



Concurso Público Fiocruz 2023

Tecnologista em Saúde Pública Prova Discursiva

TE32

Desenvolvimento de métodos analíticos para farmacocinética

Espelho de Resposta

Pontuação da Questão Discursiva conforme Anexo II do Edital nº 2, de acordo com a Unidade detentora da vaga.

Espera-se que o candidato, no desenvolvimento do tema, tenha feito considerações técnicas adequadas sobre os seguintes pontos:

- Qual o propósito e como se determina o log P? Como interpretar o valor de log P constante da tabela?

Propósito: O valor do coeficiente de partição (log P) é um parâmetro frequentemente usado em estudos de QSAR (Relação Quantitativa Estrutura-Atividade) como medida quantitativa da lipofilicidade de compostos bioativos. Ele reflete a afinidade de uma substância por fases orgânicas (como o octanol) em comparação com a fase aquosa (como a água).

Como determinar e Interpretar: O log P de uma molécula pode ser calculado somando as contribuições hidrofóbicas de cada fragmento ou átomo, juntamente com correções específicas. Para calcular o log P, considere as quantidades relativas de uma substância química que se dissolve em dois solventes diferentes: um “não polar” (como o octanol) e um polar (como a água). O cálculo de log P (coeficiente de partição) é igual a log da concentração do fármaco na fase orgânica (octanol) dividido pela concentração do fármaco na fase aquosa. O resultado de log P expressa a lipossolubilidade relativa da molécula. Quanto maior for log P mais lipofílico será o fármaco, e quanto menor o log P, o fármaco é mais hidrofílico. Todo fármaco precisa ter regiões hidrofílicas que viabilizem sua preparação e distribuição no corpo, mas também precisa de regiões lipofílicas para viabilizar o seu transporte através da membrana plasmática das células. Em geral espera-se que o log P de um fármaco fique entre 0 e 3, ou seja, que eles não sejam nem muito lipofílicos e nem muito hidrofílicos. Em alguns casos específicos esses valores são ultrapassados dependendo do tipo de fármaco que está sendo trabalhado. Um fármaco com log P abaixo de 1, tem boa solubilidade e baixa absorção, e acima de 3 tem baixa solubilidade e boa absorção. O valor de log P do SorA da tabela, 1,45, indica que a droga está dentro do intervalo ideal de equilíbrio entre regiões hidrofílicas e lipofílicas na molécula, o que contribui para uma compreensão melhor do comportamento farmacocinético.

Fonte: Tech Tip #56: Calculate reagent log P values to determine solubility characteristics. 2007. Thermo Scientific; M. Sargent (Ed.), Guide to achieving reliable quantitative LC-MS measurements, RSC Analytical Methods Committee, 2013. ISBN 978-0-948926-27-3.

- Descreva como efetuar um experimento para a determinação in vitro da ligação a proteínas plasmáticas.

As amostras devem ser preparadas e adicionadas ao plasma humano e de camundongo até uma concentração plasmática ideal para a droga. Em seguida alíquotas da amostra devem ser incubadas por 4 horas sob agitação (100 rpm) a 37°C em um dispositivo de diálise de equilíbrio com solução tampão fosfato-salino (PBS). Os experimentos devem ser realizados em replicatas para cada matriz.

Após a incubação, o plasma deve ser diluído em um volume igual de PBS e as amostras devem ser preparadas por uma técnica adequada, tal como a precipitação de proteínas pela adição de acetonitrila. Após centrifugação, os sobrenadantes devem ser analisados através de um método analítico apropriado, com base na cromatografia líquida com detector por espectrometria de massas (com analisador de massas do tipo triplo quadrupolo), para obter a fração não ligada à proteína da substância de teste (Fub). A fração não ligada deve ser calculada diretamente a partir das razões de área de picomedidas para cada fase, como segue:

% do Fármaco livre = $100 \times ((\text{área de pico do analito na fase tampão}) / (\text{área de pico do analito no plasma}))$.

Fonte: Brönstrup et al. Physiologically Based Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Model for the Treatment of Dengue Infections Applied to the Broad Spectrum Antiviral Soraphen. *AACS Pharmacol. Transl. Sci.* 2021, 4, 1499–1513.

c) Descreva os estudos necessários para a comprovação da estabilidade do analito em plasma humano. Considerando o emprego da cromatografia a líquido de ultra-eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM) no método para avaliação da estabilidade, explique qual tipo de cromatografia é mais adequada (fase reversa, normal ou cromatografia de interações hidrofílicas - HILIC) e qual a fonte de ionização deve ser empregada (ionização por eletrospray - ESI ou ionização química à pressão atmosférica - APCI) para a avaliação da estabilidade do Soraphen A (SorA) em plasma humano. Proponha ainda um protocolo de preparo de amostra de plasma para a análise por CLUE-EM. (5 pontos)

Estudos necessários para a comprovação da estabilidade do analito em plasma humano: Segundo a RDC Nº 27/2012, que dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos, a estabilidade do analito em matriz biológica deve ser demonstrada por meio dos seguintes estudos:

- I - estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento;
- II - estabilidade de curta duração;
- III- estabilidade de longa duração;
- IV- estabilidade pós-processamento.

As condições de realização dos estudos de estabilidade devem reproduzir as condições de armazenamento, preparo e análise das amostras em estudo. Esses estudos de estabilidade devem utilizar um conjunto de amostras de matriz biológica adicionadas de soluções do analito, padrão interno (PI) e o mesmo anticoagulante a ser usado nas amostras em estudo. Devem ser empregadas no mínimo 3 (três) amostras de controle de qualidade de baixa concentração (CQB) e controle de qualidade de alta concentração (CQA), as quais devem ser analisadas imediatamente após sua preparação e após serem submetidas às condições de ensaio aplicáveis. A concentração das amostras deve ser determinada por meio de uma curva de calibração recém preparada. A estabilidade é demonstrada quando não se observar desvio superior a 15% (quinze por cento) da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal. Todas as concentrações obtidas devem ser incluídas no cálculo da média.

Fonte: Anvisa. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 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. DOU nº 98, de 22 de maio de 2012

Tipo de cromatografia mais adequada para a avaliação da estabilidade do Soraphen A (SorA) em plasma humano: Considerando que o $\log P > 0$ para o analito ($\log P=1,45$ para o SorA) traduz a tendência dessa substância em se dissolver preferencialmente na fase hidrofóbica, expressando a lipofilicidade desta molécula, a cromatografia em fase reversa é a mais adequada. Fonte: BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos. 2. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2008

Qual a fonte de ionização deve ser empregada para a avaliação da estabilidade do Soraphen A (SorA) em plasma humano:

Considerando o peso molecular (520,63 g/mol) e a presença de grupamentos ionizáveis na molécula, expressos com valores de pK_a de 10,60 e 11,43, a fonte de ionização recomendada é a ESI, uma vez que a APCI é mais adequada para a análise de compostos de pouca ou intermediária polaridade.

Fonte: COVEY, T. R.; THOMSON, B. A.; SCHNEIDER, B. B. Atmospheric Pressure Ion Sources. *Mass Spec. Rev.*, v. 28, p. 870–897, 2009

Protocolo de preparo de amostra de plasma para a análise por CLUE-EM: Para o preparo de amostra de plasma, uma matriz rica em proteína, a precipitação com acetonitrila seguida de centrifugação, com a utilização do sobrenadante, pode ser empregada, uma vez que a molécula estará principalmente na

forma não-dissociada em pH neutro. É sabido que os valores de pH nos quais as microespécies das substâncias se mantêm **não ionizadas** são preferíveis para extração com acetonitrila, solvente orgânico. Fonte: CLARK, K. D.; ZHANG, C.; ANDERSON, J. L. Sample Preparation for Bioanalytical and Pharmaceutical Analysis. *Anal. Chem.* 2016, 88, 11262-11270; Brönstrup et al. Physiologically Based Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Model for the Treatment of Dengue Infections Applied to the Broad Spectrum Antiviral Soraphen. *AACS Pharmacol. Transl. Sci.* 2021, 4, 1499-1513

d) Qual a importância da caracterização dos metabólitos em estudos de farmacocinética de moléculas candidatas a fármaco? Qual tipo de instrumento de espectrometria de massas deveria ser empregado (baixa ou alta resolução) considerando metabolômica não direcionada? Justifique.

Qual a importância da caracterização dos metabólitos em estudos de farmacocinética de moléculas candidatas a fármaco?: Caracterizar os metabólitos de fármacos é importante para a compreensão da eliminação de fármacos, impedindo que estes compostos permaneçam por um tempo prolongado no nosso organismo. As enzimas metabolizadoras convertem os fármacos em compostos hidrofílicos que podem ser eliminados mais facilmente por meio da excreção pelos compartimentos aquosos dos tecidos. Desse modo, o metabolismo de fármaco desempenha um papel importante na atenuação da sua atividade biológica e farmacológica. Em geral, as reações de biotransformação geram metabólitos inativos mais polares, facilmente excretados pelo organismo. Entretanto, em alguns casos, o organismo produz metabólitos com atividade biológica potente ou propriedades tóxicas. O conhecimento dos metabólitos ativos é relevante tanto para a resposta terapêutica quanto para o efeito tóxico. Embora o metabolismo dos fármacos facilite a eliminação das substâncias químicas do organismo, paradoxalmente esse metabolismo pode converter alguns compostos em metabólitos tóxicos ou carcinogênicos altamente reativos. Informações qualitativas sobre a estrutura química dos metabólitos indicam os sítios de instabilidade metabólica que são usados para planejar modificações estruturais a fim de melhorar a estabilidade metabólica.

Fonte: - Goodman & Gilman's, Brunton, Laurence L., Hilal-Dandan, Randa and Knollmann, Björn C., editors. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 13. ed. Editora McGraw-Hill, Artmed, 2019.

- Kerns, E.H.; Di., L. Drug-like properties: concepts, structure design and methods from ADME to toxicity optimization., 2^aed., 2016.

Qual tipo de instrumento de espectrometria de massas deveria ser empregado (baixa ou alta resolução), considerando metabolômica não direcionada? Justifique: Na metabolômica baseada em espectrometria de massas, analisadores de massas de alta resolução, como Orbitrap™ e tempo de voo (TOF), são frequentemente adotados em metabolômica não-alvo por sua excelente exatidão de massas, enquanto analisadores de massas de baixa resolução, como triplo quadruplo, são geralmente preferidos em metabolômica direcionada por sua alta sensibilidade. Um instrumento de espectrometria de massas de baixa resolução pode não possibilitar a distinção de interferentes isobáricos de substâncias estruturalmente relacionadas ou metabólitos.

Fonte: Pang, H.; Hu, Z. Metabolomics in drug research and development: The recent advances in technologies and applications. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, v. 13, n. 8, August 2023, Pages 3238-3251.