et al.*, 2015)

Um ensaio farmacocinético realizado na China cujos resultados estão na Tabela 1 - conduzido pelos pesquisadores Li *et al.* (2018) - objetivou avaliar a farmacocinética do sofosbuvir na população do país. Os autores concluíram que o perfil farmacocinético dos voluntários chineses foi semelhante ao perfil de não chineses, os quais foram denominados homens brancos. Considerando que ainda não foi realizado nenhum estudo nesse sentido envolvendo o fármaco em questão no Brasil, é de extrema importância que o sofosbuvir seja avaliado em nossa população, embora Kirby e colaboradores (2015) tenham concluído, através de modelos farmacocinéticos, que alterações na farmacocinética não estão ligadas às diferenças como raça, sexo e idade.

1.4.5 Variabilidade na resposta ao tratamento para hepatite C

O vírus da hepatite C possui grande variabilidade, apresentando sete genótipos distintos, representados pelos números de 1 a 7. Cada genótipo, por sua vez, subdivide-se em subtipos, que são representados por letras minúsculas, como por exemplo o subtipo 1a. Além disso, ao longo do curso de uma infecção, pode ocorrer a formação de diferentes cepas de HCV por pressão do hospedeiro e/ou por falhas na

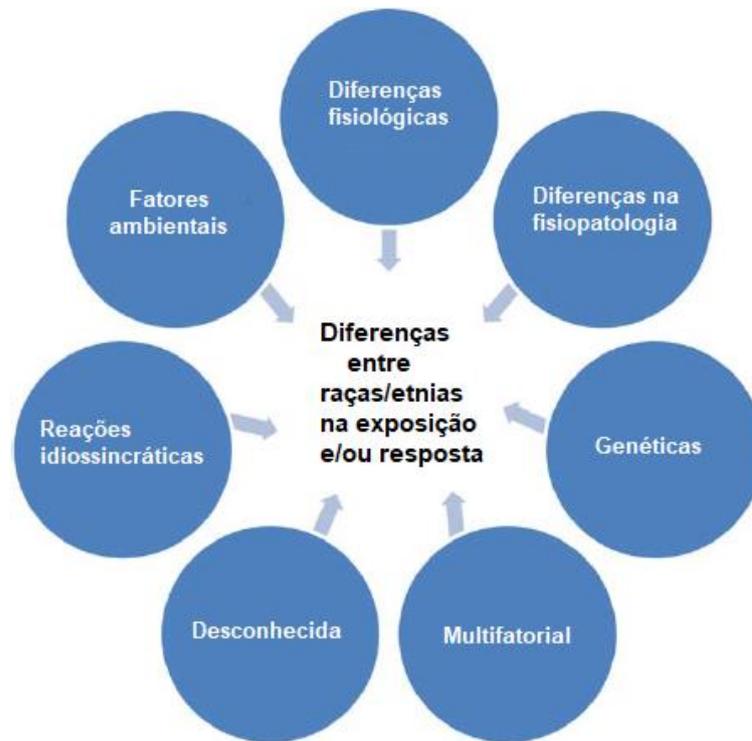
replicação viral, produzindo diferentes graus de agressividade e influenciando na resposta aos tratamentos (JIMÉNEZ-PÉREZ *et al.*, 2016).

Além dos fatores relacionados ao vírus, a influência racial/étnica também deve ser considerada. Segundo Ramamoorthy e colaboradores (2015), aproximadamente 20 % dos novos fármacos aprovados para uso nos últimos 6 anos, demonstraram diferenças na exposição e/ou resposta ao fármaco entre os diferentes grupos raciais/étnicos. Os fatores relacionados às diferenças observadas entre as raças/etnias encontram-se demonstrados na Figura 8.

Para a hepatite C, é conhecida a diferença entre africanos e europeus na resposta ao tratamento. Nos Estados Unidos, por exemplo, os indivíduos com ancestralidade africana apresentam uma menor responsividade aos tratamentos quando comparados aos europeus ou asiáticos, mesmo quando são empregados os mais novos antivirais de ação direta (RAMAMOORTHY *et al.*, 2015). Assim, nessas pessoas observa-se uma menor resposta virológica sustentada (RVS) e maior incidência de recidiva, o que gera uma maior prevalência e mortalidade por HCV. As causas de tais diferenças não são completamente conhecidas, no entanto, sabe-se que são multifatoriais. Entre elas, encontra-se o fator genético, representado pelo polimorfismo no gene (rs12979860), que se localiza próximo ao gene da interleucina 28B (IL28B⁸). A frequência do alelo C, o qual é relacionado a uma melhor RVS, é mais baixa nos indivíduos de origem africana. (RAMAMOORTHY *et al.*, 2015).

⁸ A interleucina 28 é uma citocina pertencente à família do interferon γ . Ela está envolvida na regulação da resposta imune contra infecções virais (DELVAUX *et al.*, 2015).

Figura 8 – Fatores envolvidos nas diferenças entre raças/etnias na exposição e/ou resposta aos fármacos



Fonte: (Adaptado de RAMAMOORTHY *et al.*, 2015).

Apesar de não existir nenhum regulamento que exija a verificação da contribuição racial/étnica na resposta e/ou exposição a um medicamento, é fundamental que se verifique tal influência a fim de antecipar e prever o comportamento do fármaco nos diferentes grupos em que for administrado.

1.5 Metodologia bioanalítica para análise de sofosbuvir

Em uma busca na literatura científica, observa-se que os trabalhos relacionados à análise de sofosbuvir em matrizes biológicas, utilizaram, na maioria das vezes, a matriz biológica plasma ou soro e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) em modo positivo. Quanto ao preparo de amostras observa-se que a tendência é a utilização da extração líquido-líquido, embora também sejam utilizadas técnicas como a precipitação de proteínas. Na Tabela 2, encontra-se um resumo dos parâmetros adotados em trabalhos recentes envolvendo a quantificação de sofosbuvir em matriz biológica humana.

Vale ressaltar que o sofosbuvir está presente na lista de produtos estratégicos para o SUS, publicada na portaria do Ministério da Saúde nº 704, de 8 de março de

2017 e faz parte de um projeto da Fiocruz que irá viabilizar a produção nacional desse medicamento, permitindo sua distribuição no Sistema Único de Saúde (SUS), ampliando o acesso ao novo tratamento para a hepatite C (BRASIL, 2017b).

Tabela 2 - Análise de sofosbuvir segundo diferentes autores

Parâmetros da análise	Rezk, Basalious Karim (2015)	Bahrami et al (2016)	Rezk, Basalious, Amin (2016)	Rezk et al, (2016)	Abdallah, Ab,del-Megied, Gouda (2017)	Miraghaei et al (2017)	
Metodologia	LC-MS/MS	LC-MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-DAD	LC-MS
Matriz	Plasma (0,5 mL)	Soro (1,0 mL)	Plasma (0,5 mL)	Plasma (0,5 mL)	Plasma (0,5 mL)	Soro (1,0 mL)	Soro (1,0 mL)
Modo	Eletrospray positivo	Eletrospray negativo	Eletrospray positivo	Eletrospray positivo	Eletrospray positivo	Ultravioleta	Eletrospray negativo
Técnica de Varredura	MRM	SIM	MRM	MRM	MRM	Ultravioleta	SIM
Sofosbuvir	530,21>243,03	529 e 287	530,21>243,21	530,21>243,03	530,4>243,2	Ultravioleta	529
Padrão interno	338,20>188,76 (famotidina)	235 (hexobarbital)	415,13>163,19 (eplerenona)	415,13>163,19 (eplerenona)	739,8 >582,3 (daclatasvir)	Ultravioleta	235 (hexobarbital)
Linearidade (ng/mL)	10 - 2500	2 - 2560	0,25 - 3500	0,25 - 3500	0,3 - 3000	25 - 3200	10 -3200
Preparo de amostra	ELL (3 mL)	ELL (5 mL)	ELL (3,5 mL)	ELL (3,5 mL)	ELL (3 mL)	ELL (5 mL)	ELL (5 mL)
Solvente de extração	Acetato de etila	Dietil-éter	éter metil terc-butílico	éter metil terc-butílico	Acetato de etila	Dietil-éter	Dietil-éter
Coluna	C18 50 x2,1mm 1,8 µm	C18 250 x4,0 mm 5,0 µm	C18 50 x 2,1mm 1,7 µm	C18 50 x 2,1mm 1,7 µm	C8 50mmx4,6mm 5,0 µm	C18 250 x 4,0 mm 5,0 µm	C18 250 x 4,0 mm 5,0 µm
Quantificação	Padronização interna (famotidina)	Padronização interna (hexobarbital)	Padronização interna (eplerenona)	Padronização interna (eplerenona)	Padronização interna (daclatasvir)	Padronização interna (hexobarbital)	Padronização interna (hexobarbital)
Ponderação	Não	Não	Não	Não	1/x ²	Não	Não
Corrida	1,2 min	7,5 min	1,0 min	2,0 min	4,0 min	8,0 min	8,0 min
Fluxo (mL/min)	0,30	0,80	0,35	0,40	0,70	0,80	0,80
Eluição	Isocrático	Isocrático	Isocrático	Isocrático	Isocrático	Isocrático	Isocrático

Legenda: LC-MS/MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem; LC-MS - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas; MRM – Monitoramento de Reações Múltiplas; SIM – Monitoramento seletivo de íons; ELL – Extração líquido-líquido; DAD – Arranjo de fotodiodos
 Fonte: (Do autor, 2017).

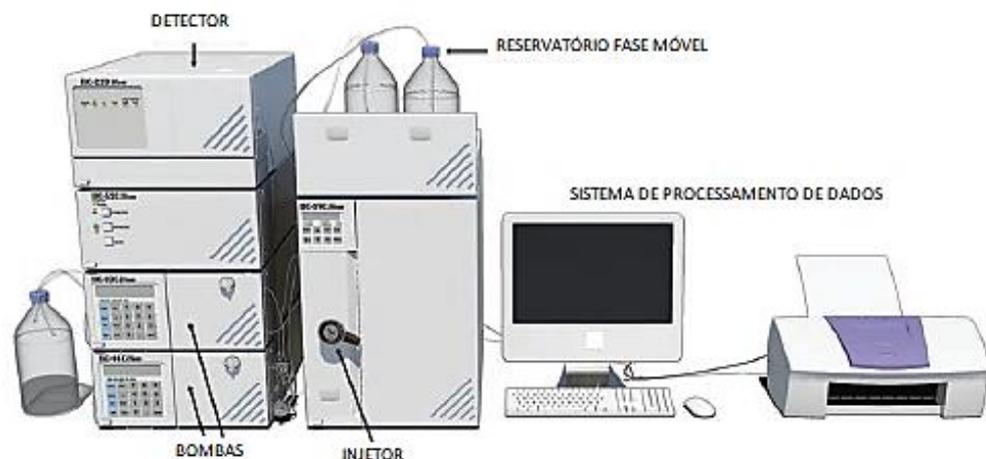
1.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida é a técnica mais amplamente utilizada para análise de diversas preparações e vem contribuindo fortemente na ciência, especialmente em bioanálises, e assim promovendo a evolução da prática laboratorial. O desenvolvimento e as inovações da técnica nos últimos 50 anos vêm ocorrendo nas indústrias de pesquisa e desenvolvimento devido ao trabalho de equipes de pesquisadores que trabalharam até o desenvolvimento do que é disponível atualmente: a cromatografia líquida moderna (FANALI *et al.*, 2013).

A cromatografia líquida consiste na separação, de componentes de uma mistura por um método físico-químico, que envolve a interação diferencial (partição) desses componentes em uma fase estacionária líquida (não miscível com a fase móvel), e uma fase móvel líquida. Na cromatografia em fase reversa, que é o modo mais utilizado devido à grande variedade de aplicações envolvendo moléculas de diferentes tamanhos e hidrofobicidades, a fase estacionária é composta por organossilanos polimerizados com grupos alifáticos como C8 e C18 (CASS; CASSIANO, 2015).

O sistema cromatográfico é composto pelos seguintes componentes: reservatório para fase móvel, bomba, injetor, coluna, detector e sistema de processamento de dados. Segue ilustração de um esquema básico de um sistema de cromatografia líquida, Figura 9 (LANÇAS, 2009).

Figura 9 - Esquema básico de um sistema de cromatografia líquida



Fonte: (LANÇAS, 2009).

O funcionamento do sistema se baseia no bombeamento da fase móvel que é aspirada por bombas e a direcionam em direção à coluna. Simultaneamente, o injetor introduz a amostra no sistema que se mistura à fase móvel e, assim, a amostra também é carregada e será direcionada até a coluna onde ocorrerá a separação dos componentes da amostra introduzida. Uma vez separados, os componentes seguem carregados pela fase móvel em direção ao detector, que é responsável acusar o sinal gerado pelos componentes da amostra e então este sinal será tratado no sistema de processamento de dados, resultando no cromatograma (LANÇAS, 2009).

Diversos tipos de detectores podem ser acoplados ao sistema de cromatografia líquida. Os primeiros detectores disponíveis comercialmente foram os detectores de UV-VIS e os de índice de refração por volta do início de 1970 cuja detecção é baseada na absorção de determinado comprimento de onda e no índice de refração da substância, respectivamente. Através de uma simples modificação nos detectores de UV, surgiram os detectores de fluorescência, que são bastante empregados atualmente e cuja detecção é baseada na emissão de um determinado comprimento de onda pela substância de interesse. Outro tipo de detector também utilizado é o detector eletroquímico. Ele foi lançado em 1974 e baseia-se na reação de oxi-redução de compostos. Por fim, surgiram os detectores baseados na espectrometria de massas os quais detectam íons originados a partir de compostos. Tais íons são analisados segundo sua relação massa carga (m/z) (FANALI *et al.*, 2013).

1.5.2 Espectrometria de massas

Apesar da espectrometria de massas possuir os mais dispendiosos detectores aplicados ao sistema de cromatografia líquida, diversas características promoveram a técnica a uma posição de destaque dentre as existentes: alta sensibilidade, seletividade, rapidez e ampla possibilidade de aplicações. Atualmente, a popularidade da espectrometria de massas perde apenas para os detectores de ultra violeta/visível (UV-VIS) e vem crescendo à medida que são lançados sistemas mais simplificados com preços mais competitivos, isto é, sistemas mais acessíveis ao usuário (FANALI *et al.*, 2013; HOFFMANN; STROOBANT, 2007). Basicamente, os espectrômetros de massas são compostos por um sistema de entrada de amostras, uma fonte de ionização, um analisador de massas, cujo funcionamento depende de alto vácuo, e o

detector. São exemplos de analisadores os quadrupolos, os *ion trap* e os de tempo de voo (TOFMS) (CASS; CASSIANO, 2015).

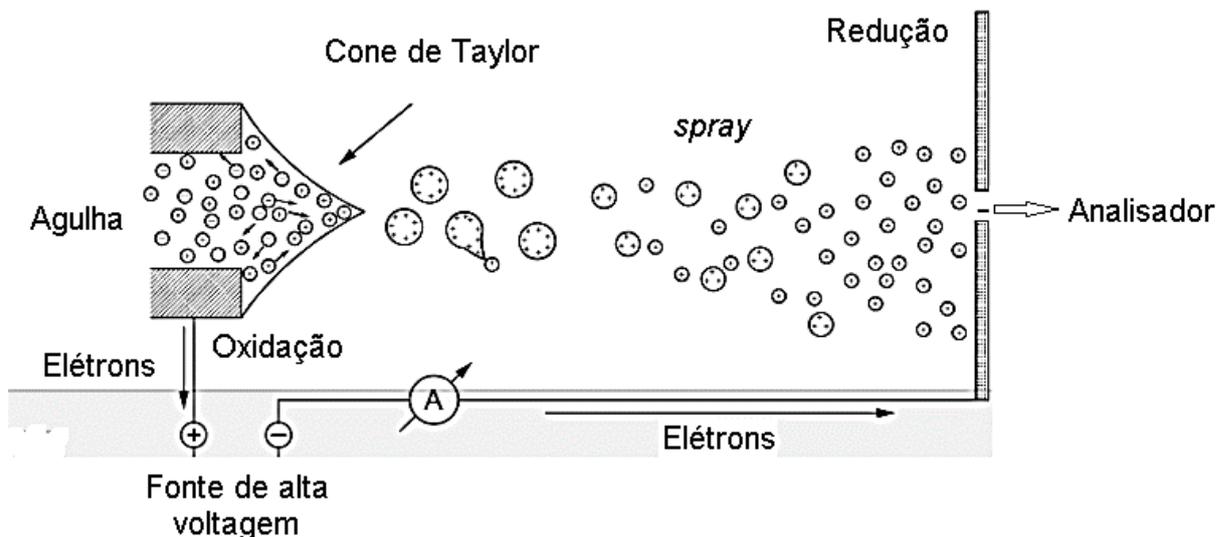
As primeiras observações de acoplamento entre a cromatografia líquida e a espectrometria de massas são do ano de 1970 com os primeiros 20 anos dedicados à pesquisa e à busca de soluções para permitir uma interface entre as técnicas. Levando em consideração a incompatibilidade entre a fase móvel líquida e o alto vácuo do espectrômetro de massas, foram necessários o desenvolvimento de técnicas para permitir tal acoplamento (CASS; CASSIANO, 2015). As primeiras abordagens para fazer essa junção foram baseadas no desenvolvimento de formas capazes de lidar com o problema do alto fluxo de solvente líquido proveniente da fase móvel. Tais interfaces eram formadas por fontes de íons, operando em condições de médio a alto vácuo, tendo como fator limitante a quantidade de solvente. À medida que as pesquisas foram avançando, foi possível reduzir o fluxo de solvente direcionado ao detector de massas, tornando viável o desenvolvimento de sistemas operando sob pressão atmosférica (API) (FANALI *et al.*, 2013).

As fontes de acoplamento entre a espectrometria de massas e a cromatografia líquida que mostraram melhor desempenho foram aquelas que operam à atmosférica (API) ao invés de vácuo. Operando sob pressão atmosférica, estão disponíveis três interfaces: a ionização por *Electrospray* (ESI), a Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI) e a ionização por Fótons à Pressão Atmosférica (APPI) (LANÇAS, 2009).

Atualmente, a ESI é a forma de ionização mais utilizada em espectrometria de massas graças a sua enorme aplicabilidade e aos ótimos resultados obtidos na área biomédica, sendo possível promover a ionização de moléculas de baixo peso molecular como metabólitos de fármacos e moléculas maiores como proteínas, peptídeos e oligonucleotídeos. Detalhadamente, a ionização por *Electrospray* inicia-se com a introdução da fase móvel no interior de um tubo capilar onde sofre a ação de voltagens, usualmente de 2 a 4 kV, levando à formação de um cone logo após a saída do capilar, denominado Cone de Taylor. Em caso de análises em modo positivo, o capilar é submetido a uma voltagem positiva e em caso de análises em modo negativo o capilar é submetido a uma voltagem negativa. Em ambos os casos, ocorre a formação de gotículas carregadas eletricamente as quais vão se libertando do solvente e assim reduzindo seu diâmetro. Além da voltagem aplicada no capilar, fenômenos físicos como o aquecimento e a entrada controlada de moléculas de gases

inertes, como o nitrogênio, intensificam a formação das gotículas. Dessa forma, como as gotículas carregadas vão ficando cada vez menores, as densidades de carga vão aumentando até que, num determinado tamanho, ocorre uma energia eletrostática de repulsão entre as gotículas e elas se desfazem, processo denominado “fissão coulômbica”. Neste momento, os compostos de análise estão ionizados e livres do solvente e, portanto, aptos a serem introduzidos no alto vácuo do espectrômetro de massas (FANALI *et al.*, 2013). A Figura 10 ilustra a formação do Cone de Taylor e a formação de gotículas do solvente com tamanhos cada vez menor até a entrada do composto ionizado em fase gasosa no analisador de massas.

Figura 10 - Formação do Cone de Taylor na ionização por *Electrospray*



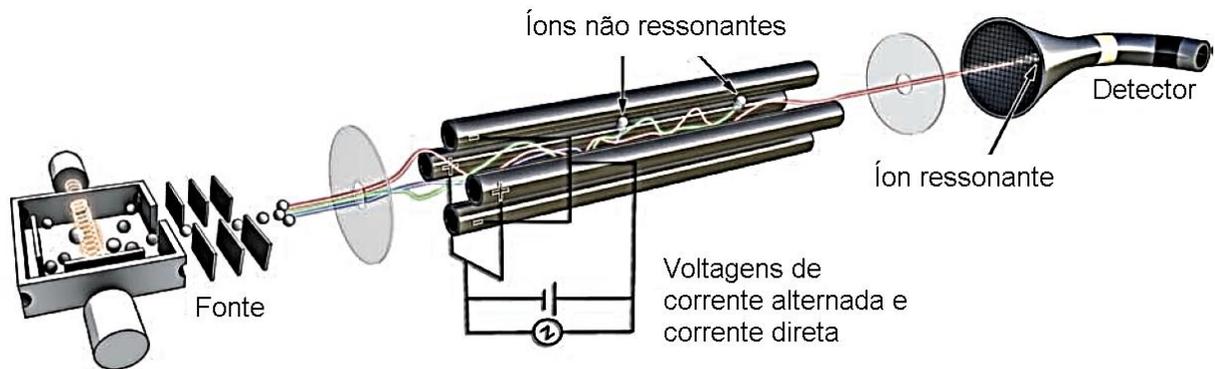
Fonte: (FANALI *et al.*, 2013)

Uma vez formados íons em fase gasosa, os mesmos irão entrar no analisador de massas cuja ação irá promover a separação e migração dos mesmos segundo suas massas carga (m/z) através da ação de campos elétricos e magnéticos. Atualmente, estão disponíveis no mercado sete tipos diferentes de analisadores de massas: analisador de setor elétrico, analisador de setor magnético, quadrupolo, *ion trap*, tempo de voo (TOF), Ressonância Ciclôtrônica com Transformada de Fourier e *Orbitrap* com transformada de Fourier e cada um apresenta suas vantagens e limitações (HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

O analisador de massas do tipo quadrupolo, Figura 11, é um dispositivo que promove a separação dos íons através de sua estabilidade quando submetidos a

campos elétricos. São formados por quatro bastões metálicos alinhados paralelamente submetidos à corrente elétrica e radiofrequência e somente os íons com determinada massa carga (m/z), selecionada no instrumento, atravessarão o quadrupolo (íons ressonantes), e assim serão detectados. Os demais irão colidir (não ressonantes) com os quadrupolos e não serão detectados (LANÇAS, 2009).

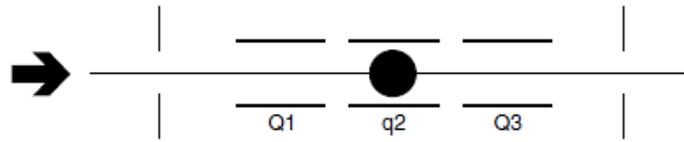
Figura 11 - Analisador do tipo quadrupolo mostrando a trajetória dos íons



Fonte: (LANÇAS, 2009).

Há equipamentos disponíveis que possuem 3 quadrupolos em sequência, Figura 12, constituindo a espectrometria de massas em tandem ou em modo sequencial, mais conhecida como MS/MS. Nesse sistema de triplo quadrupolo, o primeiro e o terceiro quadrupolos funcionam como separadores ou filtros de massas enquanto o segundo funciona como câmara de colisão, onde o íon proveniente do primeiro quadrupolo sofrerá uma fragmentação/dissociação controlada e induzida pela colisão de um gás inerte (CID) ou (CAD), gerando um fragmento que será analisado no terceiro quadrupolo. A técnica de varredura de íons denominada monitoramento de reações múltiplas (MRM) se baseia na leitura do íon precursor no primeiro quadrupolo (Q1) e do íon produto no terceiro quadrupolo (Q3), sendo que a fragmentação controlada da molécula ocorre na câmara de colisão q2. Uma vez separados e fragmentados os íons percorrem seu caminho em direção ao detector até a geração do sinal que será traduzido no sinal cromatográfico (HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

Figura 12 - Esquema de um instrumento triplo quadrupolo. Q1 e Q3 são separadores de massa e q2 é a câmara de colisão



Fonte: (HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

1.5.3 Desenvolvimento de metodologia

O desenvolvimento da metodologia bioanalítica para a quantificação de sofobuvir em plasma humano foi estabelecido a partir de dados disponíveis na literatura, uma vez que se trata de uma metodologia não normalizada, ou seja, não presente em compêndios oficiais. Assim como os autores Rezk, Baliouis e Karim (2015), que desenvolveram um trabalho de quantificação de sofobuvir em plasma humano, o presente estudo também foi realizado por meio da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e utilizando a técnica de extração líquido-líquido como preparo de amostras.

Inicialmente, os padrões analíticos foram pesados e soluções foram preparadas para realizar o procedimento de infusão e FIA (*flow injection analysis*) com o objetivo de otimizar e definir os melhores parâmetros de análise no espectrômetro de massas. Uma vez estabelecidos tais parâmetros, as condições cromatográficas foram avaliadas, por meio de testes com diferentes colunas e fases móveis. Adicionalmente, também foram avaliadas as condições relacionadas ao preparo/extração de amostras como a utilização de diferentes solventes de extração, visto que a metodologia proposta foi desenvolvida utilizando a extração líquido-líquido. Outro ponto importante nesta etapa inicial foi o estabelecimento de uma faixa de trabalho para a quantificação das amostras dos voluntários, ou seja, tornou-se necessário verificar a faixa da curva de calibração que seria adotada de forma que ela fosse adequada para a quantificação das amostras dos voluntários. Portanto, com o objetivo de tornar possível a realização das etapas mencionadas, diversas soluções foram ser avaliadas, otimizadas e preparadas: soluções de sofobuvir, soluções de padrão interno, fase móvel, solução de lavagem do sistema cromatográfico, solução de ressuspensão das amostras e solução de extração das amostras. Ademais, para a avaliação de condições

relacionadas ao preparo/extração das amostras, foram confeccionados padrões de calibração e controles de qualidade em plasma humano por meio de procedimento de fortificação, ou seja, adicionando quantidades conhecidas de sofobuvir no plasma branco. Todas as soluções mencionadas foram testadas e definidas ao longo do desenvolvimento da metodologia e, uma vez estabelecidas, foram utilizadas na validação da metodologia bioanalítica, a qual foi pautada pela resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012 (ANVISA, 2012).

1.5.4 Validação

Segundo Organização Internacional de Normalização (ISO) ISO/IEC 17025:2017, o procedimento de validação consiste na verificação na qual os requisitos especificados são adequados para um uso pretendido, garantindo a geração de resultados válidos (ISO, 2017). Visando atender aos objetivos do presente trabalho, foi realizada uma validação aos moldes da resolução da ANVISA RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Ela estabelece os ensaios que devem ser abordados na validação de uma metodologia bioanalítica: o teste de seletividade e o teste de efeito de matriz na presença e na ausência de substâncias concomitantes/interferentes; a avaliação do efeito de arraste ou residual na corrida cromatográfica; avaliação da linearidade; avaliação da precisão e exatidão e avaliação da estabilidade em matriz biológica e em solução. Além disso, a norma também define critérios específicos para aprovação dos ensaios. Portanto, uma vez demonstrada a aprovação dos ensaios, a metodologia encontra-se validada e apta para ser aplicada e, com isso, viabilizando a produção de resultados confiáveis.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar uma metodologia bioanalítica para determinar os níveis de sofosbuvir em plasma humano, objetivando analisar as amostras de um ensaio clínico cujo resultado irá permitir determinar os parâmetros farmacocinéticos do sofosbuvir na população brasileira.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver metodologia bioanalítica por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) para a determinação de sofosbuvir em plasma humano;
- Validar metodologia bioanalítica desenvolvida conforme requisitos da resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012 da ANVISA;
- Analisar as amostras do Ensaio Clínico realizado com voluntários brasileiros aplicando a metodologia bioanalítica previamente desenvolvida e validada;
- Comparar os parâmetros farmacocinéticos obtidos no estudo com parâmetros farmacocinéticos de outras populações disponíveis na literatura.

3 METODOLOGIA

3.1 Materiais

3.1.1 Uso geral

- Balões volumétricos calibrados com capacidade para 2, 5, 10, 50, 100 e 1000 mL;
- Provetas graduadas de 100, 250, 500 e 1000 mL;
- Ponteiras para pipetas de 100, 200 e 1000 μL - Microbac;
- Microtubos de polipropileno de 2 mL - Eppendorf;
- *Insert* de fundo de 500 μL - Sun-Sri;
- *Vials* para cromatografia de 2 mL.

3.1.2 Análise e identificação

- Coluna cromatográfica Gemini-NX C18 50 x 4,6 mm, 5 μm – Phenomenex;
- Coluna cromatográfica Omnispher C18 150 x 4,6 mm, 5 μm – Agilent.

3.2 Equipamentos e instrumentos

3.2.1 Uso geral

- Pipeta volumétrica calibrada: P100 μL , P200 μL e P1000 μL – Gilson;
- Pipeta repetidora calibrada – Gilson;
- Agitador de tubos - Esco Healthcare PVC2;
- Balança de precisão 0,00001g - Shimadzu AUW – 220 D;
- Concentrador de amostras (fluxo de N_2) – Techne;
- *Freezer* -70 $^{\circ}\text{C}$ - Sanyo MDE-U541/C;
- Refrigerador - Consul Compacto 120;
- Microcentrífuga refrigerada - Novatécnica NT-805;
- Sistema de purificação de água: Millipore Integral 10, Q-POD Millipore ZMQSP0D01 e Reservatório de água destilada Millipore Tank PE 030;
- Ultrassom – Unique;

- Espectrômetro de Massas QTRAP 4500 LC-MS/MS – ABSCIEX;
- Bombas de cromatografia líquida NEXERA - LC-20ADXR – Shimadzu;
- Injetor automático NEXERA - SIL-20AC – Shimadzu;
- Degaseificador DGU-20 A – Shimadzu.

3.2.2 Análise

- *Software* Analyst 1.6.1 – ABSCIEX;
- *Software* Minitab 17.1.0
- Phoenix WinNolin versão 6.3 (Certara®, USA).

3.3 Padrões, medicamento, reagentes e solventes

3.3.1 Padrões analíticos

- Substância química de referência caracterizada (SQC) do sofosbuvir. Lote U5/WS/016/16, fabricado pela Microbiológica Química e Farmacêutica Ltda;
- Substância química de referência farmacopeica (SQF) da cimetidina. Lote 1044, fabricado pela Farmacopéia Brasileira;
- Substância química de referência farmacopeica (SQF) da nicotina. Lote R02011, fabricado pela United States Pharmacopeia (USP);
- Substância química de referência caracterizada (SQC) da cafeína. Lote SLBF5228V, fabricado pela Sigma-Aldrich;
- Substância química de referência caracterizada (SQC) da 4-N-metilaminoantipirina (4-MAA). Lote BCBR9592V, fabricado pela Sigma-Aldrich;
- Substância química de referência farmacopeica (SQF) da Metoclopramida. Lote 1008, fabricado pela Farmacopéia Brasileira;
- Substância química de referência farmacopeica (SQF) do Paracetamol. Lote 2009, fabricado pela Farmacopéia Brasileira.

Nota: todas as SQC e SQF utilizadas no presente trabalho pertenciam ao lote corrente, portanto válidos para uso.

3.3.2 Medicamento utilizado no ensaio farmacocinético

- Medicamento de referência do fármaco sofosbuvir: comprimidos de 400 mg de sofosbuvir (Sovaldi®). Lote: WPZB fabricado pela Gilead Sciences Foster City, Califórnia, Estados Unidos da América. Validade: 06/2018.

3.3.3 Reagentes e Solventes

- Metanol grau HPLC - J.T.Baker
- Acetonitrila grau HPLC - Merck
- Ácido Fórmico 98 - 100% - Scharlau
- Água Tipo I - Milli-Q
- Acetato de etila - Tedia
- Éter etil-terc-butílico (TBME) – Scharlau

3.4 Ensaios preliminares

Com o objetivo de se realizar o desenvolvimento da metodologia bioanalítica, foi necessário realizar uma busca na literatura e para auxiliar no desenvolvimento da metodologia. A busca foi realizada na base de dados MEDLINE via PubMed por meio das palavras sofosbuvir, *development*, *method*, *determination* e *validation*, conectadas pela palavra *and* como operador booleano. Aplicou-se o filtro *species humans* para exibir apenas os estudos realizados em humanos.

3.4.1 Otimização dos parâmetros no espectrômetro de massas

Para realizar a otimização dos parâmetros no espectrômetro de massas foi necessário efetuar o preparo de soluções contendo o sofosbuvir e a cimetidina (composto selecionado para padrão interno após buscas na literatura) para introduzir no equipamento através de um procedimento denominado de infusão. Pesou-se 5,0 mg dos padrões analíticos de sofosbuvir e de cimetidina e procedeu-se a diluição dos mesmos em Metanol/água (80:20) (v/v) em balão volumétrico de 5 mL, produzindo uma solução mestre de 1 mg/mL (1.000.000 ng/mL). Então, essa solução foi diluída

em Metanol/água (80:20) (v/v) para produzir uma solução de concentração igual a 50 ng/mL. A esta solução, adicionou-se 20 microlitros de ácido fórmico, com o objetivo de favorecer a ionização, dado que o sofobuvir é facilmente protonado em meio ácido (REZK; BASALIOUS; KARIM, 2015). Com o auxílio de uma seringa apropriada, procedeu-se a infusão. Nesse procedimento, as soluções padrão de 50 ng/mL de sofobuvir e de cimetidina foram introduzidas no espectrômetro de massas, permitindo-se selecionar os íons a serem detectados, o modo de detecção, a técnica de varredura, a voltagem aplicada DP, (*Declustering Potential*), a voltagem EP (*Entrance Potential*), a voltagem CE, (*Collision Energy*), a voltagem CXP (*Collision Cell Exit Potential*), o *dwell time* e a voltagem IS (*Ionspray Voltage*). A técnica de varredura MRM (monitoramento de reações múltiplas) consistiu no monitoramento de um íon precursor e de um íon produto, o que confere alta seletividade à metodologia. Para o presente trabalho a transição 530,22>243,10 apresentou-se com maior intensidade, o que está em perfeito acordo com o trabalho de Rezk, Basalious e Karim (2015), cuja transição monitorada foi de 530,21>243,03.

Num segundo momento, realizou-se o procedimento denominado FIA (*flow injection analysis*), o qual é executado com o auxílio do autoinjeter do cromatógrafo. Foram realizadas injeções sequenciais de 10 microlitros da amostra contendo 50 ng/mL do analito sofobuvir utilizando a mesma fase móvel utilizada no trabalho de Rezk, Basalious e Karim (2015), composta por 50 % de fração aquosa contendo ácido fórmico a 0,1 % (v/v) e 50 % acetonitrila. É recomendado que a fase móvel utilizada no FIA seja próxima da fase móvel a ser adotada na metodologia. Através da realização do FIA, foi possível otimizar os parâmetros dependentes da fonte de ionização: fluxo de gás CAD, o fluxo de gás CUR, o fluxo do gás GS1, o fluxo do gás GS2 e a temperatura TEM da fonte do equipamento.

3.4.2 Preparo das soluções mestre e das soluções de trabalho

3.4.2.1 *Preparo das Soluções Mestre e das Soluções de trabalho do analito sofosbuvir*

O padrão analítico de sofosbuvir foi utilizado no preparo das soluções mestre (SME) também denominadas solução mãe ou solução estoque. Após a pesagem, com o auxílio de um balão volumétrico de 5 mL, foi preparada uma solução mestre de 1 mg/mL (1000000 ng/mL) pela diluição do padrão em uma solução de Metanol/água (80:20) (v/v). Essa solução diluente foi testada e se mostrou adequada ao uso pretendido, sendo utilizada para a diluição dos padrões analíticos utilizados para a condução do estudo. A partir da SME, soluções mais diluídas foram preparadas, conforme Tabela 3, originando as soluções de trabalho (STB), que se apresentam dez vezes mais concentradas do que as concentrações de sofosbuvir em plasma. Foram preparadas oito STB's para a confecção da curva de calibração, compreendida entre a STB01 e STB08, cujas concentrações foram definidas com base na faixa de trabalho que se pretendeu atingir, ou seja, de 0,50 ng/mL a 1000,00 ng/mL de sofosbuvir em plasma. Essa faixa foi definida com base nos resultados iniciais das amostras dos voluntários do ensaio farmacocinético.

As soluções de trabalho também foram utilizadas para a confecção de controles de qualidade em matriz biológica: são elas a STB01, que foi utilizada para a confecção do limite inferior de quantificação (LIQ); a STB02, utilizada para o controle de qualidade baixo (CQB); a STB06, utilizada para o controle de qualidade médio (CQM); a STB07, utilizada para o controle de qualidade alto (CQA) e a STB09, que foi utilizada para a confecção do controle de qualidade de diluição (CQD). Para a análise das amostras dos voluntários foi incluído o controle de qualidade intermediário (CQC), preparado com a STB04, a fim de permitir um melhor monitoramento da corrida. Dessa forma, como exigido pela Resolução RDC n^o 27 de 17/maio/2012 da ANVISA, havia ao menos dois níveis de controle dentro da faixa de concentrações dos voluntários. Após o preparo e utilização, as soluções foram armazenadas em *freezer* -70°C, sendo descartadas ao término do período de validade definido em estudo de estabilidade.

Tabela 3 - Guia de preparo das soluções de sofosbuvir

Código da solução	Concentração da solução (ng/mL)	Volume preparado da solução (mL)	Volume pipetado (mL)	Volume de diluente (mL)	Solução utilizada no preparo
SME	1.000.000,00	5,00	-	5,00	Padrão
STB11	100.000,00	10,00	1,00	9,00	SME
STB10	1.000,00	10,00	0,10	9,90	STB11
STB09	32.000,00	10,00	0,32	9,68	SME
STB08	10.000,00	10,00	1,00	9,00	STB11
STB07	8.000,00	10,00	0,80	9,20	STB11
STB06	4.000,00	10,00	0,40	9,60	STB11
STB05	2.000,00	10,00	0,20	9,80	STB11
STB04	1.000,00	10,00	0,10	9,90	STB11
STB03	100,00	10,00	1,00	9,00	STB10
STB02	15,00	10,00	0,15	9,85	STB10
STB01	5,00	10,00	0,05	9,95	STB10

Fonte: (Do autor, 2017).

3.4.2.2 Preparo das Soluções Mestre e da Solução de trabalho do padrão interno

A cimetidina foi selecionada como padrão interno a partir de dados disponíveis na literatura (REZK; BASALIOUS; KARIM, 2015). A solução mestre e a solução de trabalho de cimetidina (STB-PI) foram preparadas conforme Tabela 4. Essa etapa ocorreu de forma similar ao preparo das soluções de sofosbuvir, ou seja, por meio de pesagem do padrão e diluição em Metanol/água (80:20) (v/v), e também foram armazenadas em *freezer* -70°C até o período de estabilidade.

Tabela 4 - Guia de preparo das soluções de cimetidina

Código da solução	Concentração da solução (ng/mL)	Volume preparado da solução (mL)	Volume pipetado (mL)	Volume de diluente (mL)	Solução utilizada no preparo
SME	1.000.000,00	5,00	-	5,00	Padrão
STB-PI	1.000,00	100,00	0,10	99,90	SME

Fonte: (Do autor, 2017).

3.4.2.3 *Preparo das Soluções Mestre e das Soluções de trabalho das substâncias interferentes (nicotina e cafeína) / fármacos concomitantes*

Durante a realização do estudo farmacocinético, conforme previsto em protocolo clínico, foi necessário que alguns voluntários fizessem o uso de paracetamol (PCT), metoclopramida (MTC) e dipirona. Dessa forma, foi necessário avaliar a interferência dessas substâncias na determinação de sofosbuvir em plasma humano. A dipirona, por sua vez, foi avaliada na forma de seu principal metabólito, a 4-N-metilaminoantipirina (4-MAA). Além dessas substâncias, a interferência da nicotina (NIC) e cafeína (CAF) também foram avaliadas, conforme exigido pela Resolução RDC nº 27 de 17/maio/2012 da ANVISA. Os ensaios para a avaliação dessa possível interferência são: Teste de efeito de matriz contendo fármacos interferentes/concomitantes (TEMFC) e Teste de seletividade contendo fármacos interferentes/concomitantes (TSEFC).

A solução mestre (SME) e as soluções de trabalho das substâncias interferentes/concomitantes foram preparadas de forma similar ao preparo das soluções de sofosbuvir, ou seja, por meio de pesagem do padrão e diluição em Metanol/água (80:20) (v/v). A partir da SME, soluções mais diluídas foram preparadas, conforme Tabela 5, originando uma solução (STB-MIX) contendo paracetamol, metoclopramida, dipirona, nicotina e cafeína a qual foi utilizada nos ensaios e descartada logo em seguida, pois não foi realizada a determinação da estabilidade das mesmas.

Tabela 5 - Guia de preparo das soluções mix de fármacos concomitantes

Código da solução	Concentração da solução (ng/mL)	Volume preparado da solução (mL)	Volume pipetado (mL)	Volume de diluente (mL)	Solução utilizada no preparo
SME-CAF	1.000.000,00	2,00	-	2,00	Padrão
SME-4-MAA	1.000.000,00	2,00	-	2,00	Padrão
SME-PCT	1.000.000,00	2,00	-	2,00	Padrão
SME-NIC	1.000.000,00	2,00	-	2,00	Padrão
SME-MTC	1.000.000,00	2,00	-	2,00	Padrão
STB-MTC01	10.000,00	10,00	0,10	9,90	SME-MTC
STB-NIC01	10.000,00	10,00	0,10	9,90	SME-NIC
STB-MIX	20.000,00 (CAF)	10,00	0,20	9,80	SME-CAF
	40.000,00 (4-MAA)	10,00	0,40	9,60	SME-4MAA
	40.000,00 (PCT)	10,00	0,40	9,60	SME-PCT
	200,00 (MTC)	10,00	0,20	9,80	STB-MTC01
	200,00 (NIC)	10,00	0,20	9,80	STB-NIC01

Fonte: (Do autor, 2017).

Legenda: CAF – cafeína; 4-MAA - 4-N-metilaminoantipirina; PCT – paracetamol; MTC – metoclopramida; NIC - nicotina

A concentração de cada substância na solução mix foi estabelecida a partir de dados da concentração plasmática máxima (C_{max}) de cada composto, o que permitiu avaliar a interferência desses compostos quando presentes em altas concentrações.

3.4.3 Confeção das amostras em matriz biológica

3.4.3.1 Curva de calibração e controles de qualidade para uso geral

As soluções de trabalho do sofosbuvir foram adicionadas na matriz biológica branca para confecção dos padrões de calibração e dos controles de qualidade em matriz biológica, tendo sido diluídas dez vezes. O preparo dos padrões e dos controles de qualidade em plasma foi realizado em um microtubo ao qual foi adicionado, com o auxílio de micropipeta calibrada, 0,90 mL de plasma branco e 0,10 mL de solução de trabalho (STB) contendo o analito sofosbuvir. Então, O microtubo foi agitado a fim de promover a homogeneização.

A curva de calibração em matriz foi construída utilizando oito soluções de trabalho (STB's), desde a STB01 à STB08, compreendendo oito pontos distintos. Essa curva foi utilizada para a quantificação das amostras dos voluntários e dos

controles de qualidade. As tabelas a seguir, Tabela 6 e Tabela 7, apresentam a confecção das amostras para a curva de calibração e controles de qualidade em matriz biológica.

Tabela 6 - Guia de preparo da curva de calibração em matriz biológica (CCAL)

Código do padrão de calibração	Concentração da solução (ng/mL)	Volume preparado (mL)	Volume pipetado (mL)	Volume de matriz biológica branca (mL)	Solução utilizada no preparo	Concentração plasmática (ng/mL)
CCAL08	10.000,00	1,00	0,10	0,90	STB08	1.000,00
CCAL07	8.000,00	1,00	0,10	0,90	STB07	800,00
CCAL06	4.000,00	1,00	0,10	0,90	STB06	400,00
CCAL05	2.000,00	1,00	0,10	0,90	STB05	200,00
CCAL04	1.000,00	1,00	0,10	0,90	STB04	100,00
CCAL03	100,00	1,00	0,10	0,90	STB03	10,00
CCAL02	15,00	1,00	0,10	0,90	STB02	1,50
CCAL01	5,00	1,00	0,10	0,90	STB01	0,50

Fonte: (Do autor, 2017). Fator de diluição para concentração em plasma: 10 vezes

Tabela 7 - Guia de preparo dos controles de qualidade em matriz biológica

Código do controle de qualidade	Concentração da solução (ng/mL)	Volume preparado (mL)	Volume pipetado (mL)	Volume de matriz biológica branca (mL)	Solução utilizada no preparo	Concentração plasmática (ng/mL)
CQD	32.000,00	1,00	0,10	0,90	STB09	3.200,00
CQA	8.000,00	1,00	0,10	0,90	STB07	800,00
CQM	4.000,00	1,00	0,10	0,90	STB06	400,00
CQC	1.000,00	1,00	0,10	0,90	STB04	100,00
CQB	15,00	1,00	0,10	0,90	STB02	1,50
LIQ	5,00	1,00	0,10	0,90	STB01	0,50

Fonte: (Do autor, 2017). Fator de diluição para concentração plasmática: 10 vezes

3.4.3.2 Amostras para uso no ensaio de avaliação da seletividade e efeito de matriz contendo fármacos concomitantes/substâncias interferentes

O preparo das amostras foi realizado em um microtubo ao qual foi adicionado, com o auxílio de micropipeta calibrada, 0,10 mL de plasma branco e 0,50 mL de

solução de trabalho contendo todas as substâncias interferentes/concomitantes (STB-MIX), Tabela 8. Então, o microtubo foi agitado a fim de promover a homogeneização.

Tabela 8 – Guia de preparo das amostras em matriz biológica para os testes com fármacos concomitantes/interferentes

Substância concomitante/interferente	Concentração da solução (ng/mL)	Volume pipetado (mL)	Volume de matriz biológica branca (mL)	Solução utilizada no preparo	Concentração plasmática máxima (ng/mL)
CAF	20.000,00	0,05	0,10	STB-MIX	10.000,00
4-MAA	40.000,00			STB-MIX	20.000,00
PCT	40.000,00			STB-MIX	20.000,00
MTC	200,00			STB-MIX	100,00
NIC	200,00			STB-MIX	100,00

Fonte: (Do autor, 2017)

Legenda: CAF – cafeína; 4-MAA - 4-N-metilaminoantipirina; PCT – paracetamol; MTC – metoclopramida; NIC – nicotina.

3.4.4 Preparo de soluções adicionais

Ao longo do desenvolvimento da metodologia foram definidas as seguintes soluções visto que apresentaram os melhores resultados nos testes realizados. São elas: fase móvel A (aquosa), a fase móvel B (orgânica), a solução de lavagem do sistema cromatográfico, a solução de extração e solução de ressuspensão das amostras.

3.4.4.1 Preparo de fase móvel (FMA e FMB)

A fase móvel A (aquosa) - solução aquosa com 0,1 % ácido fórmico (v/v) - foi preparada em balão volumétrico de 1000 mL. Após a adição de aproximadamente 500 mL de água tipo I no balão, adicionou-se 1 mL de ácido fórmico e avolumou-se o balão até a marca de referência de 1000 mL. A solução, foi homogeneizada e transferida para um frasco devidamente rotulado e foi submetida ao ultrassom, por 5 minutos para efetuar a desgaseificação. A fase móvel B (orgânica) – metanol/acetonitrila (80:20) (v/v) - foi preparada utilizando-se uma proveta de 1000 mL. Foi transferido 800 mL de metanol grau HPLC para um frasco de 1000 mL e 200 mL de acetonitrila. A solução

foi homogeneizada e transferida para um frasco devidamente rotulado e foi submetida ao ultrassom, por 5 minutos, para efetuar a desgaseificação.

3.4.4.2 *Solução de lavagem (SL)*

A solução de lavagem do sistema cromatográfico – metanol - foi preparada utilizando-se uma proveta de 1000 mL. Transferiu-se 1000 mL de metanol grau HPLC para um frasco de devidamente rotulado, que foi submetido ao ultrassom, por 5 minutos, para efetuar a desgaseificação.

3.4.4.3 *Solução de extração (SE)*

A solução de extração das amostras – TBME/Acetato de etila (70:30) (v/v) - foi preparada utilizando-se uma proveta de 500 mL. Foi transferido 350 mL de Éter metil terc-butílico (TBME) grau HPLC para um frasco de 500 mL e 150 mL de Acetato de Etila grau HPLC. A solução foi homogeneizada e transferida para um frasco devidamente rotulado.

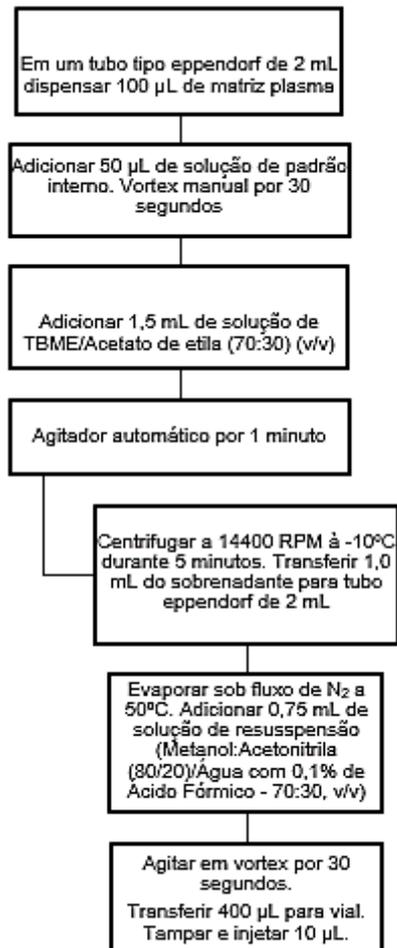
3.4.4.4 *Solução de ressuspensão (SD ou SR)*

A solução de ressuspensão das amostras, também denominada solução de diluição das amostras extraídas, possui a mesma composição da fase móvel definida para a metodologia - composta por (solvente B) metanol/acetonitrila (80:20) (v/v) e (solvente A) 0,1 % ácido fórmico em água, na proporção de solvente B/solvente A (70:30) (v/v). Essa solução foi preparada utilizando-se uma proveta de 100 mL. Com a proveta, foi transferido 70 mL de metanol/acetonitrila (80:20) (v/v) para um frasco de 100 mL e 30 mL solução aquosa com 0,1 % ácido fórmico (v/v). Então, a solução foi homogeneizada e transferida para um frasco devidamente rotulado.

3.4.5 Fluxograma de preparo/extração das amostras em matriz biológica

De forma esquemática, o processamento/extração das amostras encontra-se no fluxograma, Figura 13.

Figura 13 - Fluxograma representando as etapas de extração das amostras



Fonte: (Do autor, 2017).

Detalhadamente, a extração/processamento das amostras pode ser descrito nas seguintes etapas. Em um microtubo de 2 mL foram adicionados 100 µL de plasma e 50 µL da solução de trabalho de padrão interno (cimetidina – 1000,00 ng/mL) e promoveu-se uma agitação de 30 segundos em vórtex manual. Adicionou-se 1500 µL da solução de extração TBME/Acetato de etila (70:30) (v/v), e promoveu-se uma agitação vigorosa durante 1 minuto em agitador automático. Então, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos à 14400 rotações por minuto (RPM) à -10 °C. Após a

centrifugação, o volume de 1000 µL da fase orgânica (sobrenadante) foi transferido para outro microtubo de polipropileno e submetido ao fluxo de nitrogênio para evaporação à 50 °C. O resíduo foi ressuspensionado com 750 µL de solução de ressuspensão, composta por (solvente B) metanol/acetonitrila (80:20) (v/v) e (solvente A) 0,1 % ácido fórmico em água, solvente B/solvente A (70:30) (v/v). Em seguida agitou-se por 30 segundos em agitador automático. Uma alíquota de 400 µL foi transferida para vial contendo *insert* e 10 µL foram injetados e analisados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série com ionização por eletronebulização positiva usando a técnica de varredura de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM).

A preparação descrita foi realizada da mesma forma para os padrões de calibração (CCAL) em matriz biológica, para os para os controles de qualidade em matriz biológica (CQ's) e para as amostras dos voluntários do estudo. Para as amostras de voluntários que foram diluídas e para o controle de qualidade de diluição o processamento seguiu o mesmo procedimento descrito. Entretanto, em vez de alíquotar 100 µL do plasma do voluntário ou 100 µL do controle de diluição, alíquotou-se 25 µL de plasma ao qual foi adicionado 75 µL de plasma branco, diluindo-se a amostra 4 vezes antes do processo de extração.

3.5 Validação da metodologia bioanalítica

A metodologia bioanalítica foi validada seguindo requisitos resolução da ANVISA RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Ela determina as exigências mínimas para a validação de métodos bioanalíticos (aqueles em que há utilização de material biológico como plasma, sangue, urina, etc.) empregados em estudos para registro e pós-registro de medicamentos no Brasil.

Os ensaios descritos a seguir foram realizados no sistema de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) formados pelos componentes mencionados no item 3.2.2.

3.5.1 Teste de seletividade – TSE

A resolução RDC nº 27 determina que a seletividade seja avaliada através da análise de amostras brancas, isto é, isenta de analito e de padrão interno de, no

mínimo, seis fontes distintas, demonstrando a ausência de interferência de compostos endógenos. Assim, foi utilizado o branco de matriz biológica de seis indivíduos diferentes o qual foi submetido ao processo de extração desenvolvido. Então, o mesmo foi avaliado quanto à presença de interferência no tempo de retenção do sofosbuvir e da cimetidina. É preconizado que os brancos sejam provenientes de quatro amostras normais (branco de plasma normal, BPN), um lipêmico (branco de plasma lipêmico, BPL) e um hemolisado (branco de plasma hemolisado, BPH). Os resultados obtidos foram comparados com os resultados de amostras extraídas/processadas do limite inferior de quantificação (LIQ), preparados conforme o procedimento descrito no item 3.4.3.1. Para o sofosbuvir, a interferência máxima aceita pela resolução RDC nº 27 é de 20 % da área do LIQ e para a cimetidina a interferência máxima aceita é de 5 % da área do padrão interno.

3.5.2 Teste de seletividade contendo fármacos concomitantes/interferentes – TSEFC

A resolução determina que seja avaliada interferência de metabólitos, fármacos de uso concomitante, produtos de degradação formados durante o preparo da amostra, nicotina, cafeína e outros possíveis interferentes na metodologia bioanalítica. O ensaio objetiva verificar a seletividade através da análise de amostras brancas, isto é, isenta do analito e do padrão interno de, no mínimo, seis fontes distintas, isto é, seis indivíduos diferentes. As amostras branco devem ser de fontes de características distintas, assim como é exigido no teste do item 3.5.1. Entretanto, antes do início da extração, essas amostras são adicionadas de substâncias interferentes/concomitantes de forma que as substâncias interferentes participem de todo o processo da análise, desde a extração, separação cromatográfica e detecção, permitindo avaliar a interferência dessas substâncias na análise do composto de interesse.

Os resultados obtidos devem ser comparados com os resultados de amostras processadas do limite inferior de quantificação, preparados conforme o procedimento descrito no item 3.4.3.2.

No presente ensaio foram avaliados seis plasmas de fontes distintas, isto é, indivíduos distintos, sendo quatro normais, um lipêmico e um hemolisado. Os plasmas brancos foram utilizados para preparar amostras brancas adicionadas das substâncias interferentes/concomitantes. Para o estudo em questão, as substâncias

em questão foram a cafeína, a dipirona (avaliada na forma de seu principal metabólito 4-MAA), o paracetamol, a metoclopramida e a nicotina. Os seis plasmas também foram utilizados para o preparo de controles de qualidade correspondentes ao LIQ.

Uma solução contendo as substâncias concomitantes/interferentes (STB-MIX) foi preparada e uma alíquota de 50 µL foi adicionada à 100 µL de plasma branco de forma que as substâncias interferentes/concomitantes apresentassem as seguintes concentrações em matriz biológica: cafeína (CAF) igual a 10000 ng/mL, 4-MAA igual a 20000 ng/mL, paracetamol igual a 20000 ng/mL, metoclopramida (MTC) igual a 100 ng/mL e nicotina (NIC) igual a 100 ng/mL. Tais concentrações foram definidas com base em dados disponíveis na literatura (SUAREZ-KURTZ et al., 2001; BENOWITZ; HUKKANEN; JACOB III, 2009; TZACHEV & POPOV, 2010; LANGFORD et al., 2016, WHITE et al., 2016).

Então, as amostras de LIQ e os brancos adicionados das substâncias interferentes foram extraídas. Avaliou-se, nos brancos, a presença de interferentes no tempo de retenção do sofobuvir e da cimetidina. O critério de aprovação do ensaio é o mesmo do descrito no item 3.5.1.

3.5.3 Teste de efeito de matriz – TEM

Embora os padrões de calibração sejam confeccionados na matriz biológica do estudo, o que em tese eliminaria o efeito de matriz, a resolução determina a realização de um ensaio específico para avaliação do efeito de matriz. A legislação recomenda que se avaliem as amostras processadas de controle de qualidade baixo e controle de qualidade alto nas quais a adição do analito e do padrão interno ocorreram posteriormente ao processo de extração (CQB-FD e CQA-FD), isto é, neste ensaio o analito e o padrão interno não sofrem o processo de extração definido no desenvolvimento do método. Tais amostras são comparadas às soluções preparadas nas mesmas concentrações das amostras em matriz, isto é, CQB e CQA em solução. No referido ensaio, foram avaliadas oito bolsas de matriz distintas: quatro plasmas normais, dois lipêmicos e dois hemolisados. Com esses plasmas, foram preparadas amostras de controle de qualidade (CQB-FD e CQA-FD) cuja fortificação ocorrerá após o procedimento de extração. A resposta dos controles CQB-FD e CQA-FD foram comparados à média resposta das amostras em solução referentes ao CQB e ao CQA. Avaliou-se, o coeficiente de variação (CV) dos fatores de matriz normalizado para

cada nível de concentração, baixo e alto, que foi inferior a 15 %. A resolução determina que seja calculado o fator de matriz normalizado (FMN) por padrão interno (PI), conforme a fórmula a seguir:

$$\text{FMN} = \frac{\text{Área do analito em matriz}/\text{Área do PI em matriz}}{\text{Área do analito em solução}/\text{Área do PI em solução}}$$

3.5.4 Teste de efeito de matriz contendo fármacos concomitantes/interferentes – TEMFC

A resolução determina que amostras de controle de qualidade CQB-FD e CQA-FD sejam adicionadas de substâncias interferentes/concomitantes de forma que essas substâncias participem de todo o processo da análise, contemplando a extração, a separação cromatográfica e a detecção, permitindo-se avaliar a possível interferência desses compostos na análise. Tais amostras devem ser comparadas às soluções preparadas nas mesmas concentrações das amostras em matriz, isto é, CQB e CQA em solução. No referido ensaio, foram avaliadas oito bolsas de matriz distintas: quatro plasmas normais, dois lipêmicos e dois hemolisados. O procedimento de preparo das amostras e o critério de aprovação do ensaio é igual ao descrito no item 3.5.3. Além disso, também foi calculado o FMN conforme preconizado na legislação.

3.5.5 Teste de efeito residual – TER

Este ensaio verificou a ocorrência de arraste ou *carry over*. A legislação determina a injeção de uma amostra branco ser injetada, no mínimo, três vezes, sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma ou mais amostras processadas do limite superior de quantificação (LSQ).

No presente teste foram injetadas sequencialmente amostras processadas: uma amostra de branco, uma amostra de limite inferior de quantificação, uma amostra de limite superior de quantificação, uma amostra de branco e, por fim, mais uma amostra de branco. Os resultados das amostras branco foram comparados com aqueles obtidos de amostras processadas do LIQ. Avaliou-se, nos brancos, a presença de interferentes no tempo de retenção do sofobuvir e da cimetidina. Para o

sofosbuvir, a interferência máxima permitida pela resolução RDC nº 27 é de 20% da área do LIQ e para a cimetidina a interferência máxima aceita é de 5 % da área do padrão interno. No caso de inevitável efeito residual devem-se adotar procedimentos específicos a fim de controlar seu efeito, como modificação da solução de lavagem do sistema cromatográfico, evitando prejuízos na precisão e exatidão do método.

3.5.6 Linearidade – Avaliação da curva de calibração e escolha do método de ponderação – CCAL

A resolução preconiza a verificação de, no mínimo, três curvas de calibração, contendo seis amostras de diferentes concentrações. A avaliação foi feita a partir de padrões de calibração em matriz biológica os quais foram extraídos conforme definido durante o desenvolvimento da metodologia. A legislação também recomenda que se apresente uma justificativa científica para a faixa de concentração contemplada pela curva de calibração, faixa entre o limite inferior de quantificação (LIQ) e o limite superior de quantificação (LSQ). Além disso, a norma assegura a utilização da ponderação nos casos em que se verifique que a variância dos resíduos não seja constante na faixa de concentração proposta. Com o objetivo de avaliar a condição de homocedasticidade do método, foi calculada a variância dos níveis de concentração e o teste F foi aplicado. Assim, uma vez determinada a ocorrência da não homocedasticidade, os dados foram tratados por uma regressão linear ponderada. Uma vez confirmada a heterocedasticidade, a melhor ponderação ($1/y$, $1/x$, $1/y^2$, $1/x^2$) foi definida pela inspeção visual no gráfico do erro relativo percentual dos resíduos (ER %) versus concentração e pelo resultado do somatório dos valores absolutos do erro relativo percentual dos resíduos (somatório ER %). Selecionou-se a ponderação que com o menor valor de somatório ER % (ALMEIDA; CASTEL-BRANCO; FALCÃO, 2002). O ER % representa o percentual de erro de uma dada ponderação em relação à concentração nominal:

$$\text{ER \%} = \frac{(\text{concentração experimental} - \text{concentração nominal})}{(\text{concentração nominal})} \times 100$$

A norma também define os critérios de aprovação para cada ponto da curva de calibração: desvio menor ou igual a 20 % em relação à concentração nominal para os padrões de calibração no LIQ e desvio menor ou igual a 15 % em relação à

concentração nominal para os outros padrões de calibração. Além disso, a norma exige que, no mínimo 75 % dos padrões de calibração sejam aprovados conforme os critérios anteriores e que apresente, no mínimo, seis padrões de calibração de concentrações diferentes, incluindo o LIQ e o LSQ. Vale ressaltar que não é permitido incluir na equação da curva padrões de calibração que não atendam aos critérios de aprovação e que a curva de calibração deve ser recalculada sem este padrão.

No presente ensaio, a faixa de linearidade contemplando o limite inferior de quantificação (LIQ) e o maior nível de concentração da curva de calibração (LSQ) foi definida a partir de pesquisas na literatura. Foram definidos oito pontos de calibração, incluindo o LIQ e o LSQ e os parâmetros da curva foram obtidos através do *software* do espectrômetro de massas, o Analyst 1.6.1, incluindo o coeficiente de correlação (r) e os desvios em relação à concentração nominal. Além disso, foi verificada a necessidade de utilização de ponderação, a qual foi devidamente justificada. Cada ponto da curva de calibração foi preparado conforme o item 3.4.3.1.

3.5.7 Teste de precisão e exatidão – TPE

A legislação vigente exige que a precisão seja determinada em uma mesma corrida (precisão intracorrída ou repetibilidade) e em, no mínimo, três corridas diferentes (precisão intercorridas ou precisão intermediária). É determinado que seja realizada ao menos cinco replicatas de cada nível de concentração: LIQ (limite inferior de quantificação), CQB (controle de qualidade de baixa concentração), CQM (controle de qualidade de média concentração), CQA (controle de qualidade de alta concentração) e CQD (controle de qualidade de diluição). Na avaliação da precisão intercorridas devem ser contempladas corridas em dias distintos.

Segundo a norma, a precisão deve ser expressa como o coeficiente de variação (CV), que deve ser no máximo de 15 % exceto para o LIQ, para o qual se admite uma variação máxima de 20 %. Também é preconizado a determinação da exatidão em uma mesma corrida analítica (exatidão intracorrída) e em, no mínimo, três corridas diferentes (exatidão intercorridas). É exigido a avaliação de 5 replicatas, pelo menos, para cada nível de concentração: LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD. Para a avaliação da exatidão intercorridas dias distintos devem ser contemplados.

A exatidão é expressa como erro padrão relativo (EPR) ou desvio, que deve ser no máximo de $\pm 15\%$ do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual o erro máximo deve ser de $\pm 20\%$ do valor nominal.

No presente ensaio, foram preparadas 8 réplicas de controles de qualidade para cada nível de concentração (LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD) os quais foram quantificados com uma curva de calibração preparada e processada no mesmo dia dos controles. Para o CQD, em que se avalia o procedimento de diluição da amostra (teste de diluição em matriz biológica, TDMB), foi utilizado o fator de diluição de quatro vezes com o objetivo de se garantir a adequada quantificação de amostras que possam apresentar concentração acima do LSQ, sem a necessidade de extrapolação. Foram realizados ensaios de precisão e exatidão em três dias diferentes.

3.5.8 Estabilidade em matriz biológica

Neste item, as amostras de controle de qualidade foram preparadas e submetidas às condições em teste a fim de se avaliar a estabilidade do analito sofosbuvir nessas condições, simulando as condições pelas quais as amostras dos voluntários (amostras de concentração desconhecida) pudessem ser submetidas. A legislação exige a verificação das seguintes estabilidades: a estabilidade de curta duração (TEBCD), a estabilidade de pós-processamento (TEBPP), a estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento (TEBCCD) e a estabilidade de longa duração (TEBLD).

Após sua preparação, uma parte dos controles foram imediatamente processados e quantificados no ensaio denominado Teste de Quantificação Inicial (TQI). Nesse ensaio, os controles recém-preparados serviram para garantir que os resultados dos ensaios de estabilidade sejam devidos apenas à condição a qual os controles foram submetidos e não a uma falha no preparo dos mesmos, por exemplo. Assim, os controles de qualidade do TQI referendaram os controles preparados para os testes de estabilidade em matriz biológica.

Para os ensaios de estabilidade e para o TQI, a resolução determina que no mínimo três amostras de controle de sejam avaliadas. Para cada ensaio de estabilidade no presente trabalho, foram analisadas oito réplicas de controle de qualidade de cada nível (CQB e CQA) os quais foram preparados conforme item

3.4.3.1. Como critério de aprovação dos ensaios, adotou-se o exigido em legislação: desvio em relação ao valor nominal de até $\pm 15\%$ e CV de até 15% .

3.5.8.1 Teste de Quantificação Inicial – TQI

Neste ensaio, amostras de controle de qualidade recém-preparadas foram analisadas e apresentaram desvio em relação ao valor nominal de no máximo $\pm 15\%$ e CV de até 15% . Assim, o TQI realizado garantiu a correta avaliação dos ensaios de estabilidade em matriz biológica que foram realizados.

3.5.8.2 Teste de estabilidade de curta duração – TEBCD

A resolução determina que as amostras preparadas para o estudo de estabilidade de curta duração permaneçam à temperatura do laboratório antes de serem processadas e analisadas, sendo que o tempo em que permanecerem em temperatura ambiente deverá ser superior ao tempo que as amostras dos voluntários/participantes da pesquisa permanecerem.

No presente ensaio, foram analisadas oito amostras de CQB e oito amostras de CQA, após serem submetidos à temperatura ambiente sobre a bancada do laboratório. As amostras em teste (CQB's e CQA's preparados) e uma curva de calibração recém-preparada foram extraídas conforme o procedimento de extração definido no desenvolvimento. A especificação para esse teste é que as amostras de controle de qualidade devem apresentar desvio de $\pm 15\%$ em relação ao valor nominal e CV de até 15% .

3.5.8.3 Teste de estabilidade de pós-processamento - TEBPP

A legislação determina que as amostras de controle de qualidade processadas (já submetidas ao procedimento de extração) sejam mantidas sob as mesmas condições e por período de tempo superior ao das amostras processadas dos voluntários da pesquisa.

No ensaio em questão, controles de qualidade foram analisados após permanecerem no autoinjeter do equipamento, sendo quantificados com uma curva de calibração recém-preparada. O tempo em que os controles foram deixados no

autoinjeter foi maior do que o tempo compreendido entre o término de preparo das amostras de voluntários e o final da corrida analítica mais longa. A especificação para esse teste é que as amostras de controle de qualidade devem apresentar desvio de $\pm 15\%$ em relação ao valor nominal e CV de até 15% .

3.5.8.4 Teste de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento – TEBCCD

A norma determina que as amostras preparadas para o estudo de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento sejam congeladas (à temperatura em que as amostras dos voluntários da pesquisa foram armazenadas) e descongeladas à temperatura do laboratório, sendo então submetidos a ciclos de congelamento e descongelamento. O número de ciclos deve ser igual ou maior ao número de ciclos aos quais as amostras dos voluntários da pesquisa foram submetidas. Após o número de ciclos necessários, as amostras de controle previamente preparadas foram analisadas e quantificadas com uma curva de calibração recém-preparada, ou seja, que não sofreu ciclo de congelamento e descongelamento.

No presente ensaio, as amostras dos voluntários foram armazenadas à temperatura de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Foram realizados 7 ciclos de congelamento e descongelamento, que foi superior ao número de ciclos que as amostras dos voluntários sofreram. A especificação para esse teste é que as amostras de controle de qualidade devem apresentar desvio de $\pm 15\%$ em relação ao valor nominal e CV de até 15% .

3.5.8.5 Teste de estabilidade de longa duração – TEBLD

A resolução determina que as amostras de controle de qualidade preparadas para o estudo de estabilidade de longa duração sejam armazenadas em equipamento adequado (*freezer* $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, geladeira, etc.) por período que seja maior do que o período de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra do voluntário da pesquisa e a análise da última amostra do voluntário a fim de garantir a estabilidade das amostras e a confiabilidade dos resultados gerados. Após o tempo de armazenamento necessário, as amostras de controle de qualidade foram analisadas, sendo

quantificadas com uma curva de calibração recém-preparada. A especificação para esse teste é que as amostras de controle de qualidade devem apresentar desvio de $\pm 15\%$ em relação ao valor nominal e CV de até 15% .

3.5.9 Estabilidade em solução

Neste item, foram avaliadas as estabilidades das soluções do analito e do padrão interno em solução sob a temperatura do laboratório por um curto período de tempo (TEBCDS) e sob a temperatura de armazenagem, em freezer, por um longo período de tempo (TEBSTA). É preconizado que seja demonstrada a estabilidade do analito e do padrão interno em ao menos três amostras da solução de maior concentração e da solução de menor concentração.

No presente estudo, foram analisadas oito amostras para cada nível de concentração avaliado as quais foram comparadas com soluções recém-preparadas. A especificação para esse teste é que as amostras de controle de qualidade devem apresentar desvio de $\pm 10\%$ em relação às soluções recém-preparadas e CV de até 15% .

A estabilidade das soluções dos fármacos concomitantes (STB-MIX) não foi avaliada uma vez que foram utilizadas no dia de seu preparo, sendo descartadas logo após o uso.

3.5.9.1 *Teste de estabilidade de curta duração das soluções de trabalho – TEBCDS*

No teste de estabilidade de curta duração das soluções de trabalho, as soluções foram avaliadas quanto a sua estabilidade sob a temperatura do laboratório por um curto período de tempo. Foram preparadas oito amostras referentes a cada nível de concentração testado para o analito e para o padrão interno, sendo um nível de maior concentração para o analito e padrão interno e um nível de menor concentração para o para o analito e para o padrão interno, totalizando 32 amostras. Elas foram submetidas à temperatura do laboratório por determinado período de tempo e então foram comparadas com soluções de trabalho recém-preparadas. A média das áreas das soluções submetidas ao teste de estabilidade foi comparada com a média das áreas das soluções recém-preparadas. A especificação para esse teste é que as amostras de controle de qualidade devem apresentar desvio de $\pm 10\%$ em

relação às soluções recém-preparadas e CV de até 15 %. Nesse caso, as soluções são consideradas estáveis.

3.5.9.2 *Teste de estabilidade das soluções de trabalho armazenadas – TEBSTA*

No teste de estabilidade das soluções de trabalho armazenadas, as soluções foram avaliadas quanto a sua estabilidade sob a temperatura de armazenamento (em *freezer* - 70°C) por determinado período de tempo. Foram preparadas oito amostras referentes a cada nível de concentração testado para o analito e para o padrão interno, sendo um nível de maior concentração para o analito e padrão interno e um nível de menor concentração para o analito e padrão interno, totalizando 32 amostras. Elas serão submetidas à temperatura de armazenamento por determinado período de tempo e então foram comparadas com soluções de trabalho recém-preparadas. A média das áreas das soluções submetidas ao teste de estabilidade foi comparada com a média das áreas das soluções recém-preparadas. A especificação para esse teste é que as amostras de controle de qualidade devem apresentar desvio de $\pm 10\%$ em relação às soluções recém-preparadas e CV de até 15 %. Nesse caso, as soluções são consideradas estáveis.

3.6 Ensaio farmacocinético

A realização do ensaio farmacocinético necessitou de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e foi realizado em uma unidade hospitalar sob a tutela de profissionais habilitados. O parecer de número 2.078.605, emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Jaguariúna – FAJ, aprovou a realização de todas as etapas do ensaio. Sua condução foi pautada em padrões estabelecidos por diretrizes e normas nacionais e internacionais: o Guia Tripartite Harmonizado para boas práticas clínicas (1996) do Conselho Internacional de Harmonização (ICH); a resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) nº 466, de 12 de Dezembro de 2012 (possui diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos); a resolução nº 251, de 07 de Agosto de 1997 (aprova normas de pesquisa envolvendo seres humanos); a Declaração de Helsinque (1964) e suas revisões (possui princípios éticos que regem a pesquisa com seres humanos) e a Resolução da ANVISA 1170, de 19 de Abril de 2006 (guia para provas de biodisponibilidade).

3.6.1 Desenho do estudo

O estudo do sofosbuvir foi realizado com a participação de 69 voluntários saudáveis, homens e mulheres, com idade de 18 a 50 anos apresentando parâmetros bioquímicos normais os quais ingeriram, em jejum, um comprimido contendo 400 mg de sofosbuvir. Todos os participantes da pesquisa, cujo protocolo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética, assinaram o Termo de Consentimento livre e Esclarecido (TCLE).

Os participantes, inicialmente em jejum, tiveram o sangue coletado em tubos contendo EDTA como anticoagulante em tempos de coleta programados: tempo zero (antes da administração do medicamento), 0h:05 min, 0h:10 min, 0h:15 min, 0h:20 min, 0h:30 min, 0h:40 min, 0h:50 min, 01h:00 min, 01h:15 min, 01h:30 min, 01h:45 min, 02h:00 min, 02h:30 min, 03h:00 min, 03h:30 min, 04h:00 min, 04h:30 min, 05h:00 min, 06h:00 min, 08h:00 min e 10h:00 min, totalizando vinte e dois tempos.

3.6.1.1 Dados da população (sujeitos participantes da pesquisa)

Os dados referentes aos participantes da pesquisa encontram-se resumidos na Tabela 9. Segundo autodeclaração, os participantes da pesquisa foram classificados conforme a cor da pele como preta (2,9 %), parda (34,8 %) e branca (62,3 %). Em relação ao sexo, houve a participação de 49,3 % de indivíduos do sexo masculino e 50,7 % do sexo feminino.

Tabela 9 - Dados da população

Variável	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Altura (m)	1,67	1,67	0,09	1,48	1,86
Peso (Kg)	68,96	68,20	9,71	49,10	92,20
IMC (Kg/m ²)	24,68	25,56	2,71	19,13	28,49
Idade (anos)	31,80	30,00	9,46	18,00	50,00

Fonte: (Do autor, 2017).

3.6.1.2 Critérios de inclusão na pesquisa

Os critérios de inclusão na pesquisa são listados abaixo:

- Homens dispostos a utilizar métodos contraceptivos de barreira eficazes. Devem abster-se de doação de esperma durante todo o estudo e até 07 dias após a administração do medicamento em estudo;
- Mulheres não grávidas e que não estejam amamentando;
- Participantes do sexo feminino e em idade fértil deverão apresentar nível de β -HCG sérico consistente com o resultado negativo para gravidez e concordar em utilizar pelo menos um método contraceptivo aceitável, ou seja, um método de controle de natalidade, a partir de sua participação no estudo antes da administração do medicamento em estudo e até quatro semanas após a administração do medicamento em estudo. Os métodos contraceptivos aceitáveis (de controle de natalidade) são pelo menos um entre os seguintes: dispositivo intrauterino, com ou sem a liberação de hormônio local, diafragma, espermicidas, método de barreira, histerectomia, capuz cervical, esponja contraceptiva e/ou preservativos. Alternativamente pode ser usado um contraceptivo hormonal apropriado que não contenha estrogênios. A abstinência sexual é um estilo de vida alternativo e, voluntários que se comprometerem a praticar a abstinência poderão ser incluídos no estudo;
- Idade entre 18 a 50 anos;
- Índice de massa corpórea (IMC) compreendido entre 19,00 e 28,50 Kg/m²;
- Boas condições de saúde ou sem doenças significativas, a juízo de um profissional legalmente habilitado e de acordo com seguintes avaliações: história clínica, medidas de pressão arterial e pulso, exame físico e psicológico, eletrocardiograma e exames laboratoriais complementares;
- Capacidade de compreender a natureza e o objetivo do estudo, inclusive os riscos e efeitos adversos. Com a intenção de cooperar com o pesquisador e agir de acordo com os requerimentos de todo o ensaio, o que vem a ser confirmado mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.6.1.3 Critérios de exclusão na pesquisa

➤ Problemas relacionados com o fármaco:

- Hipersensibilidade conhecida ao fármaco em estudo (sofosbuvir) ou a compostos quimicamente relacionados;

➤ Doenças ou problemas de saúde:

- Histórico ou presença de doenças hepáticas, gastrintestinais ou outra condição que interfira com os processos de absorção, distribuição, excreção ou metabolismo do fármaco;
- Histórico de doença hepática, renal, pulmonar, gastrintestinal, epiléptica, hematológica ou psiquiátrica;
- Histórico de hipotensão ou hipertensão de qualquer etiologia que necessite de tratamento farmacológico; tem história ou teve infarto do miocárdio, angina e/ou insuficiência cardíaca;
- Achados eletrocardiográficos não recomendados para participação no estudo;
- Resultados dos exames laboratoriais fora dos valores considerados normais.

➤ Hábitos e dependências:

- É fumante;
- Inger mais do que 05 xícaras de café ou chá por dia;
- História de consumo abusivo de álcool ou de drogas.

➤ Condições encontradas nos dias/meses que antecedem o estudo:

- Uso de medicação regular dentro das 02 semanas que antecedem o início do tratamento do estudo, exceto anticoncepcional (para mulheres);

- Uso de qualquer medicação eventual dentro de 07 dias que antecedem o início da administração do medicamento do estudo, exceto dipirona e paracetamol;
- Internação por qualquer motivo nas 08 semanas anteriores à realização do estudo;
- Tratamento nos 03 meses prévios ao estudo com qualquer fármaco que apresente potencial tóxico conhecido nos grandes órgãos;
- Participação em qualquer estudo experimental ou ingestão de qualquer fármaco experimental dentro de 06 meses anteriores ao início deste estudo;
- Doação ou perda de 450 mL ou mais de sangue nos 03 meses que antecederam o estudo ou doação maior que 1500 mL dentro dos 12 meses anteriores;
- Consumo de fármacos indutores e/ou inibidores enzimáticos (CYP), organotóxicos ou com tempo de meia vida longo nas 04 semanas anteriores ao início do estudo;
- Consumo de medicamentos que contenham *Hypericum perforatum* (Erva de São João) nos 07 dias antes do início do estudo;
- Consumo de álcool nas 48 horas antecedentes ao início do estudo;
- Consumo de alimentos ou bebidas que contenham toranja (*grapefruit*) nas 48 horas anteriores a cada período de estudo.

➤ Outras condições:

- História de reações adversas graves a qualquer fármaco;
- Teste positivo de gravidez para as voluntárias mulheres;

3.6.1.4 Alimentação durante o confinamento

Durante o período em que os participantes da pesquisa permaneceram confinados na Unidade Hospitalar - período de aproximadamente 24 horas - uma alimentação padronizada foi servida. Porém, nas 10 horas anteriores e até 4 horas após a administração do medicamento, os participantes foram mantidos sem acesso aos alimentos, posto que o fármaco foi administrado em jejum.

Durante o estudo foram servidas as seguintes refeições, totalizando 2.208,5 Kcal:

- Jantar na noite do confinamento - arroz (200 g), feijão (110 g), creme de milho (60 g), frango grelhado (200 g), salada de batata doce (60 g), gelatina de abacaxi (100 g);
- Entre 04 e 05 horas após a administração do medicamento foi servido um almoço padronizado - arroz (200 g), feijão (110 g), picadinho de carne (200 g), batata corada (60 g), salada de cenoura ralada (60 g), pudim de baunilha (100 g);
- Entre 07 e 08 horas após a administração do medicamento foi servido um lanche da tarde padronizado - pão de forma (50 g), geléia de goiaba (15 g), margarina (10 g), maçã (80 g), iogurte de morango (100 mL);
- Entre 10 e 12 horas após a administração do medicamento foi servido um jantar padronizado – idem item anterior.

3.6.1.5 *Ingestão de líquidos durante o confinamento*

Os participantes não tomaram líquidos (água) no período compreendido entre 02 horas antes da administração do medicamento até o horário de ingestão programado, conforme definido a seguir:

- 200 mL de água mineral sem gás com o medicamento;

Após 02 horas da administração do medicamento foi liberada a ingestão de água.

3.6.2 Coleta de matriz biológica (MB) branca

Com o objetivo de obter matriz biológica (MB) branca, foram coletadas amostras de 30 mL de sangue de cada voluntário antes da administração do sofosbuvir. A matriz branca, ou seja, isenta do analito e do padrão interno, foi necessária para a etapa de desenvolvimento e validação da metodologia e também para etapa a confecção das curvas de calibração e dos controles de qualidade durante

a análise das amostras dos voluntários. Após a coleta do sangue, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 3000 RPM e o plasma foi encaminhado ao Serviço de Equivalência e Farmacocinética da Fundação Oswaldo Cruz (SEFAR) onde foram codificadas. Foram obtidos branco de plasma normal (BPN), branco de plasma lipêmico (BPL) e branco de plasma hemolisado (BPH). Os plasmas lipêmico e hemolisados são necessários para a avaliação da seletividade do método.

3.6.3 Coleta das amostras em tempos pré-estabelecidos

A coleta das amostras para a quantificação de sofosbuvir foi realizada nos tempos programados descritos no item 3.6.1. Para cada tempo, coletou-se 7,5 mL de sangue o qual foi centrifugado por 10 minutos a 3000 RPM. Então, as amostras de plasma foram encaminhadas SEFAR onde foram acondicionadas em *freezer* -70 °C até o momento de sua análise.

3.6.4 Acondicionamento e transporte das amostras

As amostras citadas nos item 3.6.2 e 3.6.3 foram armazenadas à temperatura de -70°C na unidade clínica até o momento de envio para o Centro Analítico (SEFAR). Seu transporte foi realizado em caixas térmicas contendo gelo seco e aparelho de *data logger* para monitoramento de temperatura. Foi realizado todo o controle necessário em conformidade com as Boas Práticas Laboratoriais (BPL).

3.6.5 Análise das amostras dos voluntários em lotes

As amostras biológicas foram analisadas após desenvolvimento e validação da metodologia bioanalítica. A resolução RDC n° 27 determina que o método aplicado à análise das amostras em estudo deve ser o mesmo método validado, incluindo todas as condições previamente validadas. A resolução também preconiza a introdução de controles de qualidade em cada corrida analítica em número superior a 5 % do número de amostras em estudo, sendo distribuídos de forma uniforme no lote. No presente estudo, foram inseridos controles de qualidade em cada corrida de forma a atender o exigido pela resolução. Além disso, apenas as amostras de concentração entre o LIQ e o LSQ foram quantificadas: as concentrações abaixo do LIQ foram reportadas como

0 (zero) e as amostras de concentração superior ao LSQ foram ser diluídas e reanalisadas em uma corrida contendo o CQD. Foram analisadas amostras de 69 voluntários (22 amostras por voluntário) em corridas analíticas contendo: duas amostras de BPN; duas amostras de BPZ; 44 amostras de 2 voluntários; curva de calibração em duplicata preparada em matriz biológica e oito controles de qualidade de concentrações correspondentes ao CQB, CQC, CQM e CQA. Foi adotada a seguinte especificação para aprovação de uma corrida: no mínimo 67 % do total de controles e no mínimo 50 % dos controles de cada nível de concentração devem apresentar desvio menor ou igual a 15 % em relação ao valor nominal. Além disso, a curva de calibração deve atender aos critérios demonstrados no item 3.5.6. Para as amostras BPN e BPZ, a interferência máxima aceita foi de máximo 20 % do LIQ para o sofosbuvir e no máximo de 5 % de interferência para a cimetidina, conforme preconizado pela norma. A partir dos resultados obtidos foram determinados os parâmetros farmacocinéticos do medicamento contendo 400 mg de sofosbuvir na população brasileira.

3.6.6 Determinação dos parâmetros farmacocinéticos

Após as análises das amostras dos voluntários, os dados de concentração plasmática de sofosbuvir foram tratados no *software* Phoenix WinNolin versão 6.3 (Certara®, USA) o qual realizou os cálculos de estatística descritiva relacionada ao estudo da formulação de sofosbuvir.

Seguem abaixo os parâmetros farmacocinéticos, que foram determinados por análise não compartimental:

- $C_{m\acute{a}x}$ – maior concentração plasmática atingida pelo fármaco – calculado a partir da análise da curva de concentração versus tempo;
- $T_{m\acute{a}x}$ - tempo em que é observada a maior concentração plasmática do fármaco ($C_{m\acute{a}x}$) – calculado a partir da análise da curva de concentração versus tempo;
- ASC_{0-t} - área sob a curva do tempo zero até o último tempo de coleta – calculada pelo método dos trapezóides;
- $ASC_{0-\infty}$ - área sob a curva do tempo zero ao tempo infinito – calculada pela fórmula $ASC_{0-\infty} = ASC_{0-t} + Ct/K_e$, onde Ct é a última concentração determinada experimentalmente e K_e é a constante de eliminação do fármaco;

- K_e - constante de eliminação do fármaco - obtida através de regressão;
- $T_{1/2\beta}$ - tempo de meia vida de eliminação do fármaco – calculado pela fórmula $T_{1/2\beta} = 0,693/K_e$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento de metodologia bioanalítica

Iniciou-se o desenvolvimento da metodologia bioanalítica através de um levantamento bibliográfico com o objetivo de obter informações sobre a determinação de sofosbuvir em plasma humano, e assim, permitir o desenvolvimento de um método que apresentasse as condições de análise adequadas à realidade do laboratório.

Diversos trabalhos foram consultados durante esta etapa de desenvolvimento da metodologia e verificou-se que maior parte deles utilizou a espectrometria de massas em modo positivo e detecção por MRM, monitorando as transições de 530,21>243,21, 530,21>243,03 e 530,4>243,2. Como forma de preparo de amostras, a extração líquido-líquido utilizando éter metil terc-butílico ou acetato de etila foi a técnica utilizada. Além disso, observou-se que os autores utilizaram diferentes padrões internos, entre eles a eplerenona e o daclatasvir (REZK; BASALIOUS; AMIN, 2016; REZK *et al.*, 2016; ABDALLAH; ABDEL-MEGIED; GOUDA, 2017).

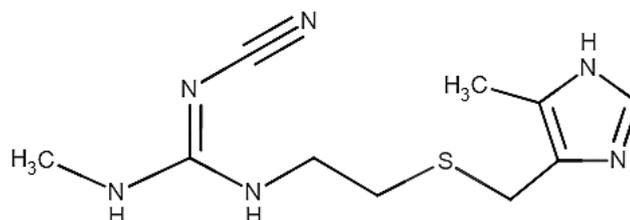
Em relação aos trabalhos cujo modo de ionização foi negativo, observou-se que a técnica de extração líquido-líquido também foi adotada, utilizando-se o dietil-éter como solvente. Ademais, a técnica de varredura selecionada nestes trabalhos foi mais simples e menos seletiva, sendo realizada por monitoramento seletivo de íons (SIM) em que foram analisados os íons de 529 (íon precursor) e 287 (fragmento). Como padrão interno, foi adotado o barbitúrico hexobarbital (BAHRAMI *et al.*, 2016; MIRAGHAEI *et al.*, 2017).

Além dos estudos mencionados, também foi consultado o trabalho de Rezk, Basalious e Karim (2015), executado no Egito, o qual também foi uma grande fonte de consulta para o desenvolvimento da metodologia proposta no presente trabalho. Os autores do referido estudo desenvolveram e validaram uma metodologia para a quantificação de sofosbuvir e seu metabólito GS-331007 em plasma humano por LC-MS/MS em modo positivo e utilizando a famotidina, um antagonista de receptor H₂, como padrão interno, Figura 14. O trabalho foi elaborado conforme as determinações do FDA e mostrou-se linear na faixa de 10,00 ng/mL a 2500,00 ng/mL de sofosbuvir em plasma, a qual foi adequada para a quantificação das amostras dos voluntários, uma vez que o C_{max} observado foi de 1860,1 ng/mL. Foi utilizado um espectrômetro de massas operando em modo positivo e varredura de íons por MRM em que foi

monitorada a transição de m/z 530,21>243,03 para o sofosbuvir. Durante o procedimento de infusão, descrito em detalhes no item 4.1.1, observou-se que o modo positivo apresentou maior estabilidade e que a transição 530,22>243,10 apresentou-se com maior intensidade, sendo selecionada para o desenvolvimento deste trabalho, o que está em perfeito acordo com o trabalho de Rezk, Basalious e Karim (2015).

O laboratório dispunha de um análogo da famotidina (Figura 14), a cimetidina (Figura 15), que foi selecionada como padrão interno, visto que os resultados obtidos foram satisfatórios. Selecionou-se a transição mais estável de 253,17>117,21. Ela é um antagonista do receptor H₂ e é estruturalmente semelhante à famotidina. Trata-se do protótipo dos antagonistas seletivos de receptores H₂, sendo a famotidina seu fármaco *me-too*⁹. A famotidina foi desenvolvida com base em modificações estruturais na cimetidina, o que permitiu manter a atividade em receptores H₂ (BARREIRO; FRAGA, 2015).

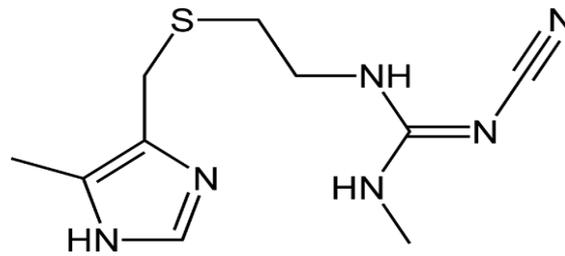
Figura 14 – Estrutura química da famotidina



Fonte: (WISHART *et al.*, 2006).

⁹ Fármaco *me-too* é uma substância estruturalmente muito similar a um fármaco conhecido, com pequenas diferenças farmacoterapêuticas. A busca por fármacos *me-too* é uma estratégia muito utilizada pela indústria farmacêutica para a descoberta de novos fármacos (BARREIRO & FRAGA, 2015).

Figura 15 - Estrutura química da cimetidina



Fonte: (WISHART *et al.*, 2006).

O método desenvolvido por Rezk, Basalious e Karim (2015) foi executado com base em cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC), utilizando uma coluna C18 de dimensões reduzidas (Acquity UPLC HSS 50x2,1 mm e 1,8 μm) e capaz de suportar altas pressões. A fase móvel utilizada apresentou-se 50 % orgânica (acetonitrila) e 50 % aquosa (água com ácido fórmico à 0,1 %). Esse tipo de cromatografia, composta por fases estacionárias porosas com partículas de tamanho menor ou igual a 2 μm , viabiliza altas velocidades lineares de fase móvel, alta resolução e um curto tempo de análise. Porém, o reduzido tamanho da partícula acarreta em elevação significativa na pressão cromatográfica a qual demanda uma instrumentação diferenciada, capaz de suportar altíssimas pressões (MALDANER & JARDIM, 2012). Como a instrumentação do laboratório não é adequada ao uso de colunas de UHPLC, os testes foram realizados com as colunas de partículas de 5 μm que estavam disponíveis: Omnispher (C18 150x4,6 mm) e Gemini-NX (C18 50x4,6 mm).

Os ensaios iniciais, conforme descrito nos itens 4.1.2 e 4.1.3, mostraram um melhor resultado utilizando a coluna Gemini-NX, uma vez que ela produziu um melhor formato de pico e com o tempo de corrida pequeno, o que foi extremamente adequado para os objetivos propostos. Já a coluna Omnispher produziu uma distorção do pico cromatográfico. Além das diferenças dos tamanhos entre as duas colunas, outra possível causa de diferença entre os resultados foi a carga de carbono. Enquanto a Gemini-NX possui 14 % de carga de carbono, a Omnispher apresenta 22 %. Assim, a coluna de maior comprimento, por ser mais hidrofóbica, pode ter gerado uma maior retenção do sofobuvir e, dessa forma, pode ter ocasionado a distorção que foi observada no pico cromatográfico (WAHAB; PATEL; ARMSTRONG, 2017). Simultaneamente aos ensaios com diferentes colunas cromatográficas, também

foram testadas composições de fase móvel e solventes de extração, a fim de alcançar uma condição ideal para a análise.

Além das condições instrumentais, também foi necessário o estabelecimento de uma faixa de concentrações para o desenvolvimento do trabalho. Inicialmente, definiu-se uma ampla faixa, contemplando as concentrações de 10,00 ng/mL a 3000,00 ng/mL de sofosbuvir em plasma, visto que a expectativa era de que os voluntários brasileiros também apresentassem o C_{max} superiores a 1000,00 ng/mL, conforme verificado em outros trabalhos publicados (REZK; BASALIOUS; KARIM, 2015; BAHRAMI et al., 2016; REZK et al., 2016). Logo, uma faixa com grande amplitude atenderia ao objetivo. Uma vez definida a faixa linear de trabalho, deu-se andamento aos ensaios e toda a validação foi realizada utilizando-se essa ampla faixa de trabalho. Então, iniciou-se a análise das amostras dos voluntários do ensaio farmacocinético. Para a surpresa, embora os trabalhos mencionados também tenham adotado a dose de 400 mg de sofosbuvir, as concentrações plasmáticas obtidas pelas análises das amostras dos seis primeiros voluntários foram bem abaixo do esperado. O valor de médio de C_{max} foi de 386 ng/mL, o que exigiu a definição de uma nova faixa de trabalho. Portanto, foi necessário, revalidar toda a metodologia e iniciar novamente a análise das amostras dos voluntários. Definiu-se, então, uma faixa de 0,50 ng/mL a 1000,00 ng/mL de sofosbuvir em plasma a qual se mostrou adequada para a quantificação das amostras dos voluntários do estudo.

4.1.1 Otimização dos parâmetros no espectrômetro de massas

Os procedimentos de infusão e FIA, que são fundamentais para o estabelecimento dos parâmetros de análise no espectrômetro de massas, resultaram nos dados apresentados nas tabelas a seguir (Tabela 10 e Tabela 11).

Tabela 10 - Condições do Espectrômetro de massas - parâmetros individuais dos íons monitorados em MRM no modo positivo definidos após a realização da infusão

Substância	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Dwell Time (msec)	DP (V)	CE (V)	EP (V)	CXP (V)	IS (V)
Sofosbuvir	530,22	243,10	150	81	25	10	8	5500
Cimetidina	253,17	117,21	150	46	23	10	10	

Fonte: (Do autor, 2017).

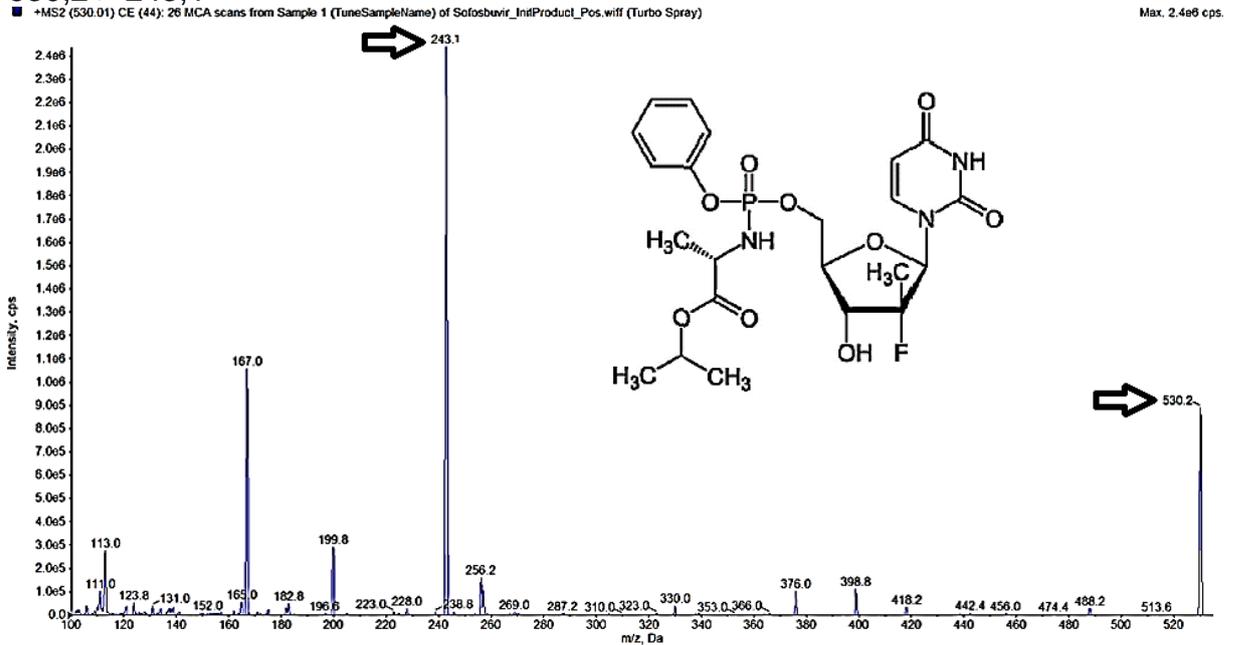
Tabela 11 - Condições do Espectrômetro de massas – parâmetros dependentes da fonte de ionização definidos após a realização do FIA

Identificação	Descrição
Temperatura da fonte, (TEM) (°C)	600
<i>Cad gas</i> (CAD)	<i>Medium</i>
<i>Curtain gas</i> (CUR)	10
<i>Ion source gas 1</i> (GS1)	50
<i>Ion source gas 2</i> (GS2)	45

Fonte: (Do autor, 2017).

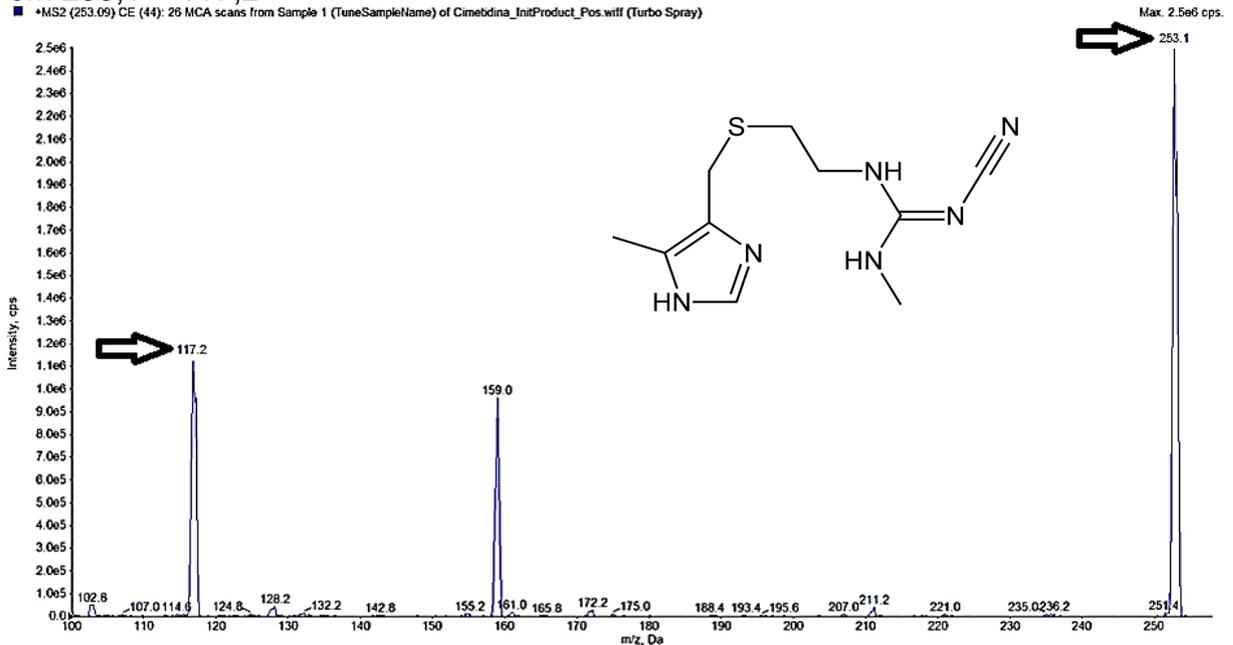
Portanto, os procedimentos de infusão e FIA viabilizaram a confecção de um método de varredura MRM cujos parâmetros de análise apresentaram a máxima resposta para os compostos de interesse. Por esse motivo, esses procedimentos são indispensáveis nessa etapa inicial de desenvolvimento de metodologia bioanalítica por espectrometria de massas. As figuras representadas a seguir (Figura 16 e Figura 17), são os espectros do sofosbuvir e da cimetidina observados durante a etapa de otimização.

Figura 16 - Espectro da transição de íons do analito sofosbuvir ($C_{22}H_{29}FN_3O_9P$) em $530,2 > 243,1$



Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 17 - Espectro da transição de íons do padrão interno cimetidina (C₁₀H₁₆N₆S) em 253,1 > 117,2



Fonte: (Do autor, 2017).

4.1.2 Otimização dos parâmetros cromatográficos

Uma vez realizado o procedimento de infusão e FIA e, com isso, determinados os parâmetros essenciais de cada composto a ser analisado, realizou-se a otimização de parâmetros relacionados à cromatografia. Foram realizados testes com diferentes colunas cromatográficas, fluxo, proporção e composição de fase móvel. A partir dos resultados desses testes foram estabelecidos importantes parâmetros da metodologia bioanalítica desenvolvida: a fase móvel aquosa (FMA), fase móvel orgânica (FMB) e solução de lavagem do autoinjeter (SL). A Tabela 12 ilustra as colunas utilizadas para a realização dos testes.

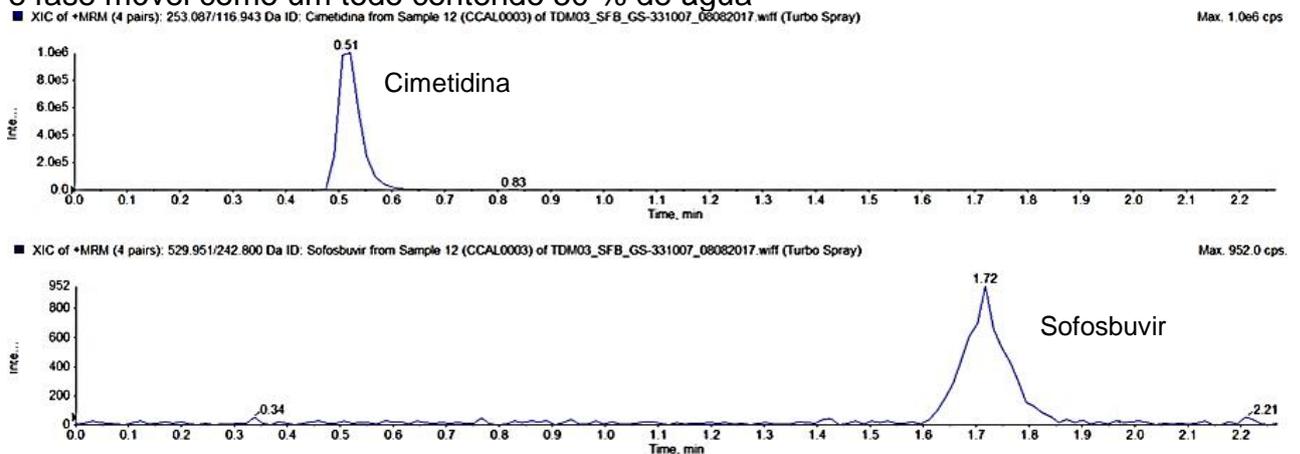
Tabela 12 - Relação de colunas cromatográficas testadas durante o desenvolvimento do método bioanalítico

Coluna	Especificações técnicas	Fabricante
Omnispher	C18 150 x 4,6 mm, 5 µm	Agilent
Gemini-NX	C18 50 X 4,6 mm, 5 µm	Phenomenex

Fonte: (Do autor, 2017).

Num primeiro momento, optou-se por utilizar a mesma composição de fase móvel do trabalho dos autores Rezk, Basalious e Karim (2015), utilizando-se uma coluna C18 de 50 mm de comprimento e a fase móvel composta por (solvente A) 0,1 % ácido fórmico em água e (solvente B) acetonitrila, solvente A/solvente B (50:50) (v/v), revelando-se uma condição pouco satisfatória para o sofosbuvir, conforme cromatograma abaixo, Figura 18.

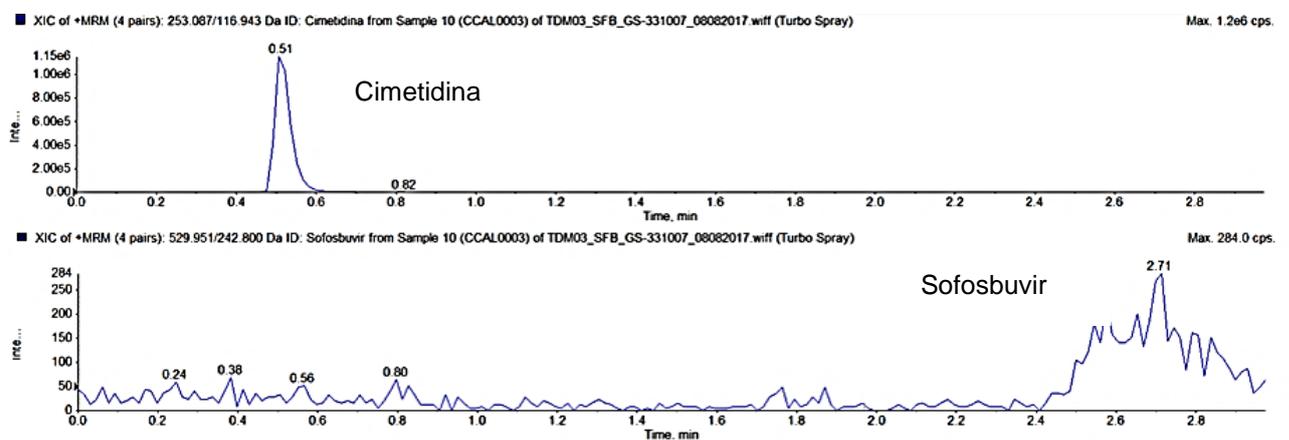
Figura 18 - Cromatogramas obtidos nos testes iniciais de cromatografia. Coluna Gemini C18 de 50 mm de comprimento. Fase móvel B, contendo 100 % de acetonitrila e fase móvel como um todo contendo 50 % de água



Fonte: (Do autor, 2017).

Em vista do resultado anterior optou-se por testar uma coluna com 150 mm de comprimento e a fase móvel idêntica à utilizada previamente. O resultado não foi satisfatório como pode ser visto na Figura 19.

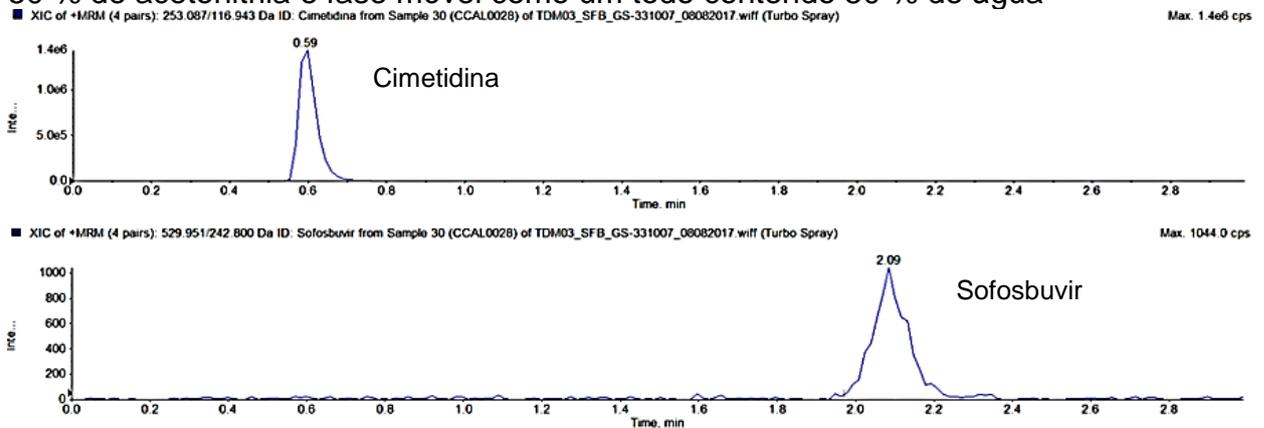
Figura 19 - Cromatogramas obtidos nos testes iniciais de cromatografia. Coluna Omnispher C18 de 150 mm de comprimento. Fase móvel B, contendo 100 % de acetonitrila e fase móvel como um todo contendo 50 % de água



Fonte: (Do autor, 2017).

Então, optou-se por retornar com a coluna de 50 mm de comprimento e adicionou-se metanol à fase B, utilizando uma a fase móvel composta por (solvente A) 0,1 % ácido fórmico em água e (solvente B) acetonitrila/metanol (50:50) (v/v), solvente A/solvente B (50:50) (v/v), mostrando melhora nos resultados, com o pico de sofosbuvir mais fino e mais intenso quando comparado ao pico do primeiro teste. Vide resultado na Figura 20.

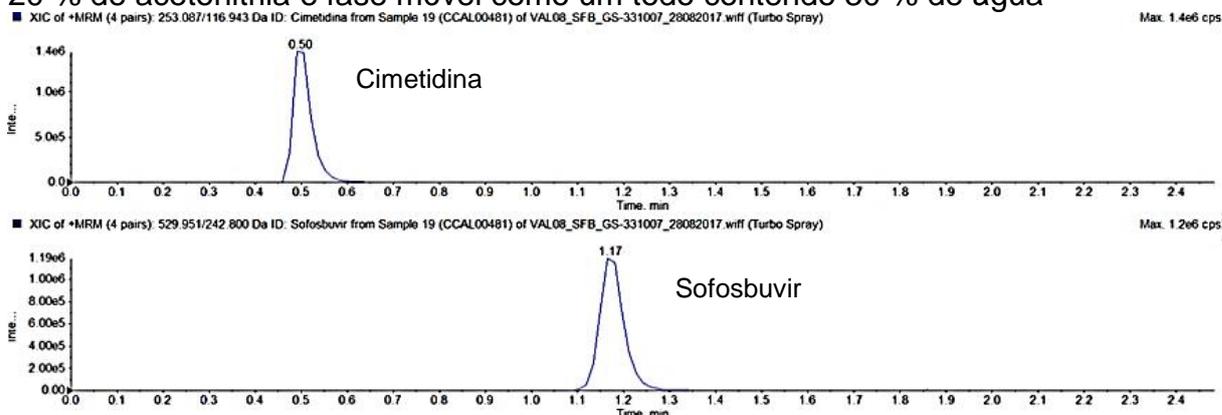
Figura 20 - Cromatogramas obtidos nos testes iniciais de cromatografia. Coluna Gemini C18 de 50 mm de comprimento. Fase móvel B, contendo 50 % de metanol e 50 % de acetonitrila e fase móvel como um todo contendo 50 % de água



Fonte: (Do autor, 2017).

Observou-se, portanto, que a adição de metanol na fase móvel foi responsável por uma melhora na cromatografia, o que foi um resultado divergente de trabalhos consultados, cuja fase móvel foi composta por acetonitrila e água contendo ácido fórmico 0,1 % (REZK; BASALIOUS; KARIM, 2015; REZK; BASALIOUS; AMIN, 2016; REZK *et al.*, 2016; BAHRAMI *et al.*, 2016; MIRAGHAEI *et al.*, 2017). Diante da melhora obtida pela adição do metanol, realizou-se novo teste aumentando sua proporção e ao mesmo tempo reduzindo a quantidade de água. Uma fase móvel composta por composta por (solvente A) 0,1 % ácido fórmico em água e (solvente B) acetonitrila/metanol (20:80) (v/v), solvente A/solvente B (30:70) (v/v) foi testada, obtendo-se um resultado satisfatório conforme Figura 21, com um bom formato de pico, que se mostrou intenso e simétrico. No trabalho de Abdallah, Abdel-Megied e Gouda (2017) também foi observada a utilização de uma maior proporção de metanol no componente orgânico da fase móvel, sendo a porção aquosa composta por tampão de formiato de amônio (pH 3,5; 10 mM) e a fração orgânica composta por 40 % de acetonitrila e 60 % de metanol.

Figura 21 - Cromatogramas obtidos nos testes iniciais de cromatografia. Coluna Gemini C18 de 50 mm de comprimento. Fase móvel B, contendo 80 % de metanol e 20 % de acetonitrila e fase móvel como um todo contendo 30 % de água



Fonte: (Do autor, 2017).

Em vista dos resultados, a coluna cromatográfica de 50 mm e a fase móvel contendo composta por (solvente B) metanol/acetonitrila (80:20) (v/v) e (solvente A) 0,1 % ácido fórmico em água, solvente B/solvente A (70:30) (v/v) foi selecionada. Além disso, verificou-se que uma solução contendo apenas metanol foi necessária para promover uma limpeza adequada do sistema cromatográfico, o que foi evidenciado pela ausência de *carry over*. Portanto, o metanol foi selecionado como solvente de lavagem (SL) do sistema cromatográfico. Durante os ensaios, também foi verificado que o fluxo de fase móvel de 0,8 mL/min foi adequado para a análise, pois permitia uma corrida curta, o que permitiu a análise de várias amostras em uma única corrida. Além disso, o fluxo estabelecido também foi adequado para a análise visto que a temperatura da fonte de ionização de 600 °C, foi suficiente para promover a total evaporação do solvente, garantindo uma boa reprodutibilidade ao método. Ademais, adotou-se a cromatografia isocrática, o que está em perfeito acordo com a maioria dos trabalhos consultados (REZK; BASALIOUS; KARIM, 2015; REZK; BASALIOUS; AMIN, 2016; REZK *et al.*, 2016; BAHRAMI *et al.*, 2016; MIRAGHAEI *et al.*, 2017).

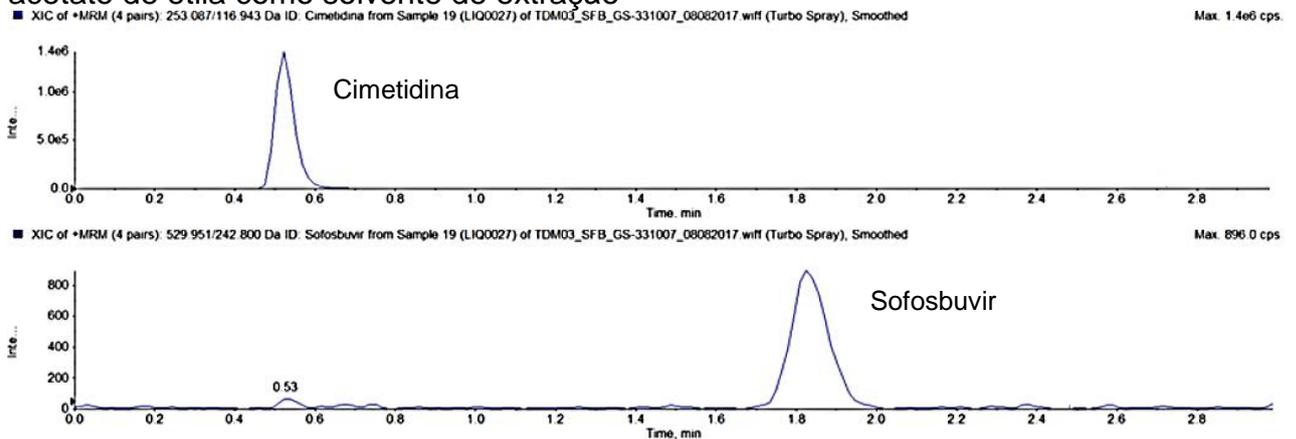
4.1.3 Otimização do preparo de amostras

Outra etapa de fundamental importância neste trabalho é o desenvolvimento de uma forma padronizada para o preparo das amostras. A partir de busca na literatura, observou-se que a extração líquido-líquido foi a técnica utilizada e, assim, optou-se por também adotá-la na execução do presente trabalho. Alguns autores

selecionaram o acetato de etila como solvente de extração, utilizando o volume de 3,0 mL por amostra preparada (REZK; BASALIOUS; KARIM, 2015; ABDALLAH; ABDELMEGIED; GOUDA, 2017). Já em outros trabalhos, é observada a utilização do volume de 3,5 mL de éter metil terc-butílico (TBME) em cada amostra (REZK; BASALIOUS; AMIN, 2016; REZK *et al.*, 2016). Observou-se também que em outros dois trabalhos, cujo modo de operação foi negativo, os autores adotaram o uso de 5,0 mL de dietil-éter no preparo de suas amostras (BAHRAMI *et al.*, 2016; MIRAGHAEI *et al.*, 2017).

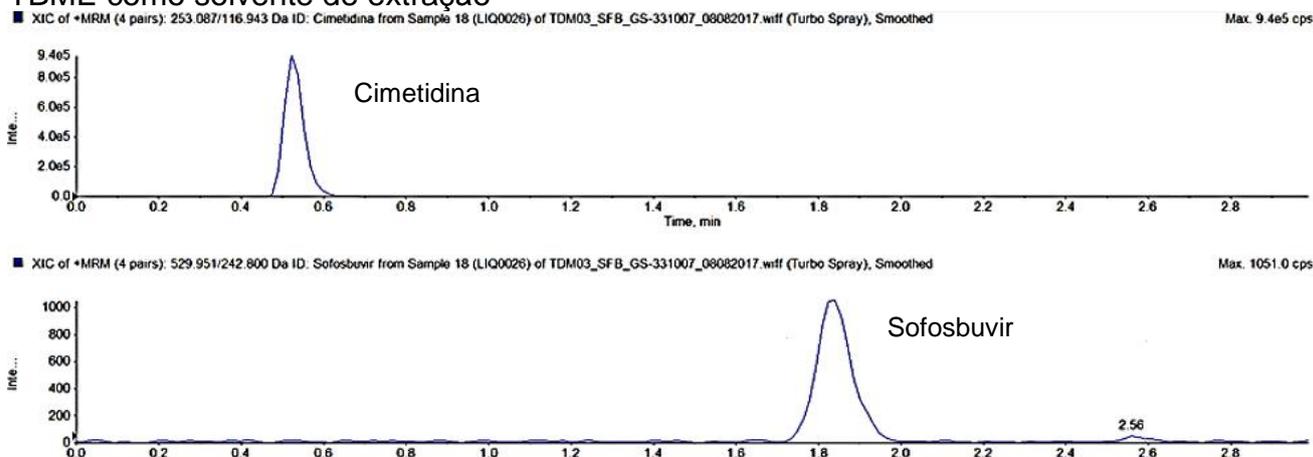
O laboratório bioanalítico dispunha de diferentes solventes para serem testados: éter etil-terc-butílico (TBME), dietil-éter, acetato de etila, diclorometano, clorofórmio, hexano e acetona. Diante disso, optou-se por efetuar iniciar os experimentos com o éter (TBME) e com o éster acetato de etila, utilizando-se um volume de solvente equivalente a 1,5 mL. Como o modo de ionização positivo já havia sido selecionado, preferiu-se não efetuar testes utilizando o dietil-éter, o qual foi adotado nos trabalhos que operaram em modo negativo. As figuras a seguir (Figura 22 e Figura 23), ilustram os resultados utilizando apenas acetato de etila e TBME como solvente de extração.

Figura 22 - Cromatogramas obtidos nos testes de preparo de amostras utilizando acetato de etila como solvente de extração



Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 23 - Cromatogramas obtidos nos testes de preparo de amostras utilizando TBME como solvente de extração



Fonte: (Do autor, 2017).

No teste com acetato de etila a intensidade do sinal do padrão interno ficou em torno de $1,4 \cdot 10^6$ cps e o sofosbuvir em torno de 800 cps. Já no teste com TBME, a intensidade do sinal do padrão interno ficou em torno de $9,4 \cdot 10^5$ cps e o sofosbuvir em torno de 1000 cps. Então, optou-se por utilizar uma mistura dos dois solventes de forma a priorizar o sofosbuvir e, ao mesmo tempo, não prejudicar o sinal do padrão interno. Assim, foi utilizada uma mistura contendo uma proporção maior de TBME, sendo escolhida a proporção TBME/Acetato de etila (70:30) (v/v). Além disso, a maior proporção de TBME tornou o extrato mais limpo e com maior velocidade para evaporação.

Nessa etapa de otimização, onde foram estabelecidas a composição da solução de extração (SE) e da solução de ressuspensão (SD), também estiveram sob avaliação os parâmetros relacionados ao tempo de agitação e ao volume de ressuspensão. Então, a partir dos resultados experimentais foi definida uma condição ótima para a análise. Por fim, uma vez definidas as condições do espectrômetro de massas, as condições cromatográficas e as condições do preparo das amostras, a próxima etapa, que é a validação da metodologia, foi iniciada.

4.1.4 Condições analíticas – Condições do Espectrômetro de massas, do sistema de cromatografia líquida e preparo de amostras

Uma vez definidas as condições ótimas do espectrômetro de massas, do sistema cromatográfico e do preparo de amostras, a metodologia está apta a ser

validada. A Tabela 13 apresenta um resumo das condições estabelecidas nos itens 4.1.1, 4.1.2 e 4.1.3.

Tabela 13 – Condições estabelecidas para a determinação de sofosbuvir em plasma humano

Parâmetros da análise	Descrição
Metodologia	LC-MS/MS
Matriz analisada	plasma
Modo de ionização	<i>Electrospray</i> positivo (ESI+)
Técnica de varredura	MRM
Preparo de amostra	Extração líquido-líquido
Solvente de extração	TBME/Acetato de etila (70:30) (v/v)
Coluna analítica	Gemini-NX 5 µm C18 110 Å, 50,0 X 4,6 mm
Fase móvel	Fase móvel: 30 % - Aquosa e 70 %- Orgânica
Fluxo	0,800 mL/min
Pressão do sistema observada	75 bar
Temperatura do forno de coluna	Ambiente
Temperatura do autoinjeter	Ambiente
Volume de injeção	10 µL
Tempo de corrida	2,5 minutos
Temperatura do laboratório	22,0 ± 2 °C
Umidade relativa do ar	45 %
Tempos de retenção	Sofosbuvir = 1,10 min / Cimetidina = 0,55 min
Quantificação	Padronização interna (Cimetidina)
Ponderação	1/x ²

Fonte: (Do autor, 2017).

4.2 Validação da metodologia bioanalítica

Uma vez que a metodologia foi desenvolvida e as condições de análise foram estabelecidas, iniciou-se a validação segundo preceitos da Resolução RDC nº 27 de 17/maio/2012. Os resultados dos ensaios realizados são demonstrados nos itens a seguir.

4.2.1 Teste de seletividade – TSE

A seletividade do método foi testada utilizando os procedimentos e as condições cromatográficas definidas no desenvolvimento da metodologia. Foi comprovada a inexistência de interferência acima dos limites estabelecidos pela legislação no tempo de retenção do analito e do padrão interno.

As amostras de plasma branco de cada voluntário, coletadas previamente à realização do ensaio farmacocinético, receberam uma codificação interna de forma que cada bolsa apresentasse uma identificação única, como por exemplo a bolsa de plasma hemolisado 17BM-1850. Já as amostras da corrida analítica foram nomeadas com a sigla do ensaio (TSE) seguidas de numeração sequencial, por exemplo TSE0040, que corresponde ao primeiro branco de matriz lipêmica injetado. Nesse ensaio, foram analisadas amostras da matriz biológica branca, isentas do analito e do padrão interno, obtidas de seis fontes distintas, sendo quatro plasmas normais, um plasma lipêmico e um plasma hemolisado.

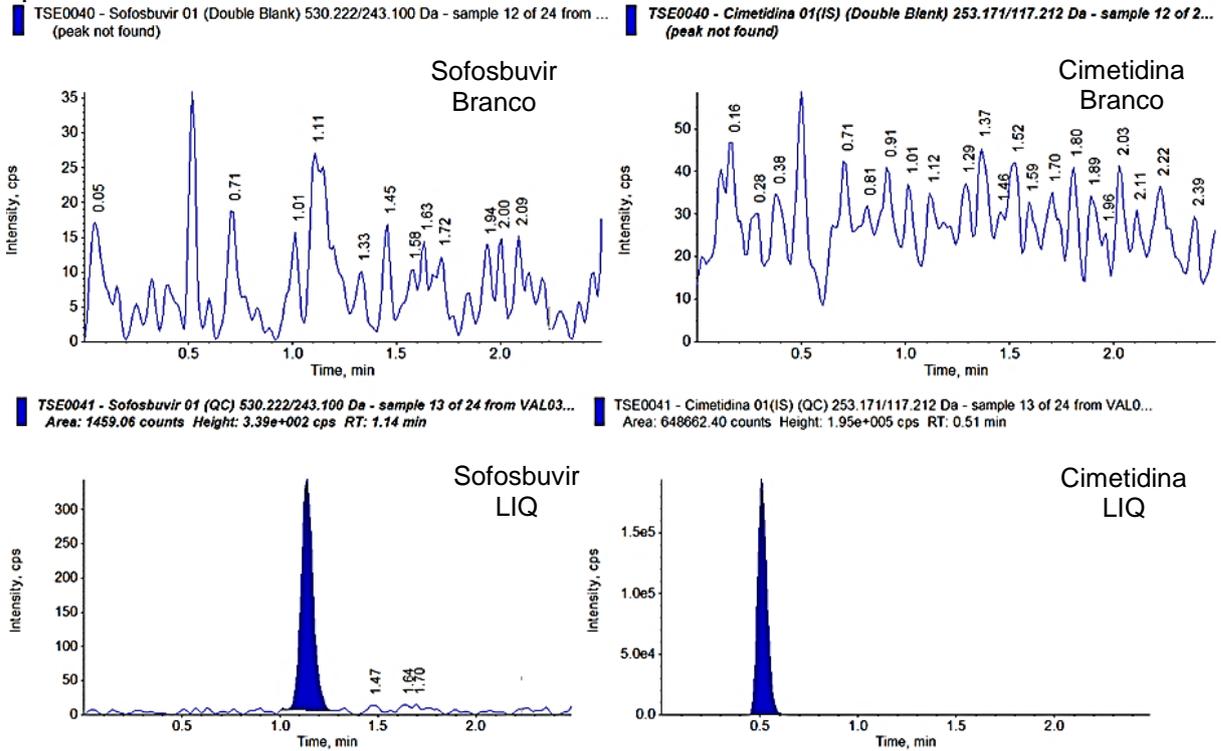
Foram comparadas as áreas de picos interferentes no tempo de retenção do analito cuja resposta foi inferior a 20 % nas amostras do limite inferior de quantificação (LIQ). As áreas de picos interferentes próximas ao tempo de retenção do padrão interno (PI) apresentaram-se inferiores a 5 % da área do PI. Para o caso em questão, o LIQ e o padrão interno com a menor área são considerados o referencial, ou seja, LIQ de área 1235,82 e PI de área de 630653,64. Os valores de área, % de interferência e os cromatogramas referentes ao ensaio encontram-se a seguir (Tabela 14, Figura 24, Figura 25, Figura 26, Figura 27, Figura 28 e Figura 29).

Tabela 14 - Resultados obtidos no teste de seletividade

Tipo de amostra	Código da bolsa de matriz biológica	Código da amostra na corrida analítica	Valor de área (analito)	Valor de área (padrão interno)	% de interferência no analito	% de interferência no padrão interno
Branco em matriz lipêmica	17-BM1855	TSE0040	0,00	0,00	0,00	0,00
LIQ em matriz lipêmica		TSE0041	1459,06	648662,40	-	-
Branco em matriz hemolisada	17-BM1850	TSE0042	0,00	0,00	0,00	0,00
LIQ em matriz hemolisada		TSE0043	1268,64	647578,20	-	-
Branco em matriz normal 01	17-BM1846	TSE0044	0,00	0,00	0,00	0,00
LIQ em matriz normal 01		TSE0045	1439,27	666663,98	-	-
Branco em matriz normal 02	17-BM1848	TSE0046	0,00	0,00	0,00	0,00
LIQ em matriz normal 02		TSE0047	1416,86	656125,54	-	-
Branco em matriz normal 03	17-BM1853	TSE0048	0,00	0,00	0,00	0,00
LIQ em matriz normal 03		TSE0049	1359,92	630653,64	-	-
Branco em matriz normal 04	17-BM1854	TSE0050	0,00	0,00	0,00	0,00
LIQ em matriz normal 04		TSE0051	1235,82	645501,40	-	-

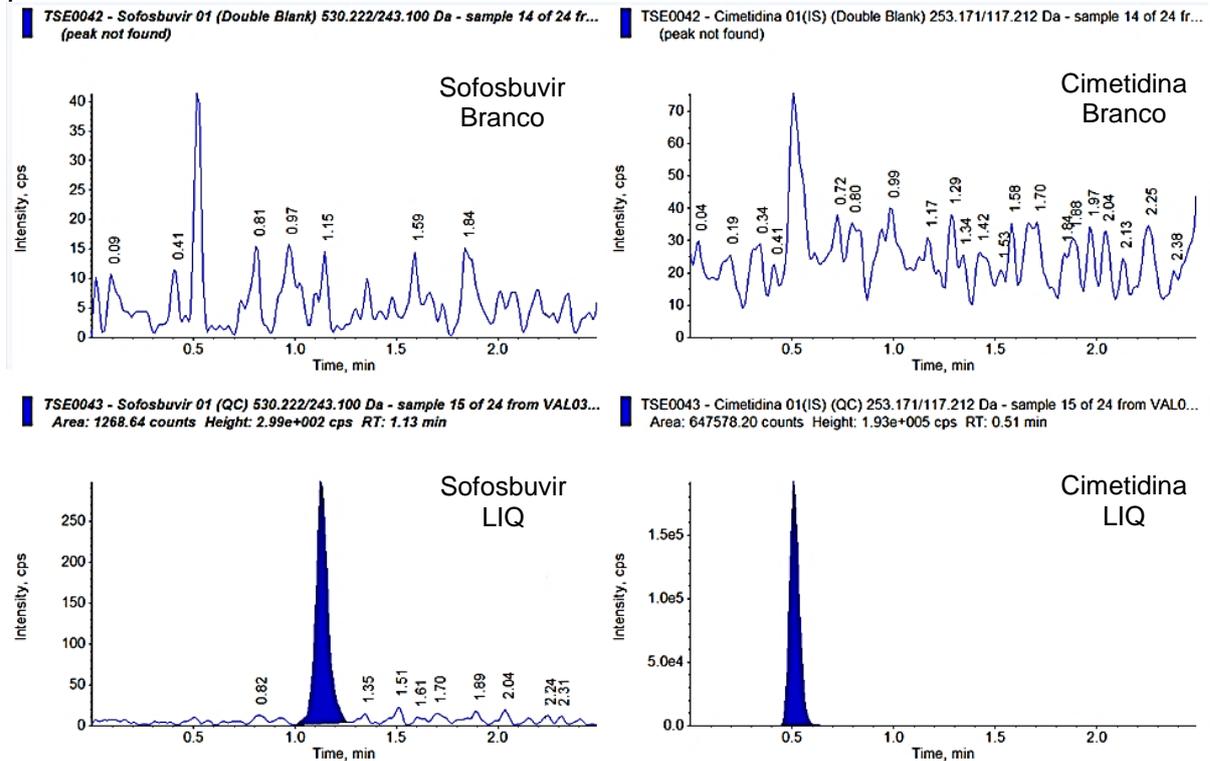
Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 24 - Cromatograma referente ao branco de plasma lipêmico e o LIQ em plasma lipêmico no ensaio TSE



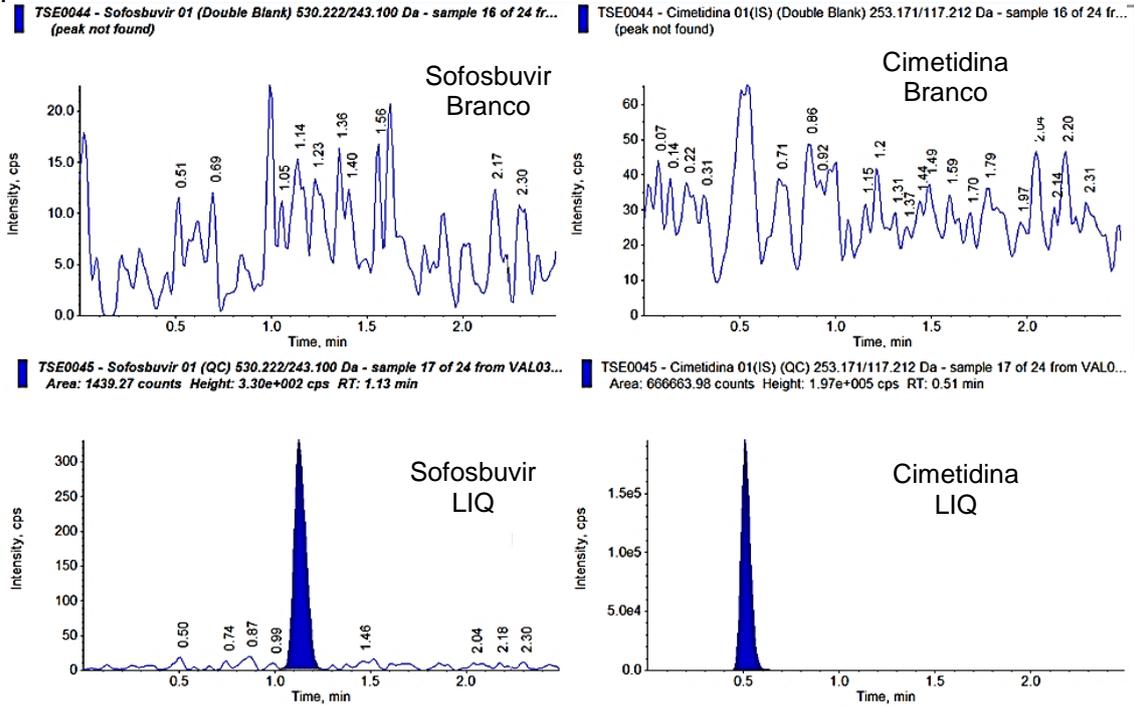
Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 25 - Cromatograma referente ao branco de plasma hemolisado e o LIQ em plasma hemolisado no ensaio TSE



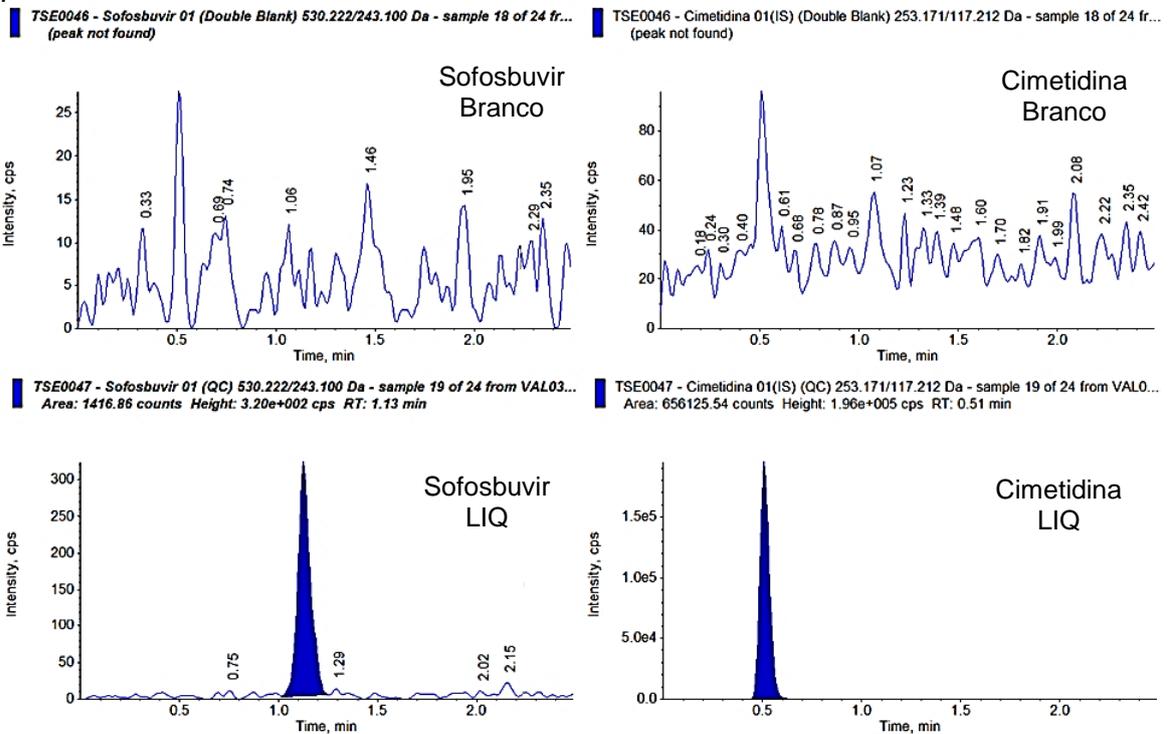
Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 26 - Cromatograma referente ao branco de plasma normal 01 e o LIQ em plasma normal 01 no ensaio TSE



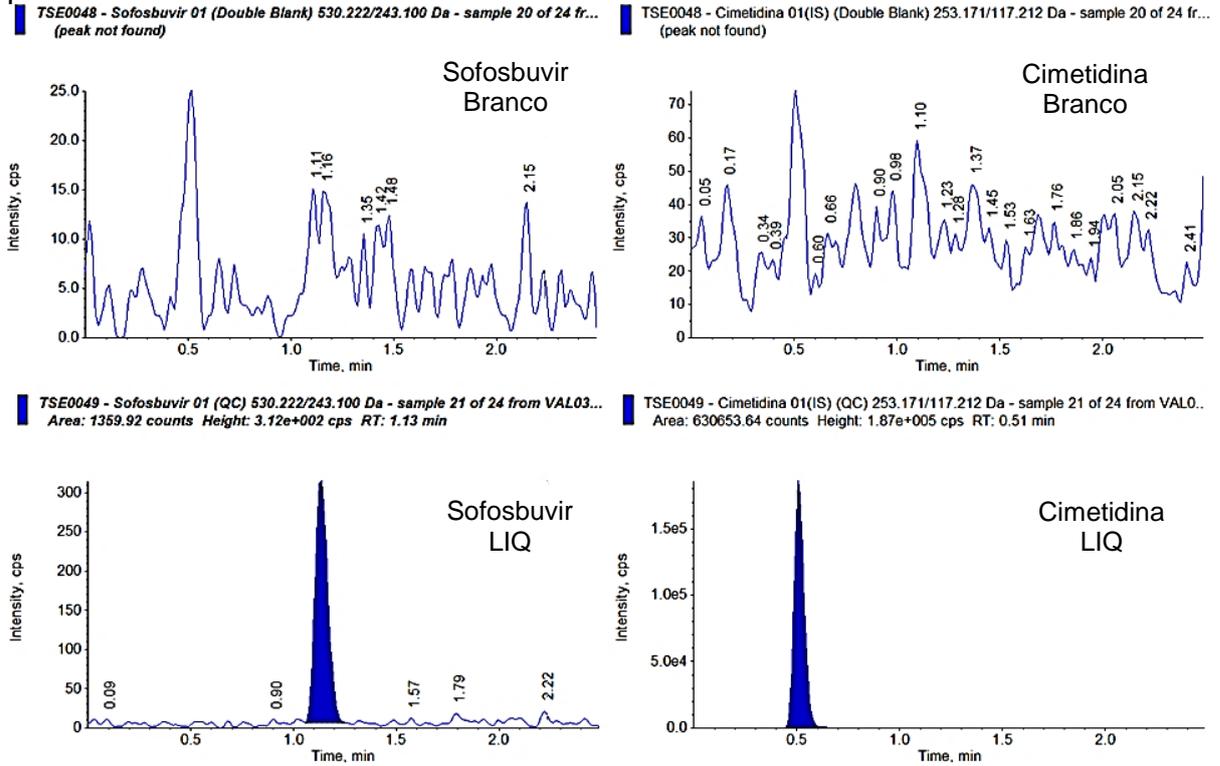
Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 27 - Cromatograma referente ao branco de plasma normal 02 e o LIQ em plasma normal 02 no ensaio TSE



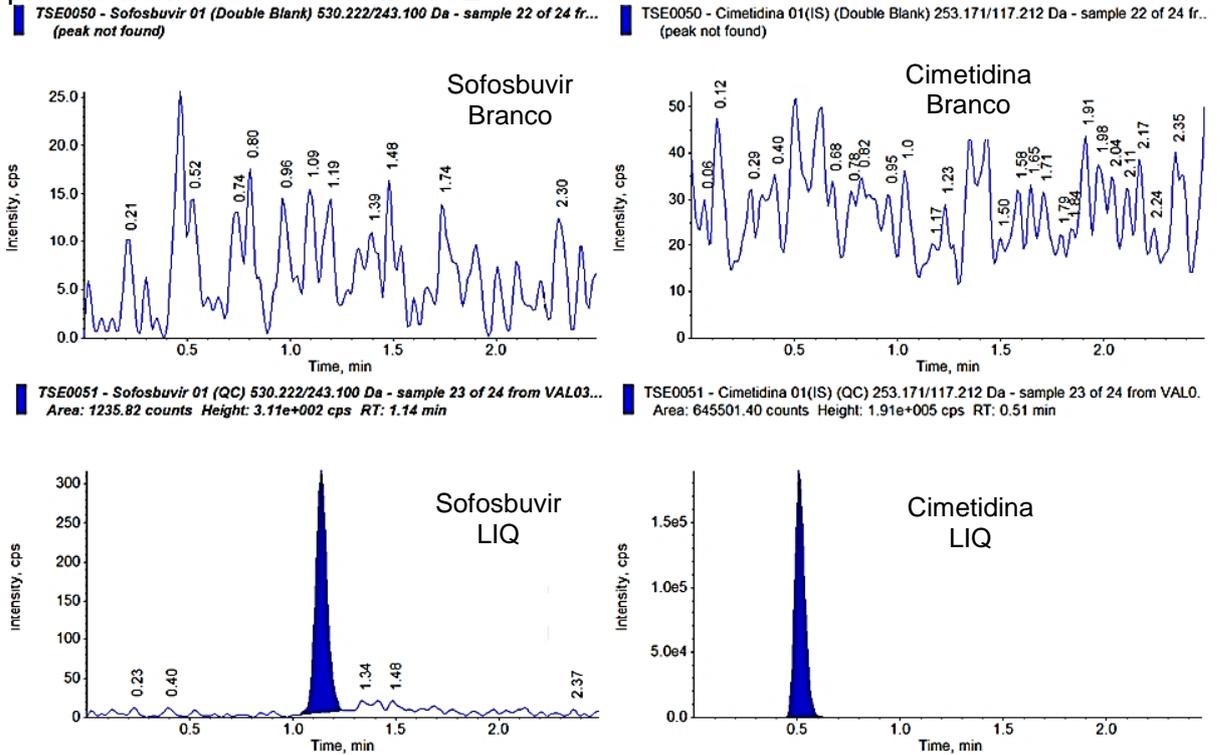
Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 28 - Cromatograma referente ao branco de plasma normal 03 e o LIQ em plasma normal 03 no ensaio TSE



Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 29 - Cromatograma referente ao branco de plasma normal 04 e o LIQ em plasma normal 04 no ensaio TSE



Fonte: (Do autor, 2017).

4.2.2 Teste de seletividade contendo fármacos concomitantes/interferentes – TSEFC

Durante a realização do ensaio farmacocinético, foi necessário administrar dipirona (seu principal metabólito 4-MAA foi avaliado neste ensaio), metoclopramida e paracetamol à alguns voluntários. Dessa forma, foi necessário realizar a avaliação da interferência desses fármacos na determinação de sofosbuvir em plasma. Além disso, também foi avaliada a influência das substâncias interferentes nicotina e cafeína, como recomendado pela norma, dado que nicotina e cafeína são comumente encontradas no plasma de indivíduos saudáveis.

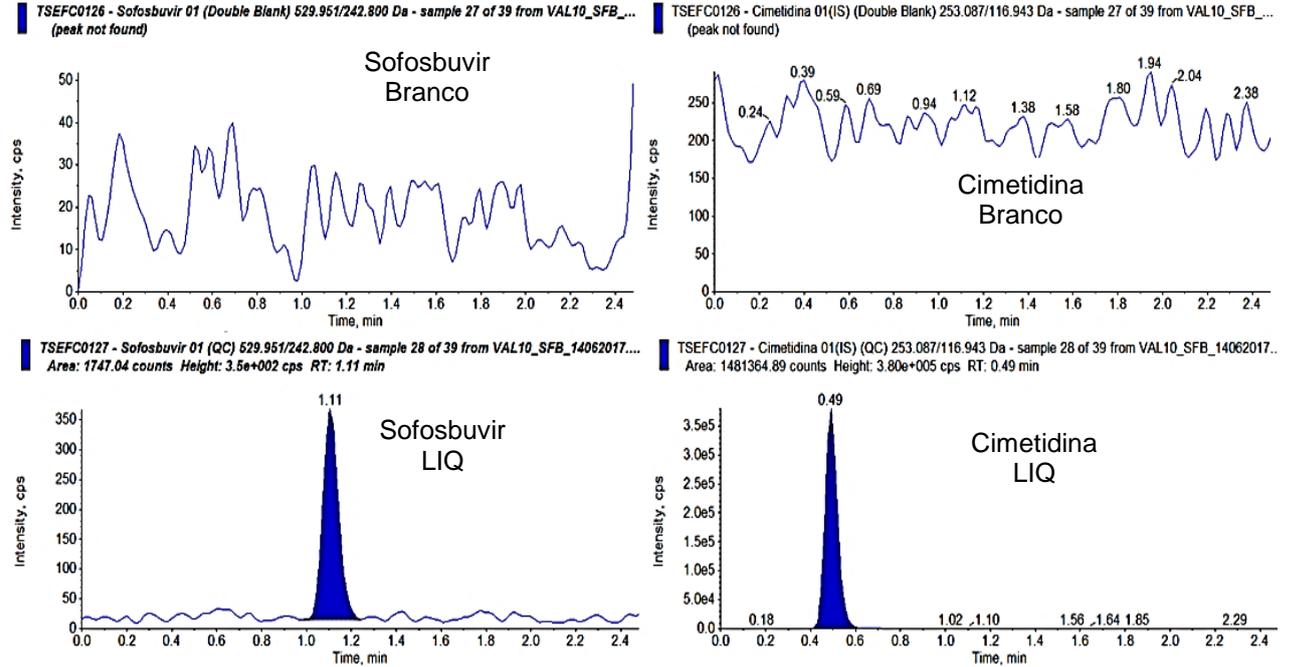
A seletividade do método na presença de compostos concomitantes/interferentes foi testada utilizando os procedimentos e as condições cromatográficas propostas. Foi comprovada a inexistência de interferência acima dos limites estabelecidos pela legislação, os quais foram descritos no item 4.2.1. A codificação recebida por cada bolsa de matriz também já foi descrita no item anterior. Na corrida analítica, as injeções foram nomeadas com a sigla do ensaio (TSEFC) seguidas de numeração sequencial, por exemplo TSEFC0126, que corresponde ao primeiro branco em plasma lipêmico da corrida. Foram analisadas as amostras da matriz biológica branca de características distintas. O critério de aprovação do ensaio foi o mesmo do demonstrado no item 4.2.1. Para o caso em questão, o LIQ e o padrão interno com a menor área são considerados o referencial, ou seja, LIQ de área 1231,54 e PI de área de 1481364,89. Os resultados encontram-se a seguir (Tabela 15, Figura 30, Figura 31, Figura 32, Figura 33, Figura 34 e Figura 35).

Tabela 15 - Resultados obtidos no teste de seletividade contendo fármacos concomitantes/interferentes

Tipo de amostra	Código da bolsa de matriz biológica	Código da amostra na corrida analítica	Valor de área (analito)	Valor de área (padrão interno)	% de interferência no analito	% de interferência no padrão interno
Branco em matriz lipêmica	17-BM-1855	TSEFC0126	0,00	0,00	0,00	0,00
LIQ em matriz lipêmica		TSEFC0127	1747,04	1481364,89	-	-
Branco em matriz hemolisada	17-BM-1873	TSEFC0128	0,00	0,00	0,00	0,00
LIQ em matriz hemolisada		TSEFC0129	1383,05	1552946,84	-	-
Branco em matriz normal 01	17-BM-1847	TSEFC0130	0,00	0,00	0,00	0,00
LIQ em matriz normal 01		TSEFC0131	1231,54	1564876,12	-	-
Branco em matriz normal 02	17-BM-1853	TSEFC0132	0,00	0,00	0,00	0,00
LIQ em matriz normal 02		TSEFC0133	1490,28	1540411,17	-	-
Branco em matriz normal 03	17-BM-1854	TSEFC0134	0,00	0,00	0,00	0,00
LIQ em matriz normal 03		TSEFC0135	1475,85	1591845,65	-	-
Branco em matriz normal 04	17-BM-1865	TSEFC0136	0,00	0,00	0,00	0,00
LIQ em matriz normal 04		TSEFC0137	1757,49	1547121,21	-	-

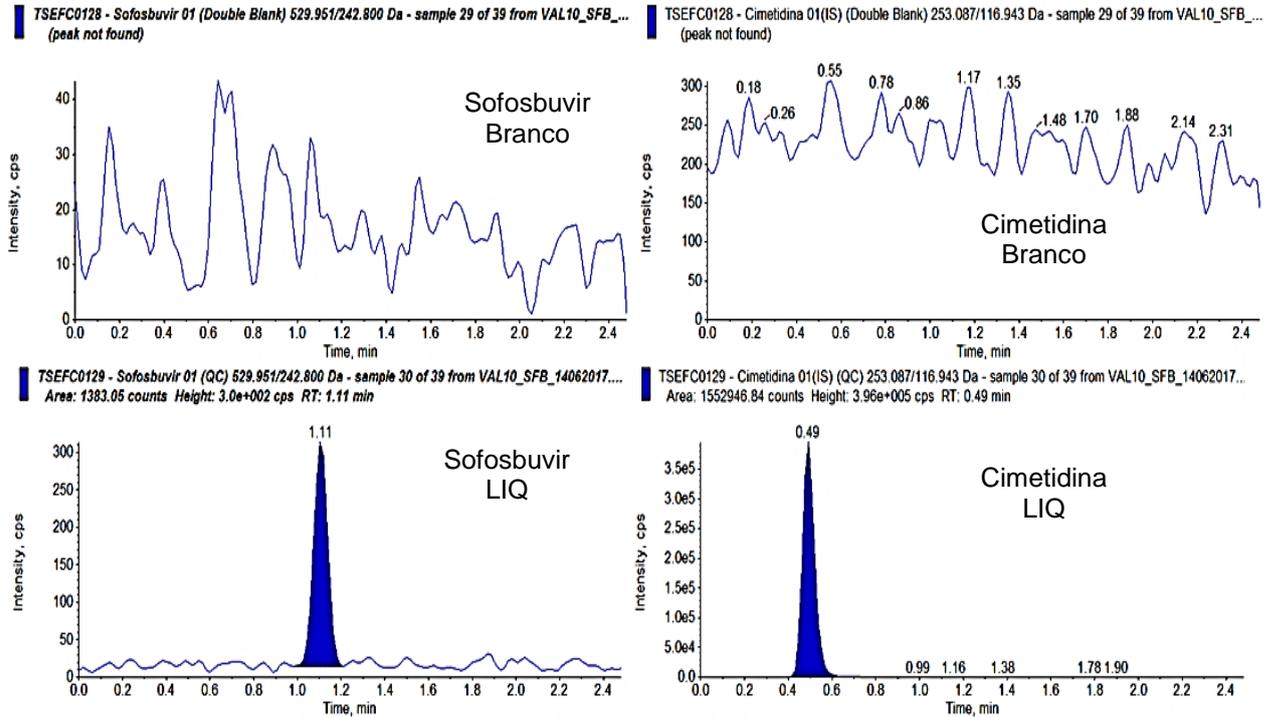
Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 30 - Cromatograma referente ao branco de plasma lipêmico e o LIQ em plasma lipêmico no ensaio TSEFC



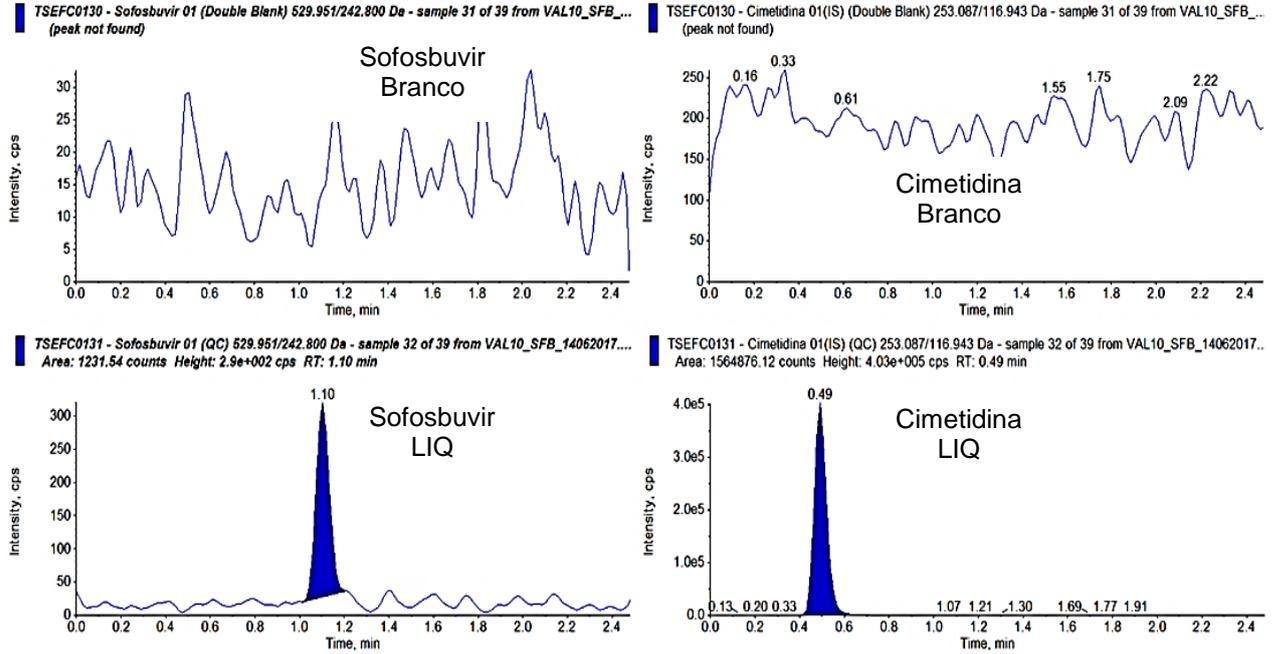
Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 31 - Cromatograma referente ao branco de plasma hemolisado e o LIQ em plasma hemolisado no ensaio TSEFC



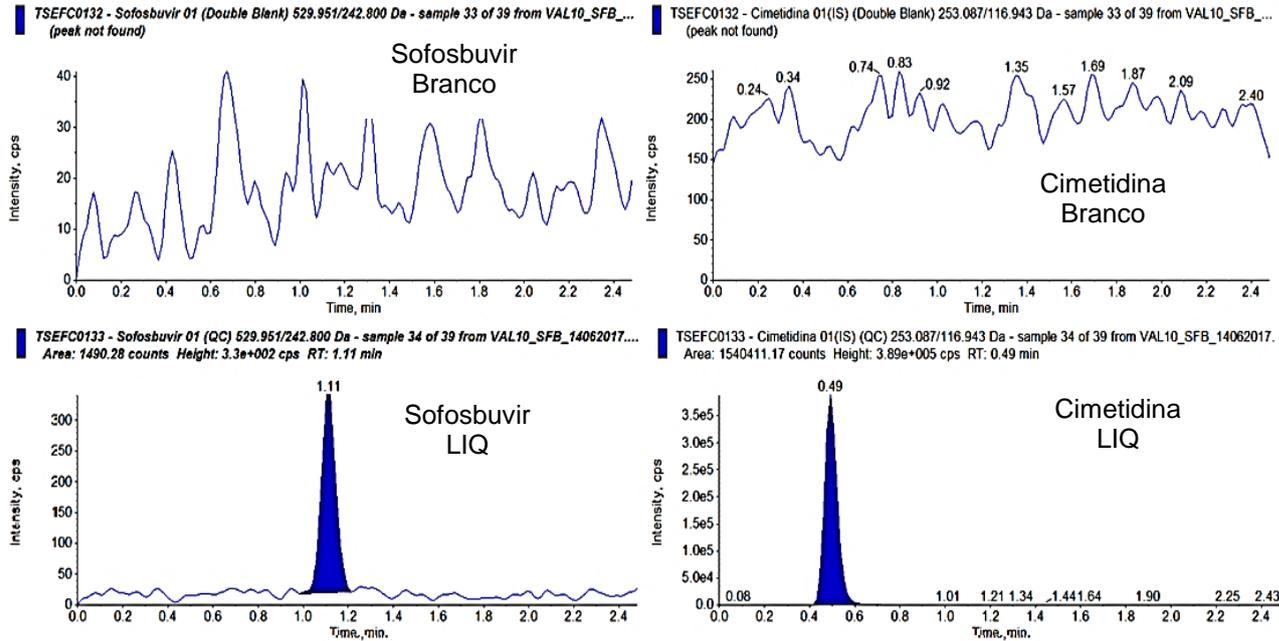
Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 32 - Cromatograma referente ao branco de plasma normal 01 e o LIQ em plasma normal 01 no ensaio TSEFC



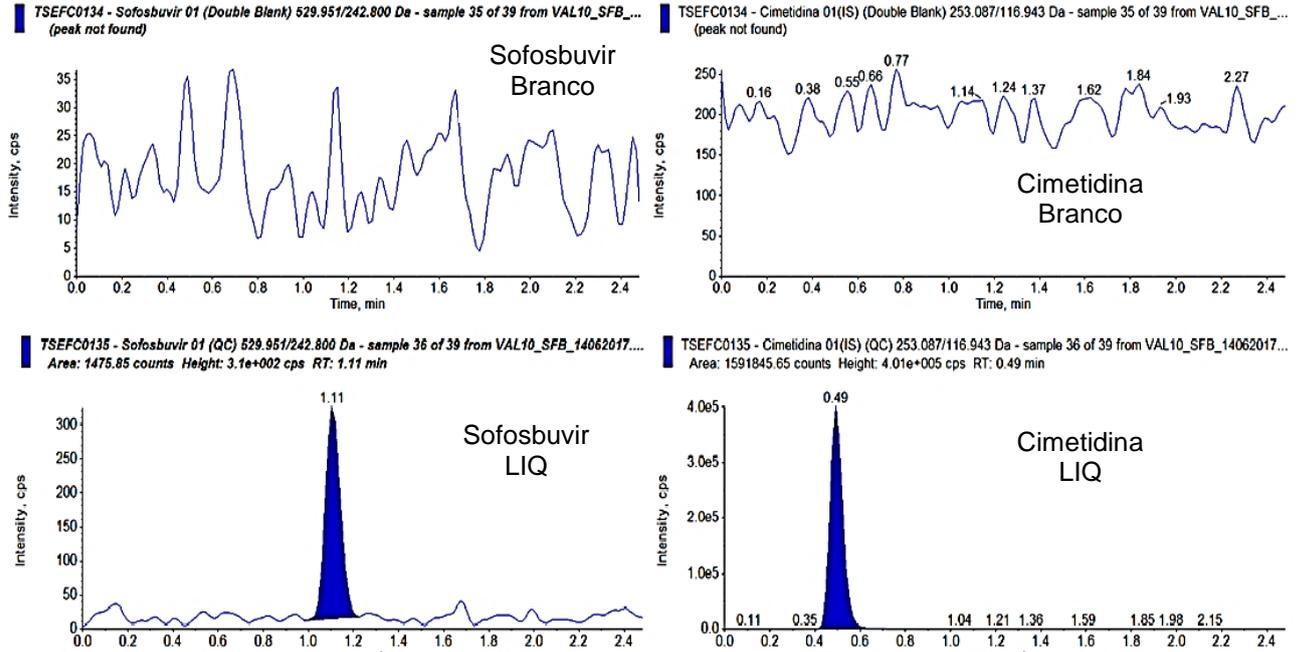
Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 33 - Cromatograma referente ao branco de plasma normal 02 e o LIQ em plasma normal 02 no ensaio TSEFC



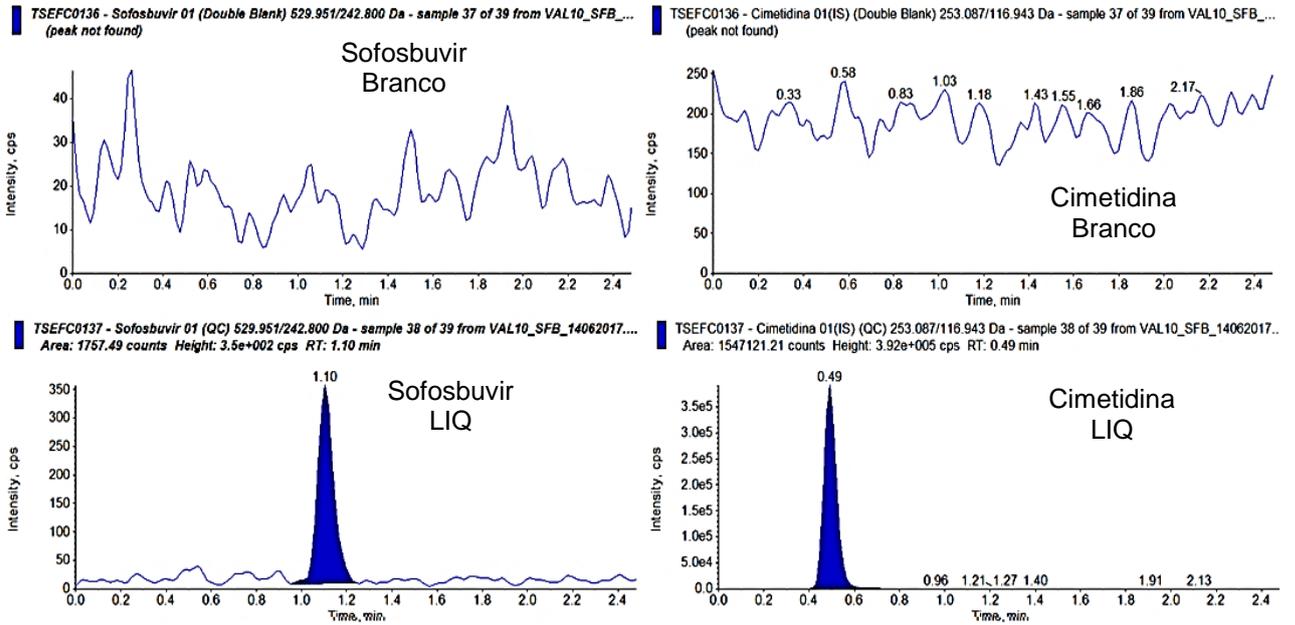
Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 34 - Cromatograma referente ao branco de plasma normal 03 e o LIQ em plasma normal 03 no ensaio TSEFC



Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 35 - Cromatograma referente ao branco de plasma normal 04 e o LIQ em plasma normal 04 no ensaio TSEFC



Fonte: (Do autor, 2017).

4.2.3 Teste de efeito de matriz – TEM

O ensaio foi realizado com o preparo das amostras de controles de qualidade baixo e alto fortificadas após o procedimento de extração, CQB-FD e CQA-FD, e com os controles de qualidade em solução. Avaliou-se a capacidade de constituintes da matriz em interferir no processo de quantificação de sofosbuvir, normalizado pela cimetidina. Foi calculado o FMN (fator de matriz normalizado), que é uma relação entre as respostas em matriz biológica e as respostas em solução. Na corrida analítica, cada amostra injetada foi identificada pela sigla do ensaio seguida de numeração sequencial. Por exemplo, a amostra TEM0165 representa o primeiro CQB-FD o qual foi preparado com uma bolsa de matriz lipêmica. Foi comprovada a inexistência de efeito de matriz segundo as exigências da resolução. O coeficiente de variação (CV) dos FMN's relativos a cada nível de concentração foi inferior a 15 %. Os resultados são apresentados nas seguintes tabelas: Tabela 16, Tabela 17 e Tabela 18.

Tabela 16 - Área do sofosbuvir, área do padrão interno e resposta para as amostras preparadas em matriz – ensaio TEM

Descrição da matriz biológica	Concentração nominal (ng/mL)	Código da amostra na corrida analítica	Valor de área (analito)	Valor de área (padrão interno)	Resposta
Lipêmico 01	1,50 (CQB-FD)	TEM0165	6041,96	1191502,38	0,00507
Lipêmico 02		TEM0166	5919,43	983414,82	0,00602
Hemolisado 01		TEM0167	5774,04	973539,94	0,00593
Hemolisado 02		TEM0168	5006,35	841206,82	0,00595
Normal 01		TEM0169	5551,44	957167,56	0,00580
Normal 02		TEM0170	6264,23	1100989,84	0,00569
Normal 03		TEM0171	4982,32	1062945,11	0,00469
Normal 04		TEM0172	5381,59	1166632,85	0,00461
Lipêmico 01	800,00 (CQA-FD)	TEM0173	3006702,61	1203255,29	2,49881
Lipêmico 02		TEM0174	2637760,37	1166674,33	2,26092
Hemolisado 01		TEM0175	3236100,07	1218363,29	2,65610
Hemolisado 02		TEM0176	3130890,05	1224679,74	2,55650
Normal 01		TEM0177	3301112,35	1225196,01	2,69435
Normal 02		TEM0178	3387141,90	1183541,75	2,86187
Normal 03		TEM0179	3360677,20	1196139,98	2,80960
Normal 04		TEM0180	3337061,62	1239196,04	2,69292

Fonte: (Do autor, 2017).

Tabela 17 - Área do sofosbuvir, área do padrão interno, resposta e média das respostas para as amostras preparadas em solução - ensaio TEM

	Concentração nominal (ng/mL)	Código da amostra na corrida analítica	Valor de área (analito)	Valor de área (padrão interno)	Razão área analito/área do padrão interno	Média
Amostras preparadas em solução	1,50 (CQB)	TEM0181	6911,95	1321446,59	0,00523	0,00477
		TEM0182	6512,15	1272211,92	0,00512	
		TEM0183	5855,77	1321640,00	0,00443	
		TEM0184	6661,69	1291670,75	0,00516	
		TEM0185	6262,85	1306370,89	0,00479	
		TEM0186	5686,92	1282542,40	0,00443	
		TEM0187	5713,07	1306433,55	0,00437	
		TEM0188	5933,66	1289318,06	0,00460	
	800,00 (CQA)	TEM0189	3289295,31	1336658,98	2,46083	2,43637
		TEM0190	3301867,05	1324362,87	2,49317	
		TEM0191	3153110,75	1297189,63	2,43072	
		TEM0192	3108583,13	1275515,29	2,43712	
		TEM0193	3452204,28	1410178,73	2,44806	
		TEM0194	3293041,16	1342957,19	2,45208	
		TEM0195	3324125,14	1380956,98	2,40712	
		TEM0196	3081321,89	1304607,72	2,36188	

Fonte: (Do autor, 2017).

Tabela 18 - Cálculo do FMN para cada amostra, média e CV para cada nível de concentração - ensaio TEM

Descrição do controle de qualidade	Conc. nominal (ng/mL)	FMN	Média	CV (%)
CQB (baixa concentração)	1,50 (CQB)	1,06	1,15	10,73
		1,26		
		1,24		
		1,25		
		1,22		
		1,19		
		0,98		
		0,97		
CQA (alta concentração)	800,00 (CQA)	1,03	1,08	7,24
		0,93		
		1,09		
		1,05		
		1,11		
		1,17		
		1,15		
		1,11		

Fonte: (Do autor, 2017).

4.2.4 Teste de efeito de matriz contendo fármacos concomitantes/interferentes – TEMFC

A justificativa para a realização deste ensaio, foi apresentada anteriormente no item 4.2.2. A forma do preparo e as concentrações das substâncias concomitantes/interferentes também foi apresentada no item precedente.

No referido ensaio, foram avaliadas oito bolsas de matriz distintas, calculando-se o FMN, de maneira idêntica à descrita no item 4.2.3. Além disso, o critério de aprovação deste ensaio é o mesmo do teste TEM. Na corrida analítica, cada amostra injetada foi identificada pela sigla do ensaio seguida de numeração sequencial. Por exemplo, a amostra TEMFC0140 representa o primeiro CQB-FD o qual foi preparado com uma bolsa de matriz lipêmica. Foi comprovada a inexistência de efeito de matriz contendo os compostos concomitantes/interferentes segundo as exigências da resolução norma. O coeficiente de variação (CV) dos FMN's relativos a todas as amostras foi inferior a 15 %. Seguem os resultados nas tabelas: Tabela 19, Tabela 20 e Tabela 21.

Tabela 19 - Área do sofosbuvir, área do padrão interno e resposta para as amostras preparadas em matriz - ensaio TEMFC

Descrição da matriz biológica	Concentração nominal (ng/mL)	Código da amostra na corrida analítica	Valor de área (analito)	Valor de área (padrão interno)	Resposta
Lipêmico 01	1,50 (CQB-FD)	TEMFC0140	7684,13	2993212,82	0,00257
Lipêmico 02		TEMFC0141	6831,03	2916227,59	0,00234
Hemolisado 01		TEMFC0142	7255,83	2877650,50	0,00252
Hemolisado 02		TEMFC0143	7249,51	2885834,20	0,00251
Normal 01		TEMFC0144	7283,52	2808115,81	0,00259
Normal 02		TEMFC0145	7214,40	2880507,87	0,00250
Normal 03		TEMFC0146	7608,37	2875818,13	0,00265
Normal 04		TEMFC0147	7148,05	2849080,15	0,00251
Lipêmico 01	800,00 (CQA-FD)	TEMFC0148	3901459,58	2810648,06	1,38810
Lipêmico 02		TEMFC0149	3850429,32	2725922,83	1,41252
Hemolisado 01		TEMFC0150	3900734,83	2845608,15	1,37079
Hemolisado 02		TEMFC0151	3873877,51	2835831,27	1,36605
Normal 01		TEMFC0152	3966648,59	2806197,03	1,41353
Normal 02		TEMFC0153	4017384,56	2792760,45	1,43850
Normal 03		TEMFC0154	3854675,26	2894233,13	1,33185
Normal 04		TEMFC0155	3827915,04	2819482,23	1,35767

Fonte: (Do autor, 2017).

Tabela 20 - Área do sofosbuvir, área do padrão interno, resposta e média das respostas para as amostras preparadas em solução - ensaio TEMFC

	Concentração nominal (ng/mL)	Código da amostra na corrida analítica	Valor de área (analito)	Valor de área (padrão interno)	Razão área analito/área do padrão interno	Média
Amostras preparadas em solução	1,50 (CQB)	TEMFC0156	6760,32	2904626,46	0,00233	0,00241
		TEMFC0157	7272,97	2941290,65	0,00247	
		TEMFC0158	6965,96	2917027,96	0,00239	
		TEMFC0159	6937,95	2851023,49	0,00243	
		TEMFC0160	7089,93	3037015,67	0,00233	
		TEMFC0161	7307,63	3030446,76	0,00241	
		TEMFC0162	6797,45	2804493,24	0,00242	
		TEMFC0163	7218,05	2914368,02	0,00248	
	800,00 (CQA)	TEMFC0164	3840643,76	2847885,73	1,34859	1,30123
		TEMFC0165	3794159,75	2994041,01	1,26724	
		TEMFC0166	3818856,02	3025917,15	1,26205	
		TEMFC0167	3974697,44	2995350,08	1,32696	
		TEMFC0168	3807434,06	3001485,71	1,26852	
		TEMFC0169	3802675,40	2840816,59	1,33859	
		TEMFC0170	3871538,42	3013461,76	1,28475	
TEMFC0171		3833551,61	2919272,80	1,31319		

Fonte: (Do autor, 2017).

Tabela 21 - Cálculo do FMN para cada amostra, média e CV para cada nível de concentração - ensaio TEMFC

Descrição do controle de qualidade	Conc. nominal (ng/mL)	FMN	Média	CV (%)
CQB (baixa concentração)	1,50 (CQB)	1,07	1,05	3,52
		0,97		
		1,05		
		1,04		
		1,08		
		1,04		
		1,10		
		1,04		
CQA (alta concentração)	800,00 (CQA)	1,07	1,06	2,53
		1,09		
		1,05		
		1,05		
		1,09		
		1,11		
		1,02		
		1,04		

Fonte: (Do autor, 2017).

4.2.5 Teste de efeito residual – TER

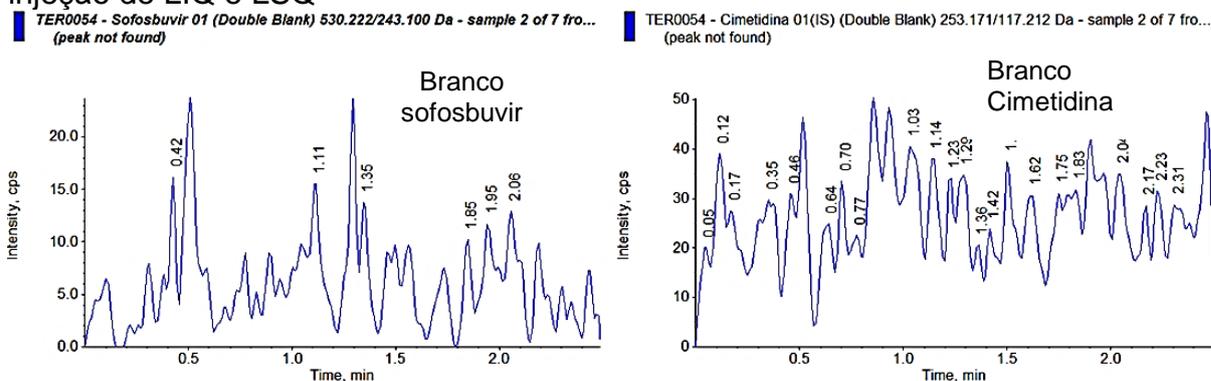
O teste de efeito residual determina se existe interferência de uma injeção na injeção seguinte, efeito conhecido como *carry over*. Para avaliar esse efeito, foram realizadas, três injeções da mesma amostra branco, sendo uma antes (amostra identificada como TER0054) e duas (TER0057 e TER0058) logo após a injeção de uma ou mais amostras do limite superior de quantificação (TER0056), que é a concentração mais provável de causar o arraste. A especificação para este ensaio é interferência máxima de 20 % do limite inferior de quantificação (LIQ). Já para a cimetidina, a interferência máxima é de 5 % da área. Os resultados do teste de efeito residual encontram-se a seguir (Tabela 22, Figura 36, Figura 37, Figura 38, Figura 39, e Figura 40), demonstrando que não houve efeito residual entre as análises.

Tabela 22 - Resultados do Teste de efeito residual - Percentual de interferência da amostra TER0056 (limite superior de quantificação) nas injeções subsequentes TER0057 (branco) e TER0058 (branco)

Código da amostra na corrida analítica	Concentração nominal (ng/mL)	Valor de área (analito)	Valor de área (padrão interno)	% de interferência do analito	% de interferência do padrão interno
TER0054	0,00 (BRANCO)	0,00	0,00	-	-
TER0055	0,50 (LIQ)	1348,69	623442,42	-	-
TER0056	1000,00 (LSQ)	2275378,62	598443,59	-	-
TER0057	0,00 (BRANCO)	0,00	0,00	0	0
TER0058	0,00 (BRANCO)	0,00	0,00	0	0

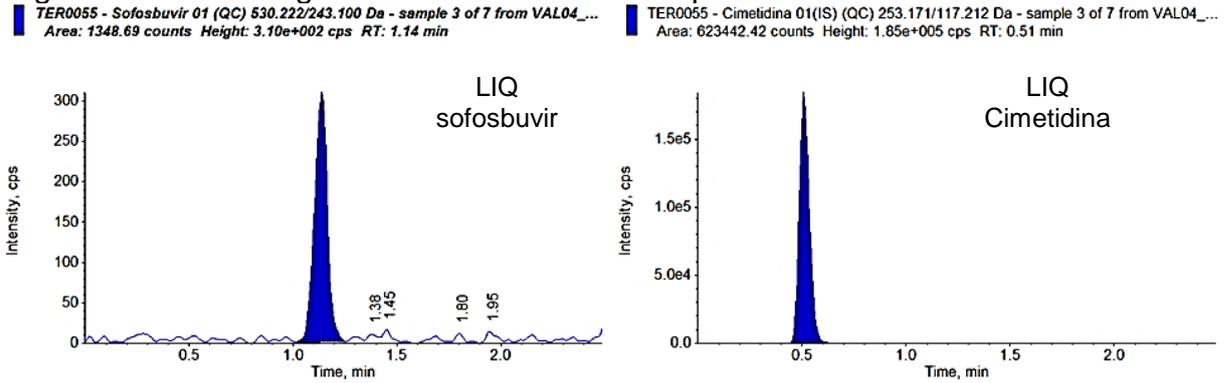
Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 36 - Cromatograma referente ao branco de plasma normal previamente à injeção de LIQ e LSQ



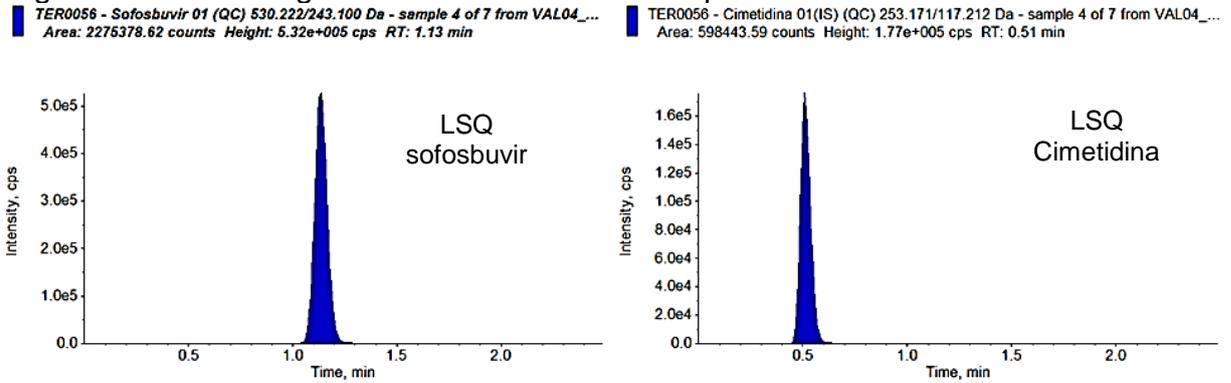
Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 37 - Cromatograma referente ao LIQ em plasma normal



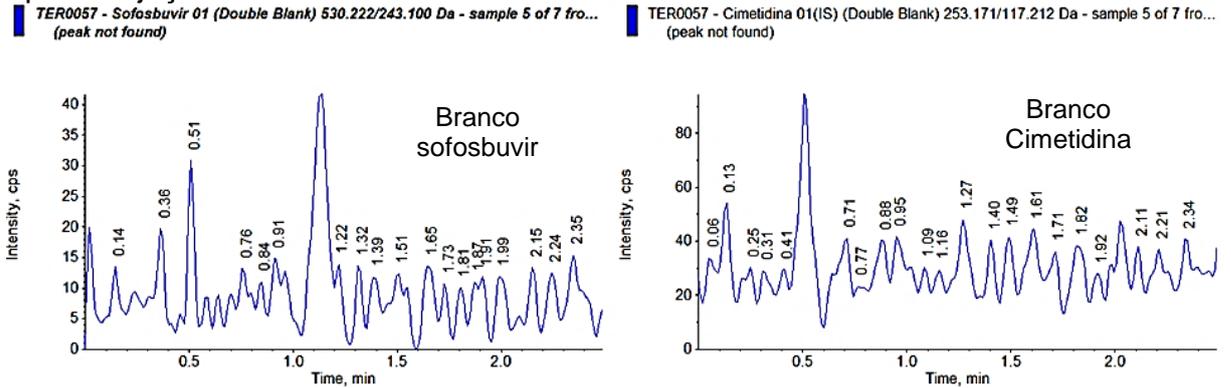
Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 38 - Cromatograma referente ao LSQ em plasma normal



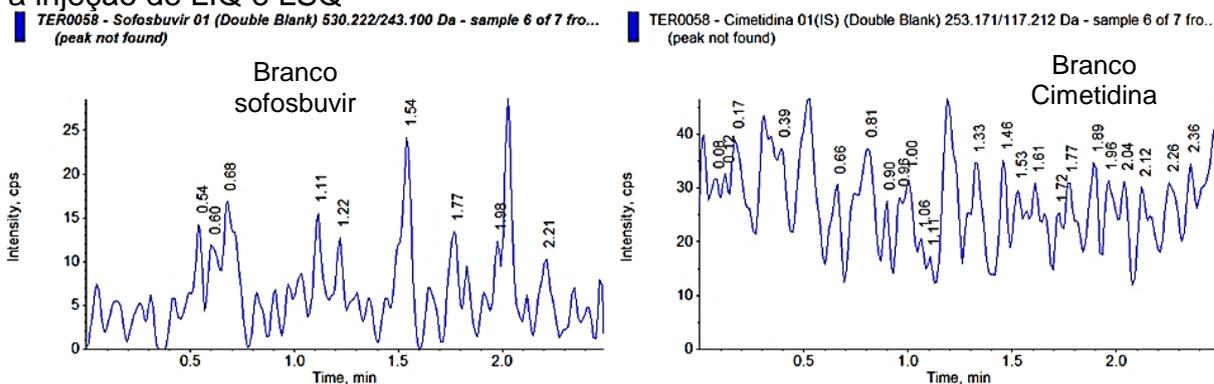
Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 39 - Cromatograma referente à primeira injeção de branco de plasma normal após a injeção de LIQ e LSQ



Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 40 - Cromatograma referente à segunda injeção branco de plasma normal após a injeção de LIQ e LSQ



Fonte: (Do autor, 2017).

4.2.6 Linearidade – Avaliação da curva de calibração e escolha do método de ponderação – CCAL

A faixa linear definida para a análise de sofosbuvir foi de 0,50 ng/mL até 1000,00 ng/mL, mostrando-se adequada à quantificação das amostras dos voluntários brasileiros, diferentemente da faixa anteriormente definida de 10,00 ng/mL a 3000,00 ng/mL conforme apresentado no item 4.1. Essa faixa foi composta por oito níveis de calibração: 0,50 ng/mL, 1,50 ng/mL, 10,00 ng/mL, 100,00 ng/mL, 200,00 ng/mL, 400,00 ng/mL, 800,00 ng/mL e 1000,00 ng/mL.

A resolução preconiza a avaliação de, no mínimo, uma triplicata de curvas de calibração e que ela possua, no mínimo, seis pontos. Para o estudo em questão foram avaliadas três curvas de calibração, que foram construídas com uma duplicata de cada nível, sendo então seis observações para cada nível. Primeiramente, com o auxílio do software Minitab® 17.1.0, aplicou-se o teste de Grubbs para verificar a presença de valores aberrantes (*outliers*). Através do valor-p obtido, verificou-se a inexistência de valores extremos para um nível de significância de 5 % conforme Tabela 23. Como o valor-p calculado é maior do que o nível de significância ($\alpha = 0,05$), não se rejeita a hipótese nula (H_0), admitindo-se que os dados pertencem a uma mesma população, ou seja, não há nenhum dado aberrante. Então, calculou-se a variância de cada nível de concentração com o objetivo de verificar seu comportamento ao longo da curva. Conforme demonstrado (Tabela 23, Tabela 24 e Figura 41), observa-se que ela cresce juntamente com o aumento da concentração, revelando a inexistência de homocedasticidade.

Tabela 23 – Resposta (área do analito/área do padrão interno) de cada observação e o valor-p

Concentração nominal (ng/mL)							
0,50	1,50	10,00	100,00	200,00	400,00	800,00	1000,00
0,002348	0,005784	0,040049	0,416007	0,820988	1,599744	3,362217	4,012726
0,002622	0,005514	0,037746	0,401355	0,763205	1,666549	3,154730	4,140453
0,001847	0,005101	0,037306	0,390342	0,813281	1,579536	2,960536	3,780235
0,002158	0,005985	0,037125	0,408077	0,808228	1,633731	2,897744	3,763296
0,003354	0,007469	0,049957	0,482882	0,940345	1,904059	3,728927	4,614424
0,002604	0,006708	0,050229	0,482847	0,941334	1,948421	3,430970	5,143995
Valor-p = 0,260	Valor-p = 0,391	Valor-p = 1,000	Valor-p = 1,000	Valor-p = 1,000	Valor-p = 0,792	Valor-p = 0,559	Valor-p = 0,280

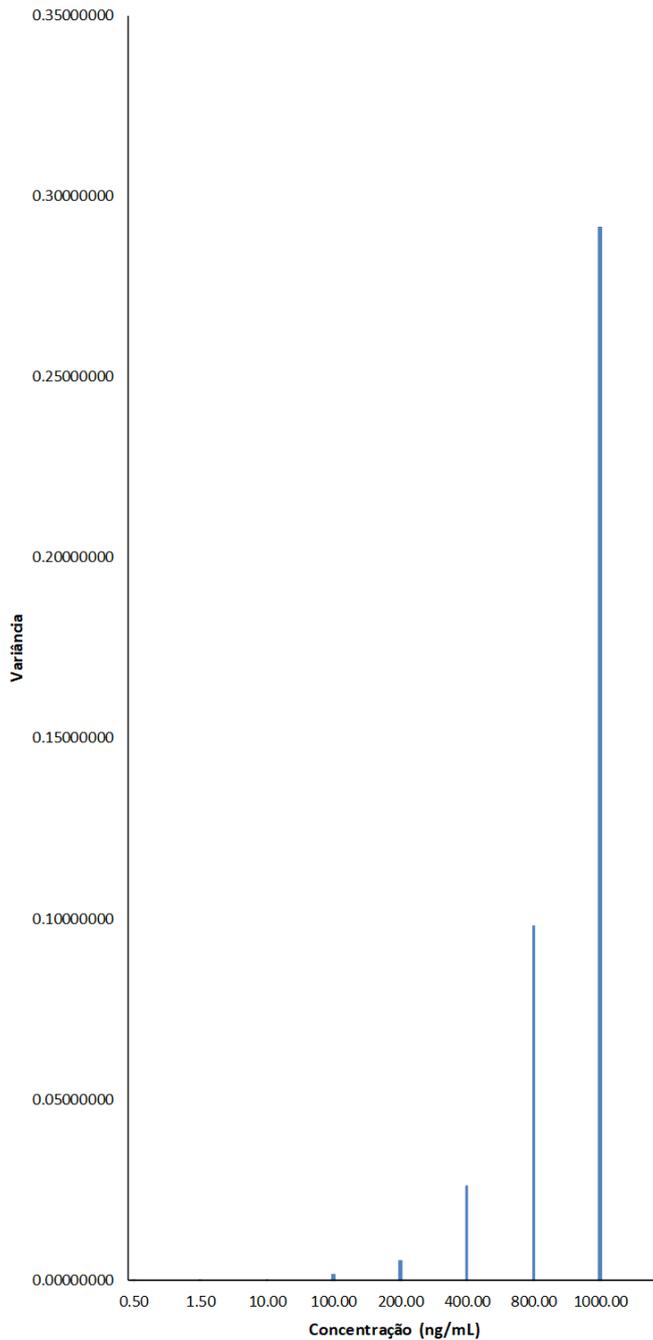
Fonte: (Do autor, 2017).

Tabela 24 – Resultado de três curvas de calibração em duplicata (n=6) e a variância para cada nível de concentração

Concentração nominal (ng/mL)	Área do analito	Área do padrão interno	Resposta	Variância
0,50	1417,08	603629,33	0,002348	0,00000026
	1383,60	527652,18	0,002622	
	1158,54	627115,52	0,001847	
	1423,31	659633,38	0,002158	
	1495,81	445937,08	0,003354	
	1821,43	699358,04	0,002604	
1,50	3348,15	578831,69	0,005784	0,00000074
	3269,49	592893,04	0,005514	
	3394,84	665545,34	0,005101	
	3771,31	630094,98	0,005985	
	4755,00	636671,38	0,007469	
	4103,20	611715,11	0,006708	
10,00	23283,61	581376,68	0,040049	0,00003974
	22395,04	593304,56	0,037746	
	24951,36	668827,76	0,037306	
	23597,52	635626,49	0,037125	
	30252,83	605572,65	0,049957	
	31503,14	627184,86	0,050229	
100,00	232940,01	559942,25	0,416007	0,00173173
	221864,25	552787,40	0,401355	
	245997,92	630210,96	0,390342	
	261355,44	640455,83	0,408077	
	294006,04	608856,83	0,482882	
	299760,08	620817,30	0,482847	
200,00	472283,11	575262,05	0,820988	0,00558919
	444314,06	582168,65	0,763205	
	517272,69	636031,89	0,813281	
	500743,15	619556,85	0,808228	
	605324,06	643725,44	0,940345	
	609125,19	647086,94	0,941334	
400,00	951389,96	594714,03	1,599744	0,02610414
	928299,96	557019,23	1,666549	
	1003499,86	635313,21	1,579536	
	1058526,70	647919,67	1,633731	
	1201647,01	631097,48	1,904059	
	1199882,13	615822,96	1,948421	
800,00	1839832,96	547208,25	3,362217	0,09829180
	1830780,51	580328,67	3,154730	
	1909556,73	645003,75	2,960536	
	1727086,57	596010,84	2,897744	
	2356378,88	631918,67	3,728927	
	2163492,57	630577,58	3,430970	
1000,00	2320824,61	578366,01	4,012726	0,29151114
	2334554,36	563840,39	4,140453	
	2432189,24	643396,38	3,780235	
	2470468,27	656463,98	3,763296	
	3040253,65	658858,70	4,614424	
	2961303,69	575681,72	5,143995	

Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 41 - Variância em função da concentração



Fonte: (Do autor, 2017).

Além disso, com o auxílio do Excel foi realizado o teste F para o nível de significância de 5 % o qual comprovou a não homocedasticidade do método, Tabela 25. Como o valor do F experimental é maior do que o F crítico, para um nível de significância de 5 %, rejeita-se a hipótese nula (H_0), admitindo-se que os dados não possuem a mesma variância, ou seja, os dados não apresentam a homocedasticidade. Dessa forma, foi necessário aplicar a ponderação.

$$F_{\text{experimental}} = \frac{\text{Variância da maior concentração (LSQ)}}{\text{Variância da menor concentração (LIQ)}}$$

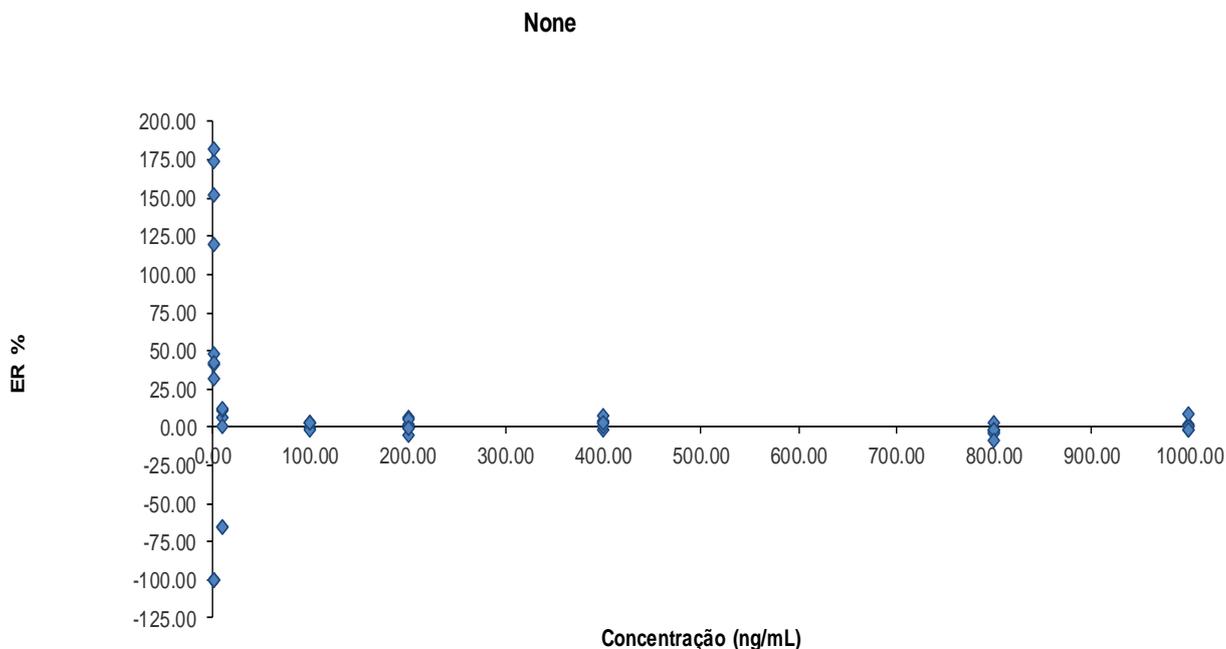
Tabela 25 - Teste-F: duas amostras para variâncias

	LSQ	LIQ
Média das respostas	4,242521436	0,002488943
Variância	0,29151114	0,00000026
n	6	6
Graus de liberdade	5	5
F experimental (calculado)	1103214,48	-
P(F<=f) uni-caudal	4,2496E-15	-
F crítico uni-caudal	5,05	-

Fonte: (Do autor, 2017).

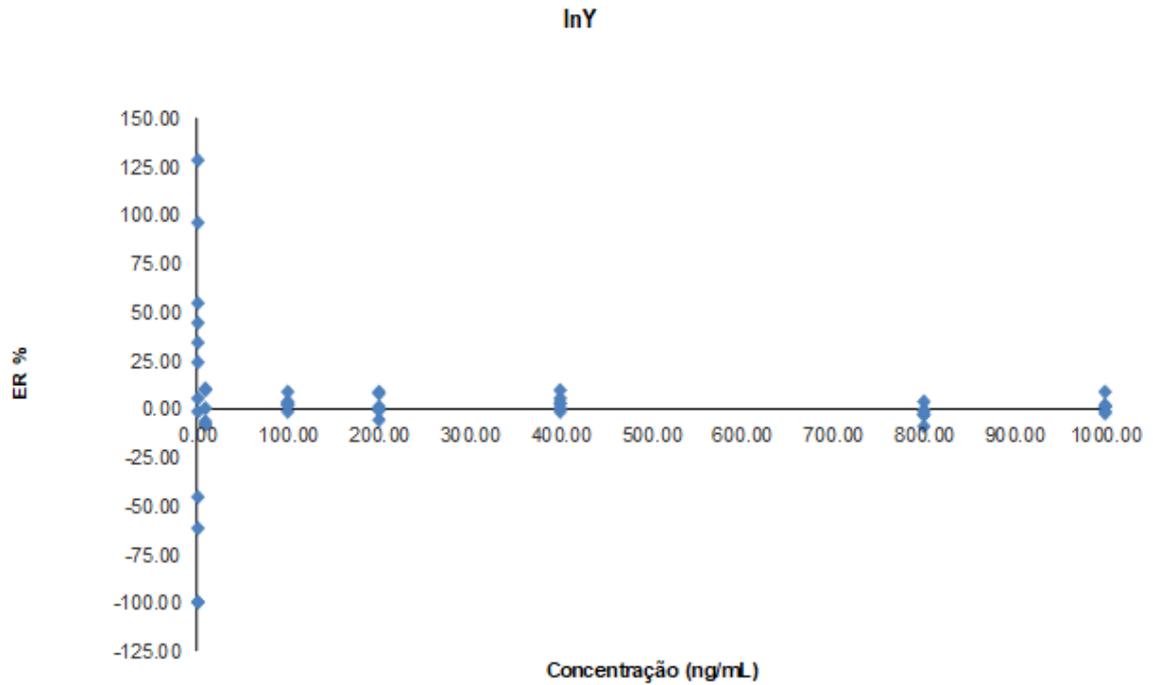
Foram testadas as seguintes ponderações para verificar o melhor tipo que pudesse ser aplicado ao método: lny, lnx, 1/y, 1/y2, 1/x e 1/x2. Em primeiro lugar, fez-se uma inspeção visual através do gráfico ER % (erro relativo percentual dos resíduos) versus concentração. Os gráficos construídos estão apresentados a seguir: Figura 42 a Figura 48.

Figura 42 - Gráfico do erro relativo percentual dos resíduos (ER %) sem ponderação (None)



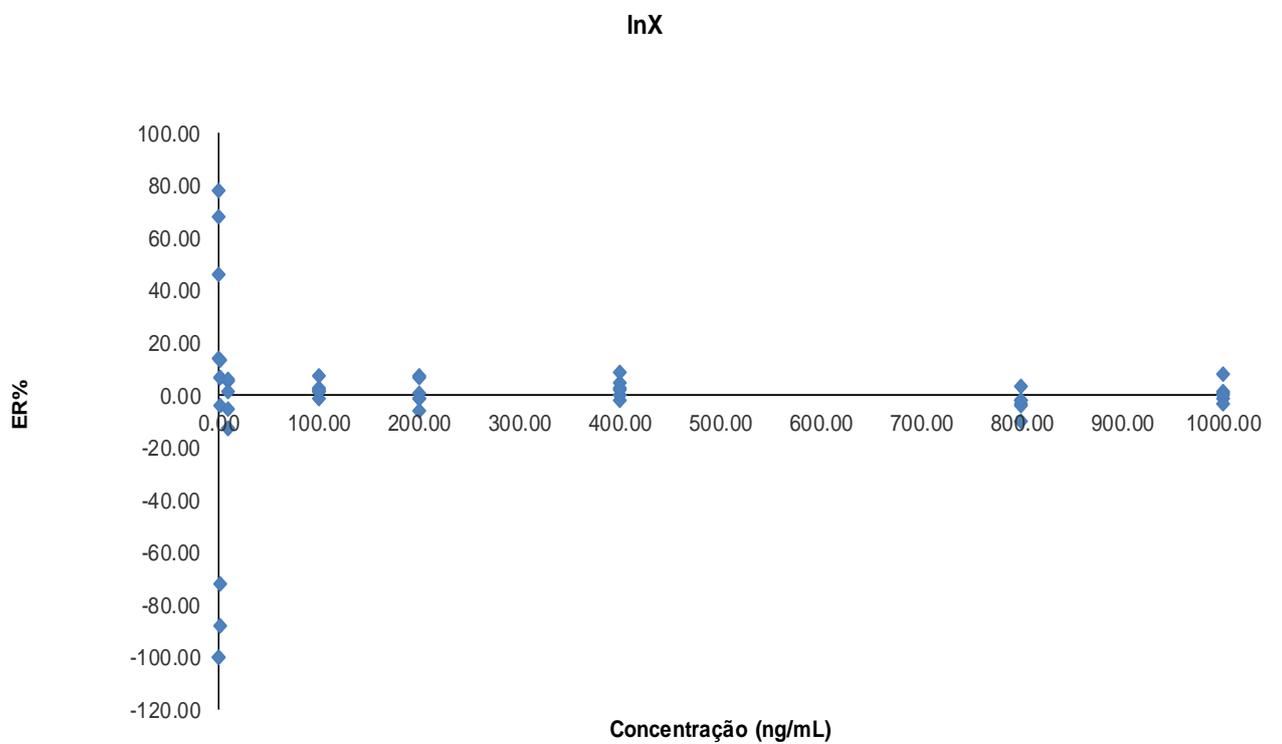
Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 43 - Gráfico do erro relativo percentual dos resíduos (ER %) com ponderação $\ln y$



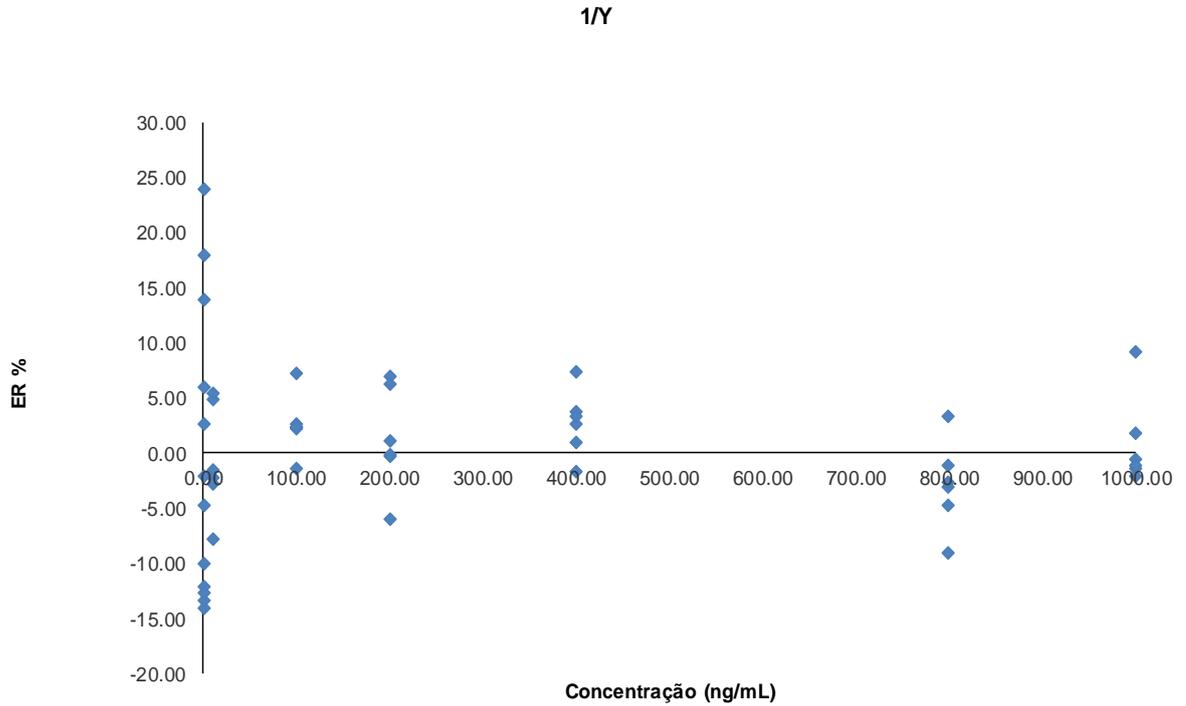
Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 44 - Gráfico do erro relativo percentual dos resíduos (ER %) com ponderação $\ln x$



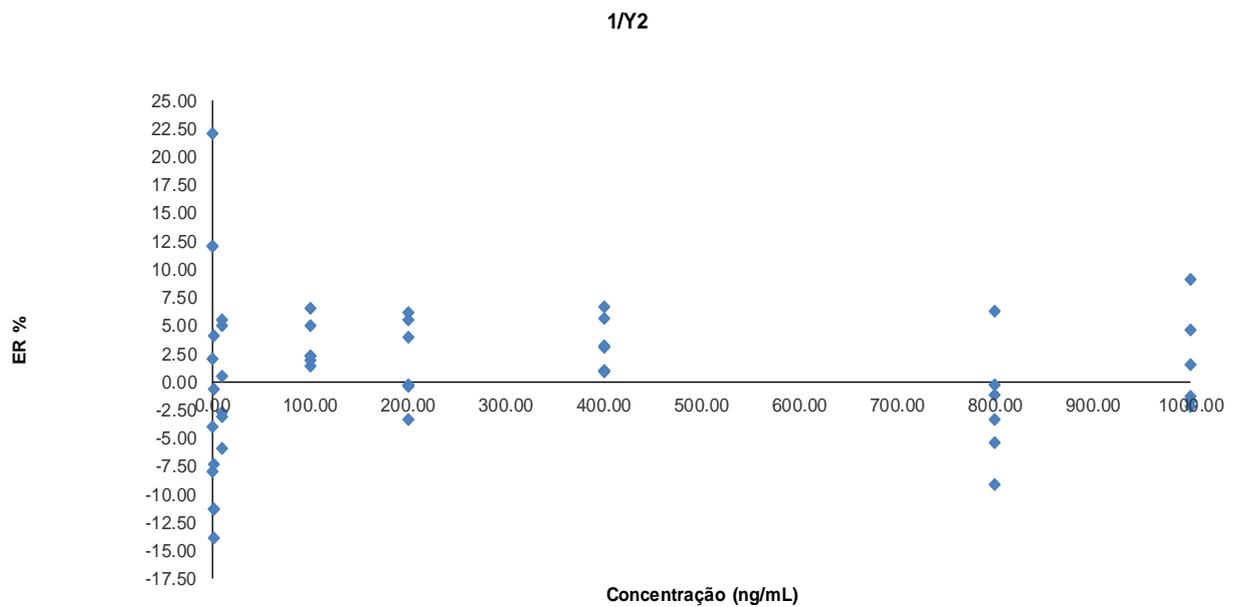
Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 45 - Gráfico do erro relativo percentual dos resíduos (ER %) com ponderação $1/y$



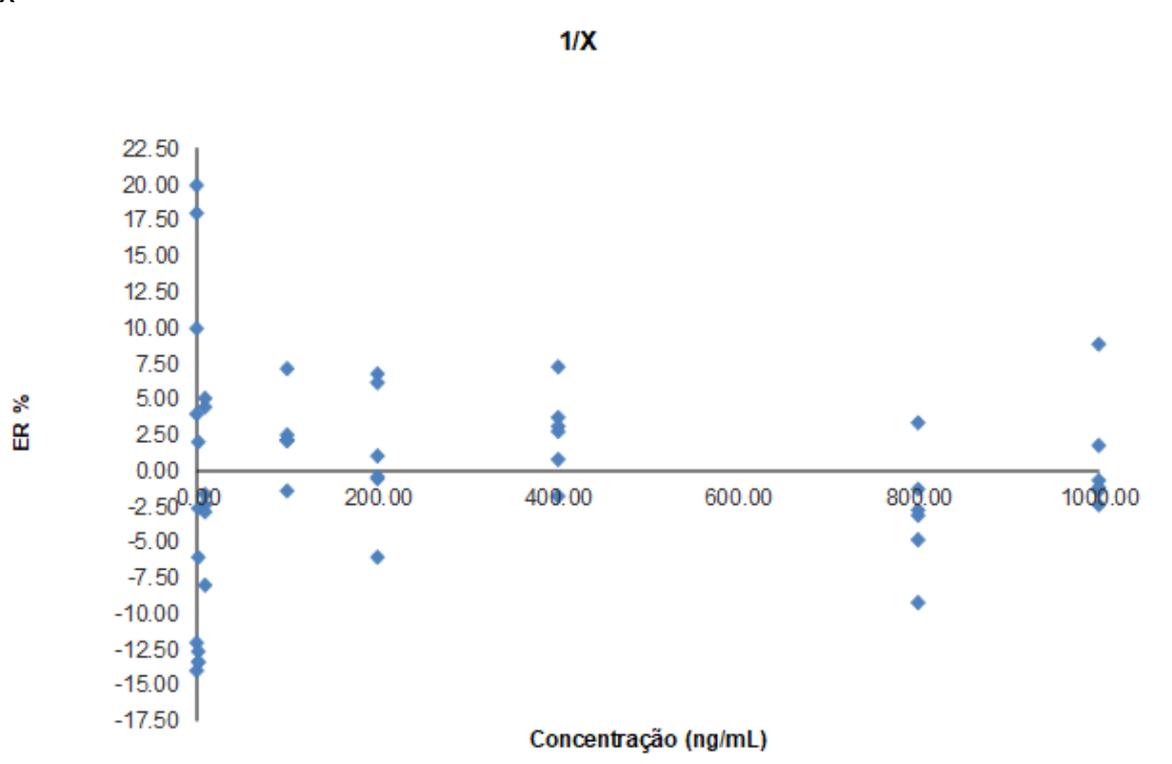
Fonte: Do autor, 2017).

Figura 46 - Gráfico do erro relativo percentual dos resíduos (ER %) com ponderação $1/y^2$



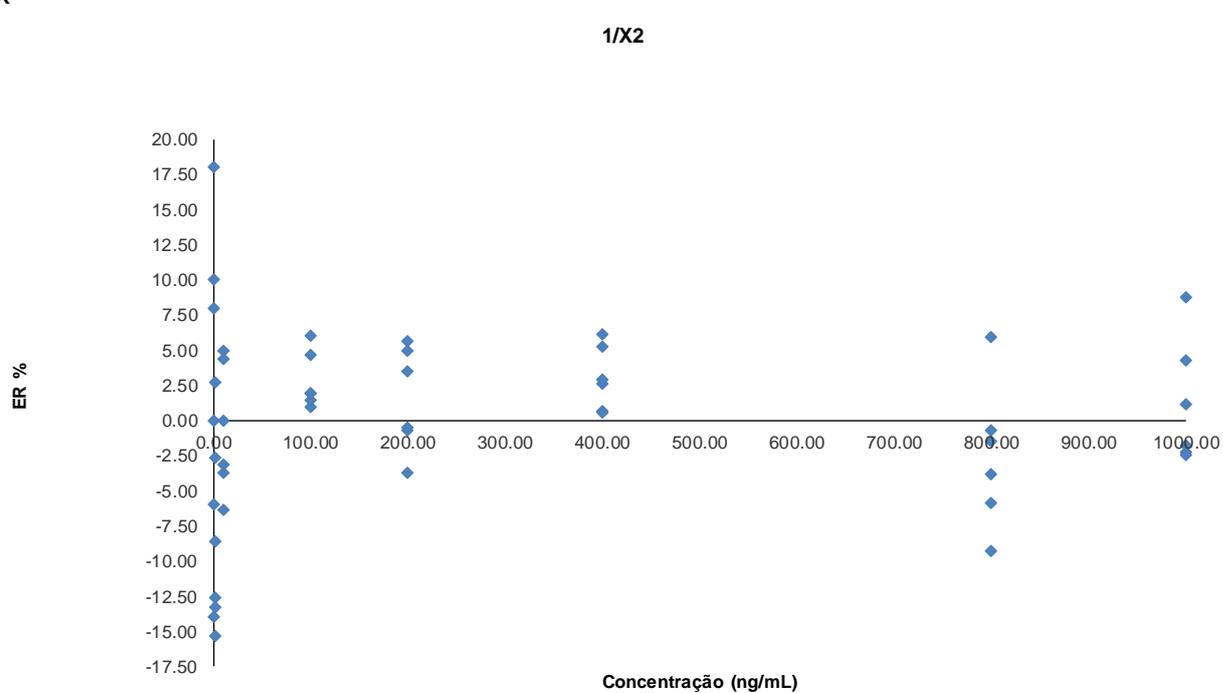
Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 47 - Gráfico do erro relativo percentual dos resíduos (ER %) com ponderação $1/x$



Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 48 - Gráfico do erro relativo percentual dos resíduos (ER %) com ponderação $1/x^2$



Fonte: (Do autor, 2017).

Após a realização da inspeção visual, a ponderação $1/x^2$ pareceu ser o melhor tipo a ser adotado, uma vez que mostrou uma menor variação em seus resíduos percentuais, menor amplitude entre o valor máximo e mínimo e menor dispersão. Porém, a inspeção visual ainda deixa dúvidas sobre a ponderação a ser selecionada. Com isso, o cálculo da soma dos erros absolutos de todas as observações foi o critério decisivo para a correta seleção da ponderação adotada (vide Tabela 26 e Tabela 27) (ALMEIDA; CASTEL-BRANCO; FALCÃO, 2002). Diante do somatório ER %, selecionou-se a forma $1/x^2$, pois apresentou a menor soma dos erros percentuais absolutos conforme demonstrado na Tabela 28.

Tabela 26 – Escolha da ponderação – Cálculo do erro residual relativo (ER %)(continua)

Conc. nominal (ng/mL)	Não ponderado		lny		lnx		1/y		1/y ²		1/x		1/x ²	
	Conc. exp. (ng/mL)	ER %	Conc. exp. (ng/mL)	ER %	Conc. exp. (ng/mL)	ER %	Conc. exp. (ng/mL)	ER %	Conc. exp. (ng/mL)	ER %	Conc. exp. (ng/mL)	ER %	Conc. exp. (ng/mL)	ER %
0,50	1,37	174,00	0,72	44,00	0,84	68,00	0,57	14,00	0,51	2,00	0,55	10,00	0,50	0,00
0,50	1,41	182,00	0,77	54,00	0,89	78,00	0,62	24,00	0,56	12,00	0,60	20,00	0,54	8,00
0,50	0,00	-100,00	0,00	-100,00	0,00	-100,00	0,45	-10,00	0,48	-4,00	0,44	-12,00	0,47	-6,00
0,50	0,00	-100,00	0,00	-100,00	0,00	-100,00	0,53	6,00	0,56	12,00	0,52	4,00	0,55	10,00
0,50	1,26	152,00	1,14	128,00	0,73	46,00	0,59	18,00	0,61	22,00	0,59	18,00	0,59	18,00
0,50	1,10	120,00	0,98	96,00	0,57	14,00	0,43	-14,00	0,46	-8,00	0,43	-14,00	0,43	-14,00
1,50	2,22	48,00	1,58	5,33	1,70	13,33	1,43	-4,67	1,39	-7,33	1,41	-6,00	1,37	-8,67
1,50	2,12	41,33	1,47	-2,00	1,60	6,67	1,32	-12,00	1,29	-14,00	1,31	-12,67	1,27	-15,33
1,50	0,00	-100,00	0,57	-62,00	0,18	-88,00	1,30	-13,33	1,33	-11,33	1,30	-13,33	1,31	-12,67
1,50	0,00	-100,00	0,81	-46,00	0,42	-72,00	1,54	2,67	1,56	4,00	1,53	2,00	1,54	2,67
1,50	2,13	42,00	2,01	34,00	1,60	6,67	1,47	-2,00	1,49	-0,67	1,46	-2,67	1,46	-2,67
1,50	1,97	31,33	1,85	23,33	1,44	-4,00	1,31	-12,67	1,33	-11,33	1,30	-13,33	1,30	-13,33
10,00	10,62	6,20	9,97	-0,30	10,11	1,10	9,85	-1,50	10,05	0,50	9,83	-1,70	10,00	0,00
10,00	9,99	-0,10	9,35	-6,50	9,48	-5,20	9,23	-7,70	9,40	-6,00	9,20	-8,00	9,36	-6,40
10,00	3,46	-65,40	9,17	-8,30	8,76	-12,40	9,78	-2,20	9,73	-2,70	9,76	-2,40	9,68	-3,20
10,00	3,41	-65,90	9,13	-8,70	8,71	-12,90	9,73	-2,70	9,68	-3,20	9,71	-2,90	9,63	-3,70
10,00	11,11	11,10	10,94	9,40	10,53	5,30	10,49	4,90	10,49	4,90	10,45	4,50	10,44	4,40
10,00	11,16	11,60	11,00	10,00	10,58	5,80	10,55	5,50	10,55	5,50	10,51	5,10	10,50	5,00
100,00	102,74	2,74	102,11	2,11	102,33	2,33	102,27	2,27	105,02	5,02	102,19	2,19	104,65	4,65
100,00	99,13	-0,87	98,51	-1,49	98,72	-1,28	98,66	-1,34	101,30	1,30	98,58	-1,42	100,95	0,95
100,00	98,14	-1,86	103,49	3,49	102,76	2,76	102,67	2,67	101,86	1,86	102,51	2,51	101,40	1,40
100,00	102,89	2,89	108,22	8,22	107,48	7,48	107,34	7,34	106,49	6,49	107,17	7,17	106,01	6,01
100,00	102,57	2,57	101,98	1,98	101,51	1,51	102,44	2,44	102,24	2,24	102,11	2,11	101,96	1,96
100,00	102,56	2,56	101,97	1,97	101,50	1,50	102,44	2,44	102,24	2,24	102,11	2,11	101,95	1,95

Fonte: (Do autor, 2017).

Tabela 27 – Escolha da ponderação – Cálculo do erro residual relativo (ER %) (conclusão)

Conc. nominal (ng/mL)	Não ponderado		lny		lnx		1/y		1/y ²		1/x		1/x ²	
	Conc. exp. (ng/mL)	ER %												
200,00	202,38	1,19	201,77	0,89	202,08	1,04	202,23	1,11	207,74	3,87	202,09	1,05	207,02	3,51
200,00	188,32	-5,84	187,71	-6,15	188,01	-6,00	188,14	-5,93	193,26	-3,37	188,00	-6,00	192,59	-3,71
200,00	211,56	5,78	216,47	8,24	215,37	7,69	213,95	6,97	212,24	6,12	213,63	6,82	211,28	5,64
200,00	210,20	5,10	215,12	7,56	214,03	7,02	212,62	6,31	210,92	5,46	212,31	6,16	209,97	4,99
200,00	199,22	-0,39	198,18	-0,91	197,65	-1,18	199,61	-0,19	199,20	-0,40	198,97	-0,52	198,67	-0,67
200,00	199,43	-0,28	198,39	-0,81	197,85	-1,08	199,82	-0,09	199,41	-0,30	199,18	-0,41	198,88	-0,56
400,00	392,89	-1,78	392,31	-1,92	392,81	-1,80	393,36	-1,66	404,15	1,04	393,09	-1,73	402,77	0,69
400,00	410,56	2,64	409,98	2,50	410,50	2,63	411,09	2,77	422,37	5,59	410,81	2,70	420,92	5,23
400,00	417,05	4,26	421,17	5,29	419,40	4,85	415,57	3,89	412,21	3,05	414,96	3,74	410,35	2,59
400,00	431,58	7,90	435,65	8,91	433,83	8,46	429,83	7,46	426,36	6,59	429,20	7,30	424,43	6,11
400,00	402,82	0,70	400,84	0,21	400,18	0,05	404,29	1,07	403,45	0,86	403,01	0,75	402,39	0,60
400,00	412,19	3,05	410,17	2,54	409,50	2,38	413,71	3,43	412,85	3,21	412,40	3,10	411,77	2,94
800,00	825,71	3,21	825,21	3,15	826,12	3,27	827,60	3,45	850,37	6,30	827,04	3,38	847,47	5,93
800,00	774,14	-3,23	773,63	-3,30	774,49	-3,19	775,85	-3,02	797,20	-0,35	775,33	-3,08	794,48	-0,69
800,00	787,40	-1,58	790,10	-1,24	787,11	-1,61	778,95	-2,63	772,62	-3,42	777,80	-2,78	769,13	-3,86
800,00	770,56	-3,68	773,33	-3,33	770,39	-3,70	762,42	-4,70	756,23	-5,47	761,30	-4,84	752,82	-5,90
800,00	788,35	-1,46	784,60	-1,93	783,68	-2,04	791,88	-1,02	790,20	-1,22	789,37	-1,33	788,17	-1,48
800,00	725,40	-9,33	721,94	-9,76	721,07	-9,87	728,60	-8,93	727,05	-9,12	726,29	-9,21	725,18	-9,35
1000,00	984,82	-1,52	984,35	-1,57	985,41	-1,46	987,23	-1,28	1014,41	1,44	986,56	-1,34	1010,95	1,10
1000,00	1015,59	1,56	1015,13	1,51	1016,22	1,62	1018,10	1,81	1046,14	4,61	1017,42	1,74	1042,57	4,26
1000,00	1007,22	0,72	1009,08	0,91	1005,37	0,54	994,63	-0,54	986,54	-1,35	993,16	-0,68	982,09	-1,79
1000,00	1002,67	0,27	1004,55	0,45	1000,86	0,09	990,17	-0,98	982,12	-1,79	988,71	-1,13	977,69	-2,23
1000,00	975,43	-2,46	970,81	-2,92	969,78	-3,02	979,96	-2,00	977,87	-2,21	976,85	-2,32	975,36	-2,46
1000,00	1087,31	8,73	1082,18	8,22	1081,07	8,11	1092,43	9,24	1090,11	9,01	1088,97	8,90	1087,31	8,73

Fonte: (Do autor, 2017).

Tabela 28 - Escolha da ponderação – Somatório do erro residual relativo (ER %)

Somatório ER %	PONDERAÇÃO						
	Não ponderado	lny	lnx	1/y	1/y ²	1/x	1/x ²
	1441,11	841,32	738,87	256,82	236,78	251,10	235,96

Fonte: (Do autor, 2017).

Além disso, as curvas de calibração avaliadas apresentaram os coeficientes de correlação adequados conforme demonstrado na Tabela 29.

Tabela 29 - Resultados da avaliação da linearidade

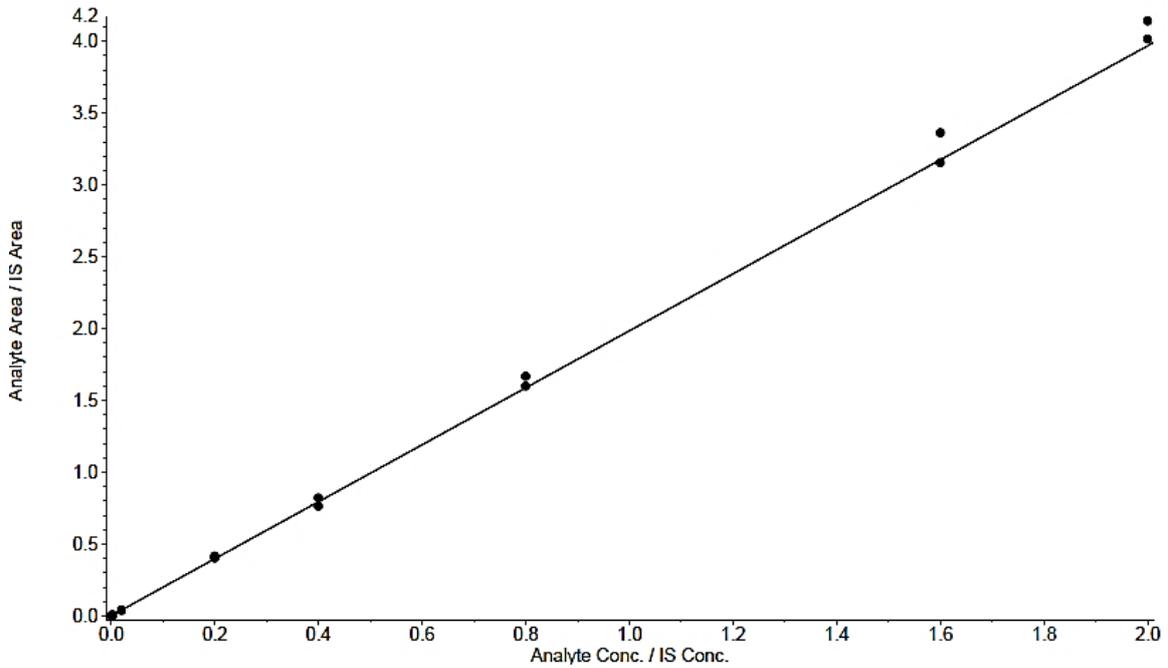
Ensaio	Coefficiente de correlação	Ponderação
Curva de calibração 01	0,9976	1/X ²
Curva de calibração 02	0,9979	1/X ²
Curva de calibração 03	0,9963	1/X ²

Fonte: (Do autor, 2017).

Seguem as curvas de calibração avaliadas neste ensaio: Figura 49, Figura 50 e Figura 51.

Figura 49 - Curva de calibração 01 - ponderação 1/x²

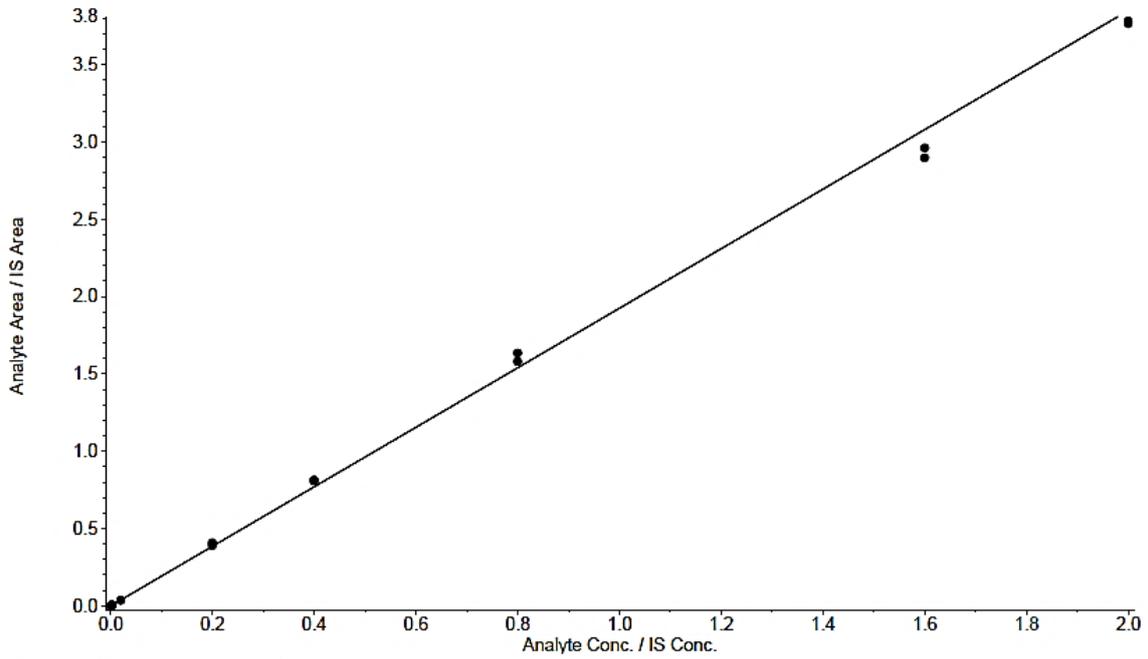
■ VAL01_SFB_12062017.rdb (Sofosbuvir 01): "Linear" Regression ("1 / (x * x)" weighting): y = 1.98 x + 0.000419 (r = 0.9976)



Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 50 - Curva de calibração 02 - ponderação $1/x^2$

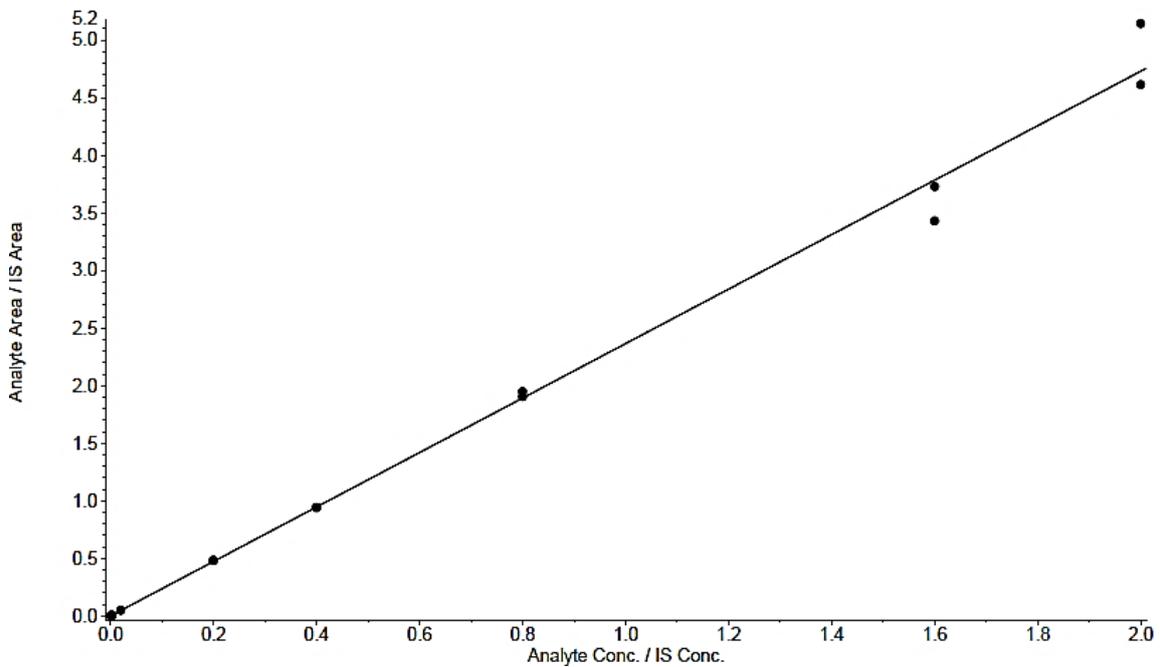
■ VAL05_SFB_13062017.rdb (Sofosbuvir 01): "Linear" Regression ("1 / (x * x)" weighting): $y = 1.92x + 4.47e-005$ ($r = 0.9979$)



Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 51 - Curva de calibração 03 - ponderação $1/x^2$

■ VAL09_SFB_14062017.rdb (Sofosbuvir 01): "Linear" Regression ("1 / (x * x)" weighting): $y = 2.37x + 0.000557$ ($r = 0.9963$)



Fonte: (Do autor, 2017).

4.2.7 Teste de precisão e exatidão – TPE

A avaliação da precisão e exatidão incluiu ensaios de diluição das amostras em matriz biológica para a validar a quantificação de amostras de voluntários cujas concentrações sejam superiores ao LSQ. O processo de diluição validado promoveu uma diluição de quatro vezes.

Foram realizados três ensaios de precisão e exatidão, executados em dias diferentes, avaliando-se a precisão e exatidão intradia e interdía. Em todos os dias em que os ensaios foram realizados, a precisão dos controles de qualidade foi adequada, com o coeficiente de variação de até 20 % para o LIQ e para os demais níveis dentro de até 15 %. A exatidão também foi considerada adequada, pois desvio em relação à concentração nominal permaneceu dentro da faixa de 85% a 115%, exceto para o LIQ cujo desvio máximo aceitável foi de 20 %.

Os resultados dos ensaios realizados em cada dia (intracorrída) bem como os resultados intercorrídas encontram-se nas tabelas a seguir: Tabela 30, Tabela 31, Tabela 32 e Tabela 33. Em cada dia, as injeções foram identificadas por códigos como a amostra TPE0022, que corresponde a primeira amostra do controle de qualidade ao nível do LIQ e a amostra TDMB0054, que corresponde ao primeiro controle de qualidade de diluição da corrída.

Tabela 30 - Resultados dos controles de qualidade empregados no teste de precisão e exatidão 01

Controle de qualidade	Código da amostra na corrida analítica	Conc. nominal (ng/mL)	Conc. experimental (ng/mL)	Média (n=8)	Precisão (%)	Exatidão (%)
LIQ	TPE0022	0,50	0,56	0,50	6,94	100,70
	TPE0023		0,44			
	TPE0024		0,51			
	TPE0025		0,51			
	TPE0026		0,49			
	TPE0027		0,49			
	TPE0028		0,52			
	TPE0029		0,51			
CQB	TPE0030	1,50	1,55	1,47	9,27	97,72
	TPE0031		1,41			
	TPE0032		1,52			
	TPE0033		1,63			
	TPE0034		1,58			
	TPE0035		1,47			
	TPE0036		1,33			
	TPE0037		1,23			
CQM	TPE0038	400,00	441,72	454,90	3,82	113,72
	TPE0039		446,81			
	TPE0040		468,13			
	TPE0041		460,81			
	TPE0042		444,23			
	TPE0043		451,48			
	TPE0044		489,52			
	TPE0045		436,50			
CQA	TPE0046	800,00	845,52	877,10	3,63	109,64
	TPE0047		857,42			
	TPE0048		879,84			
	TPE0049		913,26			
	TPE0050		847,89			
	TPE0051		915,69			
	TPE0052		910,54			
	TPE0053		846,61			
CQD	TDMB0054	3200,00 (800,00)	872,06	870,91	3,93	108,86
	TDMB0055		823,84			
	TDMB0056		855,20			
	TDMB0057		913,16			
	TDMB0058		832,61			
	TDMB0059		894,51			
	TDMB0060		913,96			
	TDMB0061		861,96			

Fonte: (Do autor, 2017).

Tabela 31 - Resultados dos controles de qualidade empregados no teste de precisão e exatidão 02

Controle de qualidade	Código da amostra na corrida analítica	Conc. nominal (ng/mL)	Conc. experimental (ng/mL)	Média (n=8)	Precisão (%)	Exatidão (%)
LIQ	TPE0084	0,50	0,63	0,59	12,45	118,21
	TPE0085		0,59			
	TPE0086		0,63			
	TPE0087		0,68			
	TPE0088		0,51			
	TPE0089		0,66			
	TPE0090		0,51			
	TPE0091		0,51			
CQB	TPE0092	1,50	1,38	1,48	8,27	98,92
	TPE0093		1,38			
	TPE0094		1,61			
	TPE0095		1,35			
	TPE0096		1,61			
	TPE0097		1,66			
	TPE0098		1,43			
	TPE0099		1,45			
CQM	TPE0100	400,00	390,11	401,45	3,10	100,36
	TPE0101		415,44			
	TPE0102		406,69			
	TPE0103		405,44			
	TPE0104		404,62			
	TPE0105		377,67			
	TPE0106		398,53			
	TPE0107		413,10			
CQA	TPE0108	800,00	792,04	806,38	3,06	100,80
	TPE0109		845,23			
	TPE0110		809,75			
	TPE0111		807,74			
	TPE0112		800,00			
	TPE0113		834,77			
	TPE0114		794,18			
	TPE0115		767,32			
CQD	TDMB0116	3200,00 (800,00)	715,04	778,04	4,01	97,26
	TDMB0117		804,36			
	TDMB0118		805,77			
	TDMB0119		777,04			
	TDMB0120		759,35			
	TDMB0121		769,78			
	TDMB0122		808,66			
	TDMB0123		784,36			

Fonte: (Do autor, 2017).

Tabela 32 - Resultados dos controles de qualidade empregados no teste de precisão e exatidão 03

Controle de qualidade	Código da amostra	Conc. nominal (ng/mL)	Conc. experimental (ng/mL)	Média (n=8)	Precisão (%)	Exatidão (%)
LIQ	TPE0194	0,50	0,48	0,45	8,37	90,78
	TPE0195		0,45			
	TPE0196		0,42			
	TPE0197		0,50			
	TPE0198		0,38			
	TPE0199		0,46			
	TPE0200		0,46			
	TPE0201		0,49			
CQB	TPE0202	1,50	1,49	1,51	4,99	100,81
	TPE0203		1,48			
	TPE0204		1,44			
	TPE0205		1,61			
	TPE0206		1,64			
	TPE0207		1,47			
	TPE0208		1,53			
	TPE0209		1,44			
CQM	TPE0210	400,00	430,98	422,81	4,00	105,70
	TPE0211		453,48			
	TPE0212		433,56			
	TPE0213		400,79			
	TPE0214		411,32			
	TPE0215		407,40			
	TPE0216		419,06			
	TPE0217		425,89			
CQA	TPE0218	800,00	853,17	828,15	3,78	103,52
	TPE0219		786,55			
	TPE0220		826,64			
	TPE0221		843,03			
	TPE0222		779,34			
	TPE0223		824,51			
	TPE0224		868,68			
	TPE0225		843,29			
CQD	TDMB0226	3200,00 (800,00)	810,96	837,46	3,03	104,68
	TDMB0227		846,86			
	TDMB0228		825,60			
	TDMB0229		824,01			
	TDMB0230		818,73			
	TDMB0231		848,55			
	TDMB0232		833,50			
	TDMB0233		891,47			

Fonte: (Do autor, 2017).

Tabela 33 - Resultados do Teste de precisão e exatidão interdias

Ensaio realizado	Controle de qualidade				
	LIQ (0,50)	CQB (1,50)	CQM (400,00)	CQA (800,00)	CQD (3200,00/ 800,00)
	Concentração experimental (ng/mL)				
TPE01 - Precisão e Exatidão 01	0,50	1,47	454,90	877,10	870,91
TPE02 - Precisão e Exatidão 02	0,59	1,48	401,45	806,38	778,04
TPE03 - Precisão e Exatidão 03	0,56	1,52	395,49	754,65	736,73
Média	0,55	1,49	417,28	812,71	795,23
Precisão (CV%)	8,01	1,68	7,84	7,56	8,64
Exatidão %	110,09	99,21	104,32	101,59	99,40

Fonte: (Do autor, 2017).

4.2.8 Estabilidade em matriz biológica

Para a avaliação da estabilidade do sofosbuvir em matriz plasma foram preparadas amostras de controle de qualidade baixo e alto (CQB e CQA) as quais foram submetidas às condições em teste a fim de se avaliar sua estabilidade. O objetivo dos ensaios é simular as condições pelas quais as amostras dos voluntários (amostras de concentração desconhecida) foram submetidas e com isso, garantir a confiabilidade dos resultados. Foram avaliadas a estabilidade de curta duração em temperatura ambiente (+22,5 °C, TEBCD), a estabilidade de pós-processamento (TEBPP), a estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento (TEBCCD) e a estabilidade de longa duração (TEBLD). Além disso, também foi realizado um ensaio denominado TQI, que possui a função de referendar os controles de qualidade preparados conforme apresentado no item 3.5.8. Seguem resultados. Como critério de aprovação, adotou-se o exigido em legislação: desvio em relação ao valor nominal de até $\pm 15\%$ e CV de até 15 %.

4.2.8.1 Teste de Quantificação Inicial – TQI

Os resultados do ensaio aprovado encontram-se na Tabela 34. As injeções foram identificadas por códigos, como TQI0022 que corresponde a primeira amostra do controle de qualidade ao nível do CQB.

Tabela 34 - Resultados dos controles de qualidade empregados no teste de quantificação inicial - TQI

Controle de qualidade	Código da amostra na corrida analítica	Conc. nominal (ng/mL)	Conc. experimental (ng/mL)	Média (n=8)	CV (%)	Exatidão (%)
CQB	TQI00022	1,50	1,45	1,40	4,78	93,18
	TQI00023		1,38			
	TQI00024		1,46			
	TQI00025		1,47			
	TQI00026		1,37			
	TQI00027		1,43			
	TQI00028		1,28			
	TQI00029		1,34			
CQA	TQI00030	800,00	835,34	879,40	7,86	109,92
	TQI00031		879,36			
	TQI00032		1031,32			
	TQI00033		905,07			
	TQI00034		866,65			
	TQI00035		816,58			
	TQI00036		819,30			
	TQI00037		881,59			

Fonte: (Do autor, 2017).

4.2.8.2 Teste de estabilidade de curta duração – TEBCD

De acordo com a RDC nº 27, as amostras do estudo de estabilidade (CQB's e CQA's) de curta duração permaneceram sob temperatura do laboratório, por tempo superior ao que as amostras dos voluntários/participantes da pesquisa, garantindo a confiabilidade dos resultados. Neste ensaio foi comprovada a inexistência de

degradação do sofobuvir quando amostras biológicas são mantidas sob temperatura do laboratório (22,0 °C) por 19 horas e 09 minutos. As injeções foram identificadas por códigos, como amostra TEBCD0081 que corresponde a primeira amostra do controle de qualidade ao nível do CQB. Seguem os resultados aprovados conforme preconizado pela resolução, Tabela 35.

Tabela 35 - Resultados dos controles de qualidade empregados no teste de estabilidade de curta duração

Período apurado do teste de estabilidade (h:min):			19:09			
Controle de qualidade	Código da amostra na corrida	Conc. nominal (ng/mL)	Conc. experimental (ng/mL)	Média (n=8)	CV (%)	Desvio (%)
CQB	TEBCD0081	1,50	1,42	1,45	5,45	-3,32
	TEBCD0082		1,45			
	TEBCD0083		1,34			
	TEBCD0084		1,44			
	TEBCD0085		1,61			
	TEBCD0086		1,47			
	TEBCD0087		1,47			
	TEBCD0088		1,39			
CQA	TEBCD0089	800,00	831,70	824,28	6,48	3,03
	TEBCD0090		796,22			
	TEBCD0091		807,65			
	TEBCD0092		725,69			
	TEBCD0093		846,27			
	TEBCD0094		817,17			
	TEBCD0095		859,49			
	TEBCD0096		910,01			

Fonte: (Do autor, 2017).

4.2.8.3 Teste de estabilidade de pós-processamento – TEBPP

Neste ensaio, as amostras permaneceram no autoinjeter do equipamento por 42 horas e 39 minutos, que foi superior ao tempo em que amostras dos voluntários da pesquisa permaneceram. As injeções foram identificadas por códigos, como a amostra TEBPP00219 que corresponde a primeira amostra do controle de qualidade

ao nível do CQB. Foi comprovada a inexistência de degradação conforme resultados expostos na Tabela 36.

Tabela 36 - Resultados dos controles de qualidade empregados no teste de estabilidade de pós-processamento - TEBPP

Período apurado do teste de estabilidade (h:min)		(42:39)				
Controle de qualidade	Código da amostra na corrida analítica	Conc. nominal (ng/mL)	Conc. experimental (ng/mL)	Média (n=8)	CV (%)	Desvio (%)
CQB	TEBPP00219	1,50	1,26	1,32	11,33	-12,13
	TEBPP00220		1,27			
	TEBPP00221		1,50			
	TEBPP00222		1,29			
	TEBPP00223		1,50			
	TEBPP00224		1,44			
	TEBPP00225		1,10			
	TEBPP00226		1,17			
CQA	TEBPP00227	800,00	784,53	790,89	2,65	-1,14
	TEBPP00228		798,89			
	TEBPP00229		755,95			
	TEBPP00230		773,42			
	TEBPP00231		807,67			
	TEBPP00232		811,05			
	TEBPP00233		816,12			
	TEBPP00234		779,51			

Fonte: (Do autor, 2017).

4.2.8.4 Teste de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento – TEBCCD

Neste ensaio foi comprovada a inexistência de degradação quando amostras biológicas são mantidas congeladas em freezer -70 °C e descongeladas sob a temperatura laboratorial por 7 vezes, em um intervalo de tempo de 161 horas e 28 minutos. As injeções foram identificadas por códigos, como a amostra TEBCCD00319 que corresponde a primeira amostra do controle de qualidade ao nível do CQB. Seguem os resultados do ensaio conforme tabelas, Tabela 37 e Tabela 38, que foi considerado aprovado segundo exigências da legislação vigente.

Tabela 37 - Registros de data, hora e temperatura dos ciclos de congelamento e descongelamento - TEBCCD

Ciclos	Dia	Hora de saída do freezer	Hora de entrada no freezer	Temperatura de descongelamento (°C)	Temperatura de congelamento (°C)
Congelamento	01	-----	16h:45min	-----	-69.0
1º Ciclo	02	08h:10min	08h:55min	+22,5	-70.0
2º Ciclo	03	12h:00min	12h:27min	+23.0	-69.0
3º Ciclo	04	09h:50min	10h:30min	+22.0	-70.0
4º Ciclo	05	10h:05min	10h:45min	+23.0	-69.0
5º Ciclo	06	10h:35min	11h:05min	+22.5	-70.0
6º Ciclo	07	10h:20min	11h:00min	+22.5	-69.0
7º Ciclo	08	10h:13min	-----	+22.0	-----

Fonte: (Do autor, 2017).

Tabela 38 - Resultados dos controles de qualidade empregados no teste de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento - TEBCCD

Período apurado do teste de estabilidade (h:min)/número de ciclos			161:28/7 Ciclos			
Controle de qualidade	Código da amostra na corrida analítica	Conc. nominal (ng/mL)	Conc. experimental (ng/mL)	Média (n=8)	CV (%)	Desvio (%)
CQB	TEBCCD00319	1,50	1,73	1,56	8,07	3,70
	TEBCCD00320		1,62			
	TEBCCD00321		1,36			
	TEBCCD00322		1,42			
	TEBCCD00323		1,64			
	TEBCCD00324		1,59			
	TEBCCD00325		1,48			
	TEBCCD00326		1,60			
CQA	TEBCCD00327	800,00	784,11	799,12	3,01	-0,11
	TEBCCD00328		843,48			
	TEBCCD00329		795,38			
	TEBCCD00330		777,02			
	TEBCCD00331		790,22			
	TEBCCD00332		788,00			
	TEBCCD00333		829,92			
	TEBCCD00334		784,78			

Fonte: (Do autor, 2017).

4.2.8.5 Teste de estabilidade de longa duração – TEBLD

Os resultados do ensaio de TEBLD demonstraram que as amostras de controle de qualidade contendo sofosbuvir são estáveis por até 2201 horas e 45 minutos, quando mantidas em freezer -70 °C. Esse tempo foi superior ao tempo que as amostras dos voluntários do ensaio farmacocinético permaneceram armazenadas, que foi de 2146 horas e 03 minutos. As injeções foram identificadas por códigos como a amostra TEBLD0461 que corresponde a primeira amostra do controle de qualidade ao nível do CQB. Seguem resultados do ensaio, Tabela 39, considerado aprovado conforme especificação.

Tabela 39 - Resultados dos controles de qualidade empregados no teste de estabilidade de longa duração - TEBLD

Período apurado do teste de estabilidade(h:min)			2201:45			
Controle de qualidade	Código da amostra na corrida analítica	Conc. nominal (ng/mL)	Conc. experimental (ng/mL)	Média (n=8)	CV (%)	Desvio (%)
CQB	TEBLD0461	1,50	1,75	1,67	5,40	11,37
	TEBLD0462		1,66			
	TEBLD0463		1,53			
	TEBLD0464		1,79			
	TEBLD0465		1,77			
	TEBLD0466		1,59			
	TEBLD0467		1,64			
	TEBLD0468		1,63			
CQA	TEBLD0469	800,00	962,58	913,54	2,56	14,19
	TEBLD0470		904,50			
	TEBLD0471		931,51			
	TEBLD0472		895,00			
	TEBLD0473		910,28			
	TEBLD0474		890,21			
	TEBLD0475		902,06			
	TEBLD0476		912,16			

Fonte: (Do autor, 2017).

4.2.8.6 Testes de estabilidade em matriz biológica – Conclusão

Foi comprovada a estabilidade do sofobuvir na matriz biológica plasma conforme ensaios presentes na legislação. A Tabela 40 apresenta um resumo dos resultados dos ensaios realizados.

Tabela 40 – Estabilidade do analito em matriz biológica

Estabilidade em matriz	Período (h:min)	Valores				
		Controle de qualidade	Conc. Nominal (ng/mL)	Conc.média n=8 (ng/mL)	CV n=8 (%)	Desvio n=8 (%)
TEBCD	19h:09min	CQB	1,50	1,45	5,45	-3,32
		CQA	800,00	824,28	6,48	3,03
TEBPP	42h:39min (2 dias)	CQB	1,50	1,32	11,33	-12,13
		CQA	800,00	790,89	2,65	-1,14
TEBCCD	161h:28min (7 ciclos)	CQB	1,50	1,56	8,07	3,70
		CQA	800,00	799,12	3,01	-0,11
TEBLD	2201h:45min (92 dias)	CQB	1,50	1,67	5,40	11,37
		CQA	800,00	913,54	2,56	14,19

Fonte: (Do autor, 2017).

4.2.9 Estabilidade em solução

Neste item, foram avaliadas as estabilidades das soluções do sofobuvir e da cimetidina, confeccionadas conforme item 3.4.2, sob a temperatura do laboratório por um curto período de tempo (TEBCDS) e sob a temperatura de armazenamento(em freezer -70 °C) por um longo período de tempo (TEBSTA). Nos ensaios, foram analisadas oito réplicas para cada nível de concentração as quais foram comparadas com soluções recém-preparadas. As soluções em teste cumpriram o exigido pela legislação: desvio de $\pm 10\%$ em relação às soluções recém-preparadas e CV de até 15 %.

As soluções dos fármacos concomitantes (4-MAA, metoclopramida e paracetamol) e substâncias interferentes (nicotina e cafeína) não foram avaliadas conforme justificativa apresentada em 3.5.9.

4.2.9.1 Teste de estabilidade de curta duração das soluções de trabalho – TEBCDS

No teste de estabilidade de curta duração das soluções de trabalho as soluções em teste foram deixadas sob à temperatura do laboratório (+22,5 °C) por 24 horas e 43 minutos e então suas respostas foram comparadas com soluções de trabalho recém-preparadas. A média das áreas provenientes das soluções submetidas ao teste de estabilidade, quando comparadas com as soluções recém-preparadas, cumpriram o exigido pela legislação vigente. Portanto, as soluções são estáveis frente às condições testadas conforme resultados mostrados na Tabela 41.

Tabela 41 - Resultados do teste de estabilidade de curta duração das soluções de trabalho – valores de área do analito e padrão interno - TEBCDS

Solução empregada	Teste de estabilidade de curta duração das soluções de trabalho (TEBCDS)				Desvio (%)
	Amostras recém preparadas (TASRP)		Amostras após 24h:43min (TEBCDS)		
	Média	CV (%)	Média	CV (%)	
LIQ	2309,54	5,38	2200,77	4,31	-4,71
SME sofosbuvir	3523152,43	1,27	3470666,07	1,79	-1,49
STB-PI	1260759,78	2,78	1265806,25	1,95	0,40
SME cimetidina	17679431,73	1,30	17450651,09	1,50	-1,29

Fonte: (Do autor, 2017)

4.2.9.2 Teste de estabilidade das soluções de trabalho armazenadas – TEBSTA

No teste de estabilidade das soluções de trabalho armazenadas, as soluções foram avaliadas quanto a sua estabilidade sob a temperatura de armazenamento (em freezer -70°C) por um longo período de tempo. Assim como para o ensaio de TEBCDS, foram preparadas oito réplicas para cada nível testado. Elas foram deixadas sob à temperatura de armazenamento de -70 °C por 159 horas e 55 minutos (7 dias) e então suas respostas foram comparadas com soluções de trabalho recém-preparadas. A média das áreas provenientes das soluções submetidas ao teste de estabilidade, quando comparadas com as soluções recém-preparadas, cumpriram o exigido pela legislação vigente. Portanto, as soluções são estáveis frente às condições

testadas conforme resultados expostos na Tabela 42. Esse tempo de 7 dias foi considerado o prazo de validade das soluções.

Tabela 42 - Resultados do teste de estabilidade das soluções de trabalho armazenadas – valores de área do analito e padrão interno - TEBSTA

Solução empregada	Teste de estabilidade das soluções de trabalho armazenadas (TEBSTA)				Desvio (%)
	Amostras recém-preparadas (TASRP)		Amostras após 159h:55min / 7 dias (TEBSTA)		
	Média	CV (%)	Média	CV (%)	
LIQ	2324,32	4,25	2382,55	7,07	2,51
SME-sofosbuvir	3376666,68	0,71	3382909,09	1,09	0,18
STB-PI	1292917,43	3,04	1264970,62	3,78	-2,16
SME-cimetidina	8561410,71	3,05	8583550,36	2,34	0,26

Fonte: (Do autor, 2017).

4.2.9.3 Testes de estabilidade em solução – Conclusão

Foi comprovada a estabilidade do sofosbuvir e da cimetidina em solução de Metanol/água (80:20) (v/v) conforme ensaios definidos legislação vigente. A Tabela 43 apresenta um resumo dos resultados dos ensaios realizados.

Tabela 43 - Resultados dos testes de estabilidade em solução

Estabilidade em solução	Período (h:min)	Valores				
		Nível de concentração	Conc. Nominal (ng/mL)	Média (unidades de área)	CV (%)	Desvio (%)
TEBCDS	24h:43min	LIQ	0,50	2200,77	4,31	-4,71
		SME Sofosbuvir	1000000,00	3470666,07	1,79	-1,49
		STB-PI	1000,00	1265806,25	1,95	0,40
		SME cimetidina	1000000,00	17450651,09	1,50	-1,29
TEBSTA	159h:55min (7 dias)	LIQ	0,50	2382,55	7,07	2,51
		SME sofosbuvir	1000000,0	3382909,09	1,09	0,18
		STB-PI	1000,00	1264970,62	3,78	-2,16
		SME cimetidina	1000000,00	8583550,36	2,34	0,26

Fonte: (Do autor, 2017).

4.3 Ensaio farmacocinético

A realização do ensaio farmacocinético ocorreu mediante anuência do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), o qual autorizou a realização de todas as etapas referentes ao estudo. As amostras foram coletadas conforme os itens 3.6.1, 3.6.2 e 3.6.3 e então enviadas ao laboratório onde foram analisadas em lotes, obedecendo-se todas as condições estabelecidas na validação do método bioanalítico. Cada lote foi preparado conforme descrição apresentada no item 3.6.5. Uma vez finalizadas as análises das amostras dos 69 voluntários, os resultados foram tratados no *software* Phoenix WinNolin versão 6.3 (Certara®, USA) e, por meio análise não compartimental, foram obtidos os parâmetros farmacocinéticos: $C_{máx}$, $T_{máx}$, ASC_{0-t} , $ASC_{0-\infty}$, K_e e $T_{1/2\beta}$. Na Tabela 44, são apresentados dados farmacocinéticos do sofosbuvir de estudos disponíveis na literatura e na Tabela 45, são apresentados dados referentes ao desenho experimental dos estudos discutidos neste trabalho.

Tabela 44 - Parâmetros farmacocinéticos médios (desvio padrão) após a administração oral de 400 mg de sofosbuvir

Parâmetros	Presente trabalho (2017) n=69	Rezk, Basalious, Amin (2016) n=28	*Rezk et al, (2016) n=28	Abdallah, Ab,del-Megied, Gouda (2017) n=3	Rezk, Basalious Karim (2015) n=24	Bahrami et al (2016) n=24	Miraghaei et al (2017) n=24	Kirby et al (2015) n=59	LI et al (2018) n=14
C_{max} (ng/mL)	372,18 (278,87)	855,29 (512,27)	1821 (721)	910,00 (50,91)	1860,10 (739,10)	1283,00 (622,00)	1359 (730)	622 (348,9)	1001,7 (465,8)
ASC_{0-t} hr*(ng/mL)	353,24 (212,70)	1231,05 (537,36)	2418,116 (1175,03)	1104,85 (230,26)	2062,50 (898,80)	1461,10 (591,00)	1204,1 (582)	Não informado	Não informado
$ASC_{0-\infty}$ hr*(ng/mL)	356,95 (215,12)	1232,27 (537,45)	2353,63 (938,66)	1105,73 (229,79)	2078,80 (898,00)	1481,00 (599,00)	1434,5 (418)	629 (282,4)	861,0 (323,7)
T_{max} (h)	1,69 (1,70)	1,25	0,75	0,50 (0,00)	0,75	1,28 (0,60)	1,24 (0,5)	Não informado	0,50
$T_{1/2\beta}$ (h)	0,51 (0,27)	1,25 (0,40)	1,17 (0,4)	1,36 (0,66)	0,54 (0,260)	0,93 (0,30)	1,02 (0,4)	0,4	0,38
K_e (1/h)	1,54 (0,43)	0,6020 (0,1616)	Não informado	0,58 (0,28)	1,39 (0,44)	Não informado	Não informado	Não informado	Não informado

Fonte: (Do autor, 2018).

*dados referentes ao período em jejum

Tabela 45 – Regime de administração, tempos de coleta, nome / lote do medicamento e observações

Estudo	Regime de administração	Tempos de coleta (h)	Nome / lote do medicamento testado	Observações
Presente trabalho (2017)	Jejum	0,00 (pré-dose), 0,08, 0,16, 0,25, 0,33, 0,5, 0,66, 0,83, 1,00, 1,25, 1,50, 1,75, 2,00, 2,50, 3:00, 3,50, 4,00, 4,50, 5,00, 6,00, 8,00 e 10,00	Sovaldi (Sofosbuvir) / WPZB	-
Rezk, Basalious, Amin (2016)	Alimentado	0,00 (pré-dose), 0,25, 0,5, 0,75, 1,1,25, 1,5, 1,75, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 8 e 10	Sovaldi (Sofosbuvir) / S14SB026UAD	-
Rezk et al, (2016)	Jejum e alimentado	0,00 (pré-dose), 0,17,0,33, 0,5, 0,75, 1, 1,25,1,5, 1,75, 2, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 8, 10, 12, 24, 48 e 72	Harvoni (Sofosbuvir + Ledipasvir)/ 14SFC013UD	Coletas até 72 horas (quantificação de ledipasvir) Administração concomitante de sofosbuvir e ledipasvir,
Abdallah, Ab,del-Megied, Gouda (2017)	Jejum	0,00 (pré-dose), 0,08, 0,17, 0,33, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72, 96 e 144	Harvoni (Sofosbuvir + Ledipasvir)/ Não informado	Coletas até 144 horas (quantificação de ledipasvir e GS-331007) Administração concomitante de sofosbuvir e ledipasvir, Apenas voluntários homens,
Rezk, Basalious Karim (2015)	Jejum	0,0 (pré-dose), 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 8, 10, 12, 24, 48 e 72	Sovaldi (Sofosbuvir) / PMPW	Coletas até 72 horas, (quantificação de GS-331007)
Bahrami et al (2016)	Jejum	0,0 (pré-dose), 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 5, 6 e 8	Sovaldi (Sofosbuvir)/ Não informado	-
Miraghaei et al (2017)	Jejum	0,00 (pré-dose), 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 5, 6 e 8	Sovaldi (Sofosbuvir) / Não informado	75 % voluntários são homens,
KIRBY et al, (2015)	Não informado	Não informado	Sovaldi (Sofosbuvir)/ Não informado	Dados obtidos de estudos de fase I
LI et al, (2018)	Jejum	0,00 (pré-dose), 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 4,5, 5, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 72 e 96	Sovaldi (Sofosbuvir) / Não informado	Coletas até 96 horas (quantificação de GS-331007 e GS-566500)

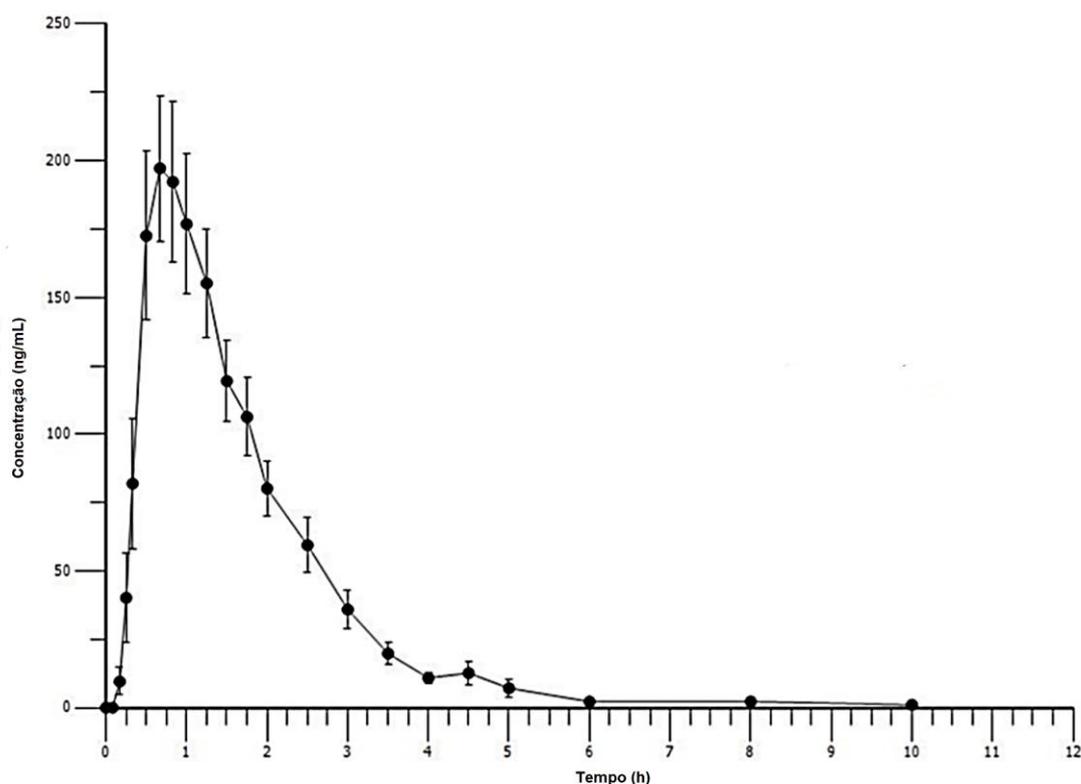
Fonte: (Do autor, 2018).

Nota: Alguns estudos prolongaram o tempo de coleta das amostras até 72, 96 e 144 h, conforme os objetivos dos autores.

De posse dos resultados obtidos em cada tempo de coleta, calculou-se uma média e construiu-se a curva de concentração plasmática de sofosbuvir em função do tempo (perfil farmacocinético), para o grupo dos 69 voluntários avaliados, conforme Figura 52.

Os participantes dessa pesquisa foram classificados conforme a cor da pele, segundo autodeclaração, como preta (2,9 %), parda (34,8 %) e branca (62,3 %). Em relação ao sexo, houve a participação de 49,3 % de indivíduos do sexo masculino e 50,7 % do sexo feminino.

Figura 52 - Curva de concentração plasmática média de sofosbuvir em função do tempo após administração oral de 400 mg de sofosbuvir



Fonte: (Do autor, 2017).

Os estudos desenvolvidos por Rezk et al (2016) e Abdallah, Ab,del Megied e Gouda (2017) não foram considerados para efeito comparativo, uma vez que nesses estudos foram administrados sofosbuvir e ledipasvir simultaneamente. Segundo Gritsenko e Hughes (2015), o ledipasvir, mas não o sofosbuvir, atua como um inibidor da P-gp e da BCRP intestinais o que pode gerar um aumento na concentração plasmática do sofosbuvir. Já o estudo de Rezk, Basalious e Amin (2016) também não foi considerado para efeito comparativo, pois o regime de administração do

medicamento foi diferente do presente trabalho, uma vez que sua administração foi concomitante a uma refeição calórica contendo alta concentração de lipídeos. De acordo com os autores desse estudo, uma refeição lipídica é capaz de promover maior absorção e, portanto, pode gerar maior exposição ao sofosbuvir.

Os estudos elegíveis para efeito comparativo, elencados na Tabela 46, sugerem que houve uma maior exposição ao sofosbuvir para os voluntários egípcios, iranianos, suíços e chineses, evidenciada pelo incremento de até 482 % da $ASC_{0-\infty}$. Além disso, a redução do T_{max} associada ao aumento no C_{max} , revelam que os voluntários estrangeiros apresentam maior velocidade de absorção do medicamento quando comparados aos brasileiros. Portanto, os dados são indicativos de que os voluntários estrangeiros apresentaram maiores exposição e velocidade de absorção do sofosbuvir.

Já em relação ao tempo de meia vida de eliminação, os estudos podem ser divididos em dois grupos: grupo I (voluntários egípcios e iranianos), em que houve um aumento no $T_{1/2\beta}$ e grupo II (voluntários suíços e chineses), em que houve uma redução do $T_{1/2\beta}$. Nos indivíduos do primeiro grupo, uma vez que o $T_{1/2\beta}$ é maior do que dos brasileiros, pode-se inferir que apresentam uma menor capacidade de eliminação do fármaco. Sendo assim, esse grupo exibiu os maiores incrementos no C_{max} (até 400 %). Já para o grupo II, em que o $T_{1/2\beta}$ é menor do que dos brasileiros, a capacidade de eliminação do fármaco é maior, o que foi responsável por incrementos mais discretos no C_{max} quando comparados aos voluntários do grupo I. Um raciocínio similar pode ser aplicado à K_e , que é inversamente proporcional ao tempo de meia vida de eliminação ($K_e = 0,693 / T_{1/2\beta}$).

Contrariando os resultados do presente estudo, Kirby e colaboradores (2015) afirmaram que os parâmetros farmacocinéticos do sofosbuvir são indiferentes quanto à raça, sexo e idade por meio de uma avaliação usando um modelo farmacocinético populacional. Entretanto, existem diferenças conhecidas inter-racial/étnicas na resposta dos fármacos para o tratamento de HCV. Nos Estados Unidos, por exemplo, há uma grande disparidade na prevalência do vírus HCV e a mortalidade por HCV, entre as diferentes raças. Além disso, os indivíduos com ancestralidade africana são pouco responsivos ao tratamento padrão para a hepatite C, exibindo uma baixa resposta virológica sustentada (RVS) e maior incidência de recidiva quando comparados ao europeu ou asiático (RAMAMOORTHY *et al.*, 2015).

Embora as causas das diferenças nas respostas ao tratamento entre diferentes raças sejam desconhecidas, existem diversos fatores que desempenham um importante papel: a fisiopatologia, a farmacogenética, a genética viral e a presença de comorbidades. O polimorfismo de um gene (rs12979860) próximo ao gene da interleucina 28B (IL28B) é um exemplo conhecido de importante fator farmacogenético envolvido nas diferenças nas respostas ao tratamento para a hepatite C. A frequência do alelo C, o qual é associado a maior RVS, é mais baixa nos indivíduos africanos quando comparada aos europeus e asiáticos. Porém, não está prevista uma prescrição diferenciada do tratamento conforme o grupo racial/étnico. Assim, é de fundamental importância que os ensaios clínicos sejam realizados com diferentes grupos a fim de se avaliar a exposição e resposta ao fármaco, garantindo a segurança e eficácia de um tratamento quando utilizado por uma população (RAMAMOORTHY *et al.*, 2015).

Tabela 46 - Diferença, em percentual, entre os parâmetros farmacocinéticos de estudos da literatura e o presente estudo (considerado o referencial)

Parâmetros	Rezk, Basalious Karim (2015)	Bahrami et al (2016)	Miraghaei et al (2017)	Kirby et al (2015)	LI et al (2018)
C_{max} (ng/mL)	+400	+245	+265	+67	+169
ASC_{0-t} hr*(ng/mL)	+484	+314	+241	Não informado	Não informado
$ASC_{0-\infty}$ hr*(ng/mL)	+482	+315	+302	+76	+141
T_{max} (h)	-56	-24	-27	Não informado	-70
$T_{1/2\beta}$ (h)	+6	+82	+100	-22	-25
K_e (1/h)	-10	Não informado	Não informado	Não informado	Não informado
Local de realização do estudo	Egito	Iran	Iran	Suíça	China
Grupo	Grupo I			Grupo II	

Fonte: (Do autor, 2018).

5 CONCLUSÃO

Os objetivos do presente estudo foram atingidos posto que foi possível desenvolver e validar uma metodologia bioanalítica para a quantificação de sofosbuvir em plasma humano conforme determinações da legislação vigente. Uma vez validada, a metodologia foi aplicada na análise das amostras do ensaio clínico cujo resultado permitiu conhecer os parâmetros farmacocinéticos do sofosbuvir na população brasileira.

Existem medicamentos que são etnicamente sensíveis, ou seja, a resposta e/ou exposição ao fármaco apresentam diferenças conforme a etnia. A rosuvastatina, por exemplo, apresenta maior exposição em asiáticos quando comparada ao europeu. Assim, o tratamento dos asiáticos e seus descendentes deve ser realizado com doses iniciais mais baixas, conforme informação expressa na bula do medicamento. No que diz respeito à hepatite C, os indivíduos com ancestralidade africana apresentam uma menor responsividade ao tratamento, o que é revelado pela menor resposta virológica sustentada (RVS) e maior incidência de recidiva. As causas para essas diferenças não são completamente elucidadas, sendo o fator genético uma justificativa conhecida e documentada.

A partir dos resultados dessa pesquisa, sugere-se que os estrangeiros apresentam, em média, maiores exposição (evidenciada pela maior ASC) e velocidade de absorção do sofosbuvir (evidenciada pelo menor T_{max} e maior C_{max}). Considerando a enorme importância desse fármaco no tratamento da hepatite C, é primordial a execução de estudos que ampliem o conhecimento sobre o mesmo, visto que os dados apresentados sugerem uma significativa disparidade entre os brasileiros e as outras etnias. Portanto, é de fundamental importância que as agências regulatórias apreciem com bastante cautela os casos em que diferenças étnicas possam levar a alterações farmacocinéticas e/ou terapêuticas.

No Brasil, a ANVISA permite a certificação de Centros de Bioequivalência internacionais, como na Europa, Estados Unidos, América Latina e Índia. Tal certificação, autoriza a realização de Estudos de Bioequivalência em outros países, com participantes de outras etnias. Porém, essas populações apresentam discordâncias alimentares e genéticas quando comparadas aos brasileiros, podendo expressar um perfil farmacocinético diverso do nosso. Assim, a ANVISA poderá, eventualmente, autorizar o uso de determinado medicamento no Brasil (genérico ou

similar) tendo como base os parâmetros farmacocinéticos de outras etnias. Como resultado, podem surgir casos de toxicidade não previstas ou até mesmo ausência de eficácia de determinado medicamento em brasileiros.

Dessa forma, é indispensável que o impacto das diferenças entre grupos raciais/étnicos seja conhecido, documentado e registrado a fim de prever o comportamento do fármaco nas populações em que for administrado e, portanto, garantir o tratamento seguro, eficaz e de qualidade, o que é vital nas práticas de Vigilância Sanitária. Além disso, os resultados obtidos ainda poderão ser de grande utilidade na realização de novas pesquisas envolvendo a molécula em estudo, considerando seu potencial uso no combate a diferentes vírus, entre eles o vírus da Zika, Dengue, Chikungunya e da Febre amarela.

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, O. M.; ABDEL-MEGIED, A. M.; GOUDA, A. S. Development a validated highly sensitive LC–MS/MS method for simultaneous quantification of Ledipasvir, sofosbuvir and its major metabolite GS-331007 in human plasma: Application to a human pharmacokinetic study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 143, p. 305–310, 2017.
- ALMEIDA, A. M.; CASTEL-BRANCO, M. M.; FALCÃO, A. C. Linear regression for calibration lines revisited: Weighting schemes for bioanalytical methods. **Journal of Chromatography B**, v. 774, n. 2, p. 215–222, 2002.
- ALVES, A. V. *et al.* Tratamento de pacientes com hepatite crônica pelo vírus C com Interferon- α e ribavirina: a experiência da Secretaria de Saúde do Rio Grande do Sul. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 40, n. 4, p. 227–232, 2003.
- ANVISA. Resolução nº 27 de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2012.
- ASSOCIAÇÃO EUROPEIA PARA O ESTUDO DO FÍGADO. Recomendações da Associação Européia para o Estudo do Fígado para o Tratamento da Hepatite C de 2015. **Journal of Hepatology**, v. 63, p. 199–236, 2015.
- BAHRAMI, M. T. *et al.* Quantification of sofosbuvir in human serum by liquid chromatography with negative ionization mass spectrometry using the parent peak and its source-induced fragment: Application to a bioequivalence study. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 14, p. 1–22, 2016.
- BARREIRO, E. J. L.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.
- BENOWITZ, N. L.; HUKKANEN, J.; JACOB III, P. Nicotine Chemistry, Metabolism, Kinetics and Biomarkers. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 192, n. 4, p. 29–60, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite C e coinfeções**: relatório de recomendações. Brasília, 2017a. p. 111.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 704, de 8 março de 2017. Define a lista de produtos estratégicos para o Sistema Único de Saúde (SUS), nos termos dos anexos a esta Portaria. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2017b.
- CASS, Q.; CASSIANO, N. **Cromatografia líquida: novas tendências e aplicações**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- CHERCHIGLIA, M. L. *et al.* Incidência de hepatite viral C em pacientes em hemodiálise no Brasil entre 2000 e 2003. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, n. 8 e00167914, p. 1–12, 2016.

COPPOLA, N. *et al.* Peg-interferon plus ribavirin with or without boceprevir or telaprevir for HCV genotype 1: A meta-analysis on the role of response predictors. **PLOS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1–11, 2014.

DELVAUX, N. *et al.* Comparison of four methods of genotyping IL28B polymorphisms in chronic hepatitis C patients. **Journal of Virological Methods**, v. 220, p. 1–4, 2015.

ECHEVERRIA, N. *et al.* Hepatitis C virus genetic variability and evolution. **World Journal of Hepatology**, v. 7, n. 6, p. 831–845, 2015.

FANALI, S. *et al.* **Liquid chromatography**: fundamentals and instrumentation. Amsterdam: Elsevier, 2013.

GERMAN, P. *et al.* Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Ledipasvir/Sofosbuvir, a Fixed-Dose Combination Tablet for the Treatment of Hepatitis C. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 55, n. 11, p. 1337–1351, 2016.

BRUNTON, Laurence L.; KNOLLMANN, Björn C.; CHABNER, Bruce A. **As Bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

GRITSENKO, D.; HUGHES, G. Ledipasvir/Sofosbuvir (harvoni): improving options for hepatitis C virus infection. **P & T**, v. 40, n. 4, p. 256–76, 2015.

HEPCENTRO. **Hepatite C**. Disponível em: http://www.hepcentro.com.br/hepatite_c.htm. Acesso em: 10 jan. 2019.

HOFFMANN, E. DE; STROOBANT, V. **Mass spectrometry**: principles and applications. 3. ed. Chichester: Wiley, 2007.

ISO. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. **ISO/IEC17025**, p. 38, 2017.

JIMÉNEZ-PÉREZ, M. *et al.* Treatment of chronic hepatitis C with direct-acting antivirals: The role of resistance. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 29, p. 6573–6581, 2016.

KHACHATOORIAN, R.; FRENCH, S. W. Chaperones in hepatitis C virus infection. **World Journal of Hepatology**, v. 8, n. 1, p. 9–35, 2016.

KHAN, M. M. **Immunopharmacology**. [S.l.: s.n.]. v. 14

KIRBY, B. J. *et al.* Pharmacokinetic, Pharmacodynamic, and Drug-Interaction Profile of the Hepatitis C Virus NS5B Polymerase Inhibitor Sofosbuvir. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 54, n. 7, p. 677–690, 2015.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35–61, 2009.

LANGFORD, R. A. *et al.* Comparative Plasma and Cerebrospinal Fluid Pharmacokinetics of Paracetamol after Intravenous and Oral Administration. **Anesthesia & Analgesia**, v. 123, n. 3, p. 610–615, 2016.

LI, X. *et al.* Pharmacokinetics, Safety, and Tolerability of the Direct-Acting Hepatitis C Antiviral Sofosbuvir in Healthy Chinese Subjects. **Clinical Therapeutics**, p. 1–11, 2018.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 4, 2012.

MIRAGHAEI, S. *et al.* Development and validation of a new HPLC-DAD method for quantification of sofosbuvir in human serum and its comparison with LC–MS/MS technique: Application to a bioequivalence study. **Journal of Chromatography B**, v. 1063, n. June, p. 118–122, 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global hepatitis report**. Genebra, 83 p., 2017.

PIERCE, B. A. **Genética**: um enfoque conceitual. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

RAMAMOORTHY, A. *et al.* Racial/ethnic differences in drug disposition and response: review of recently approved drugs. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 97, n. 3, p. 263–273, 2015.

REZK, M. R.; BASALIOUS, E. B.; KARIM, I. A. Development of a sensitive UPLC-ESI-MS/MS method for quantification of sofosbuvir and its metabolite, GS-331007, in human plasma: Application to a bioequivalence study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 114, p. 97–104, 2015.

REZK, M. R. *et al.* Quantification of sofosbuvir and ledipasvir in human plasma by UPLC-MS/MS method: Application to fasting and fed bioequivalence studies. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1028, p. 63–70, 2016.

REZK, M. R.; BASALIOUS, E. B.; AMIN, M. E. Novel and sensitive UPLC–MS/MS method for quantification of sofosbuvir in human plasma: application to a bioequivalence study. **Biomedical Chromatography**, v. 30, n. 9, p. 1354–1362, 2016.

SALAM, K. A.; AKIMITSU, N. Hepatitis C Virus NS3 Inhibitors: Current and Future Perspectives. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–9, 2013. ,

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE INFECTOLOGIA. Consenso SBH e SBI sobre tratamento da hepatite C. **The Brazilian journal of infectious diseases**, v. 20, n. 2 Suplemento 1, p. 1–13, 2016.

SOUZA, T. *et al.* The clinically approved antiviral drug sofosbuvir impairs Brazilian

zika virus replication. **Scientific reports**, v. 7, p. 1–11, 2017a.

SOUZA, T. *et al.* Sofosbuvir protects Zika virus-infected mice from mortality, preventing short- and long-term sequelae. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 9409, 2017b.

SOUZA, T. *et al.* Beyond members of the Flaviviridae family, sofosbuvir also inhibits chikungunya virus replication. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2019a.

SOUZA, T. *et al.* Yellow fever virus is susceptible to sofosbuvir both in vitro and in vivo. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 1, n. 13, p. 40, 2019b.

STAHMEYER, J. T. *et al.* Cost-effectiveness of treating hepatitis c with sofosbuvir/ledipasvir in Germany. **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–18, 2017.

SUAREZ-KURTZ, G. *et al.* Limited-sampling strategy models for estimating the pharmacokinetic parameters of 4-methylaminoantipyrine, an active metabolite of dipyron. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 11, p. 1475–1485, 2001.

SUMMERS, B. B.; BEAVERS, J. W. F.; KLIBANOV, O. M. Sofosbuvir, a novel nucleotide analogue inhibitor used for the treatment of hepatitis C virus. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 66, n. 12, p. 1653–1666, 2014.

TAN, S.-L. **Hepatitis C Viruses Genomes and Molecular Biology**. Norfolk: Taylor & Francis, 2006.

TENGAN, F. M. *et al.* Seroprevalence of hepatitis C virus among people living with HIV/AIDS in Latin America and the Caribbean: a systematic review. **BMC infectious diseases**, v. 16, n. 1, p. 1–8, 2016.

TZACHEV, C.; POPOV, T. Comparative bioavailability of metoclopramide hydrochloride at a dose of 10 mg, administered in tablet form orally, intravenously and through a nasal mucoadhesive spray. **J Clin Med.**, v. 3, n. 1, p. 31–38, 2010.

WAHAB, M. F.; PATEL, D. C.; ARMSTRONG, D. W. Peak shape and their measurements: the need and the concept behind total peak shape analysis. **LCGC North America**, v. 35, p. 846–853, 2017.

WEBSTER, D. P.; KLENERMAN, P.; DUSHEIKO, G. M. Hepatitis C. **Lancet**, v. 385, n. 9973, p. 1–25, 2016.

WHITE, J. R. *et al.* Pharmacokinetic analysis and comparison of caffeine administered rapidly or slowly in coffee chilled or hot versus chilled energy drink in healthy young adults. **Clinical Toxicology**, v. 54, n. 4, p. 308–312, 2016.

WISHART, D. S. *et al.* Drugbank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. **Nucleic Acids Res.**, v. 34, n. D668–72. 16381955, 2006.

XU, H.-T. *et al.* Evaluation of Sofosbuvir (β -D-2'-deoxy-2'- α -fluoro-2'- β -C-methyluridine) as an inhibitor of Dengue virus replication. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 6345, 2017.