

# Biofarmacotécnica



## **Planejamento de Estudos de Biodisponibilidade Relativa e Bioequivalência de Medicamentos**

# Introdução



- ⇒ **RES 60/14**: Dispõe sobre os critérios para concessão e renovação de registro de medicamentos novos, genéricos e similares
- ⇒ **RES 1170/06**: Guia para Provas de Biodisponibilidade Relativa / Bioequivalência de Medicamentos
- ⇒ **RES 898/03**: Guia para Planejamento e Realização da Etapa Estatística de Estudos de Biodisponibilidade Relativa / Bioequivalência
- ⇒ **RES 899/03 / RDC 27/12**: Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos
- ⇒ **RES 466/12**: Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos

**Importante**  
**Obter e ler estas resoluções!!!**

# Introdução

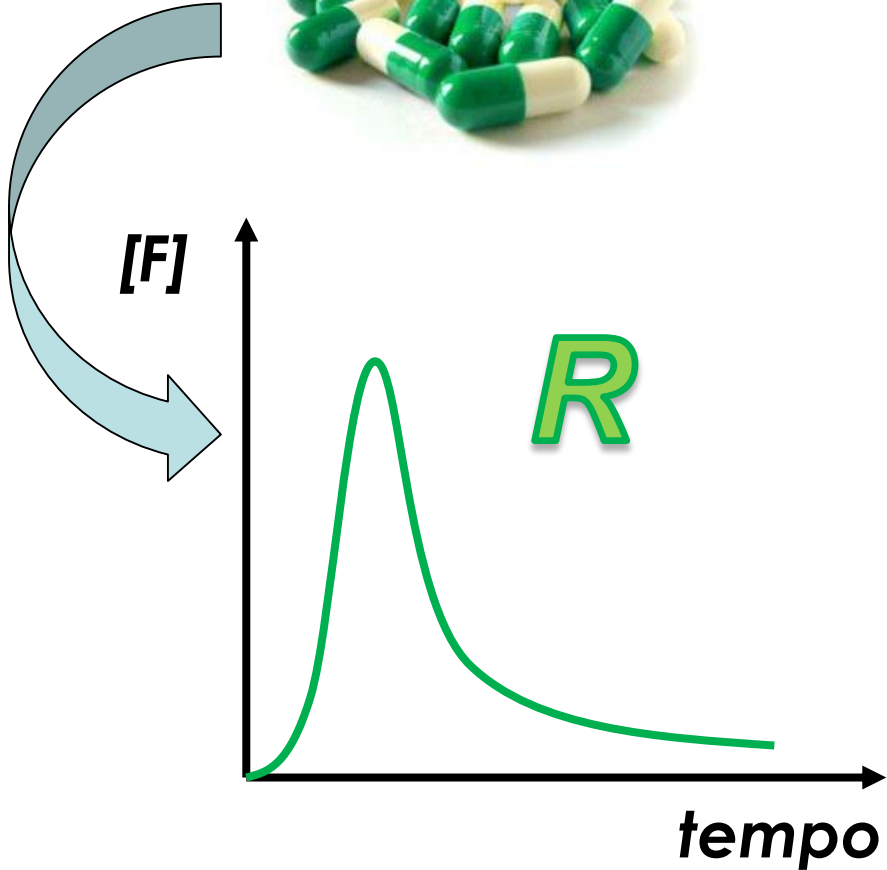
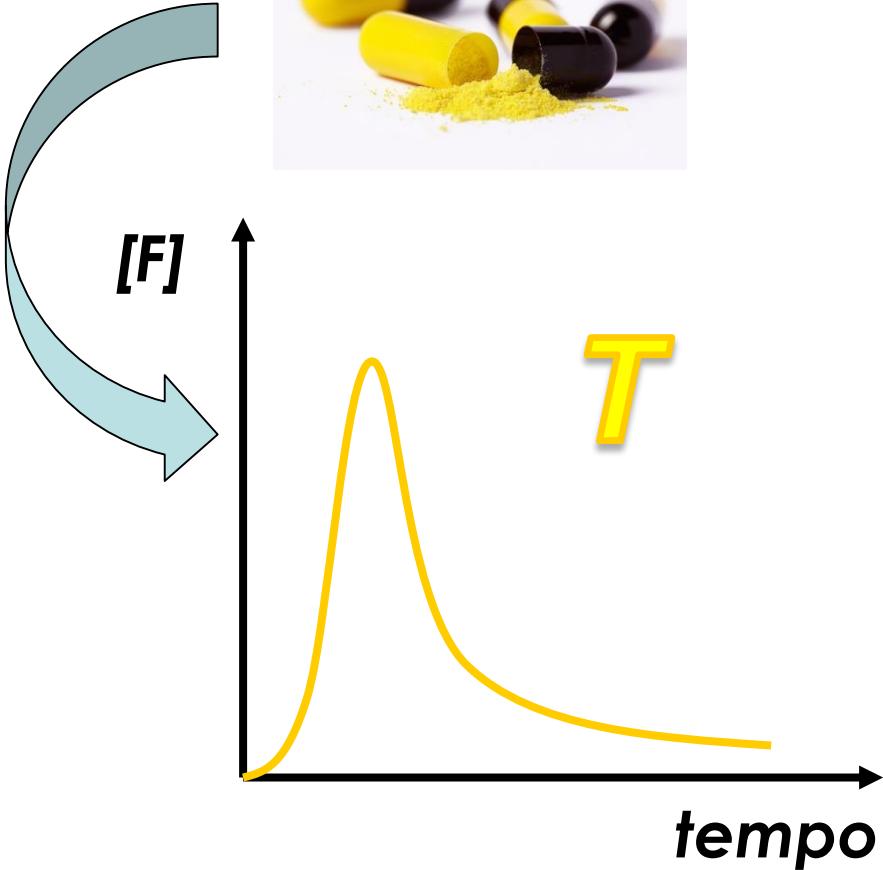


Considerações iniciais ao planejar ensaio de bioequivalência:

1. O que deve ser estudado, ou qual é o objetivo de ensaio?
2. Como os dados serão obtidos, ou qual será o desenho empregado?
3. Como os dados serão analisados, ou que métodos estatísticos serão utilizados?



# Objetivo do ensaio





# Desenho do ensaio

- ⇒ Métodos para comprovar BD e BE em ordem de preferência, segundo FDA (Guidance for Industry - Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products, General Considerations - 2003) e Anvisa (RE 1170/06):
  - ⇒ estudos farmacocinéticos;
  - ⇒ estudos farmacodinâmicos;
  - ⇒ estudos clínicos;
  - ⇒ estudos *in vitro*;

# Desenho do ensaio



- ⇒ dose única x dose múltipla;
- ⇒ paralelo x cruzado;
- ⇒ randomização;
- ⇒ substância a ser quantificada;
- ⇒ tamanho da amostra;
- ⇒ seleção de voluntários;
- ⇒ padronização do ensaio;
- ⇒ coleta de amostras.

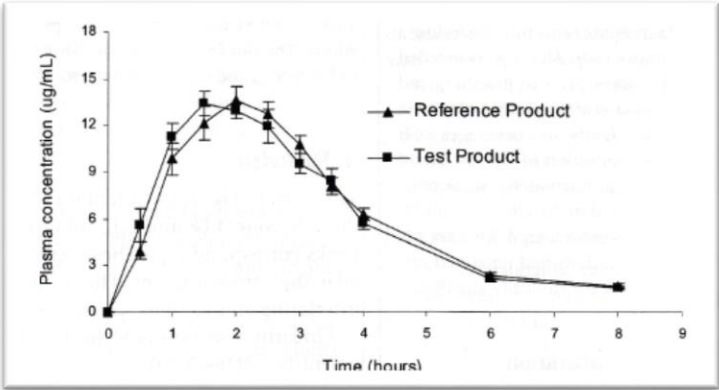
# Aspectos éticos



A pesquisa ética deve garantir:

- ⇒ autonomia (consentimento livre e esclarecido);
- ⇒ beneficência (ponderação entre riscos e benefícios);
- ⇒ não maleficência (prevenção da ocorrência de danos previsíveis);
- ⇒ relevância social (justiça);
- ⇒ mérito científico;
- ⇒ análise independente.

# Método bioanalítico



**método analítico  
validado**



# Método bioanalítico



Técnicas de quantificação de fármacos em amostras biológicas:

- ⇒ cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, HPLC – *high performance liquid chromatography*);
- ⇒ cromatografia gasosa (GC – *gas chromatography*);
- ⇒ imunoenaios (radioimunoensaio, enzimaensaio).

# Método bioanalítico



- ⇒ Tipos de amostras:
  - ⇒ sangue;
  - ⇒ plasma;
  - ⇒ soro;
  - ⇒ urina;
  - ⇒ saliva;
  - ⇒ ...

# Amostras biológicas



- ⇒ Pontos críticos no processo de encaminhamento das amostras biológicas:
  - ⇒ identificação (estudo, sujeito, fase, data e horário da coleta);
  - ⇒ temperatura durante o transporte;
  - ⇒ avaliação das condições das amostras no recebimento;
  - ⇒ armazenamento no laboratório analítico.

# Amostras biológicas



- ⇒ Pré-tratamento:
  - ⇒ precipitação por proteínas;
  - ⇒ extração líquido-líquido;
  - ⇒ extração por fase sólida.

# Desenvolvimento de métodos

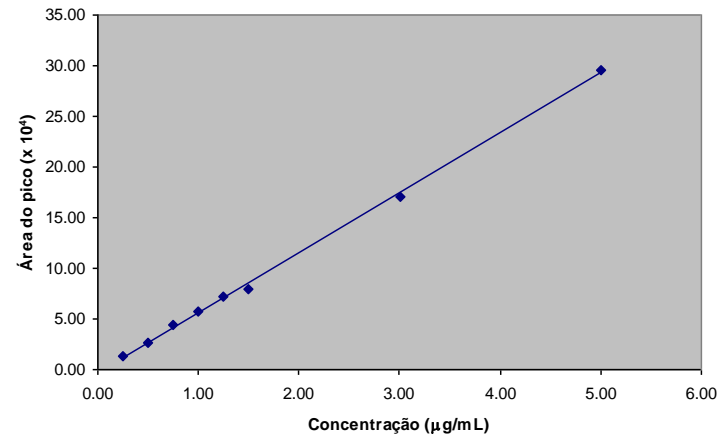


- ⇒ Parâmetro importantes:
  - ⇒ faixa de linearidade e limite de quantificação;
  - ⇒ complexidade do processo de pré-tratamento;
  - ⇒ tempo de análise;
  - ⇒ disponibilidade de padrão interno;
  - ⇒ toxicidade dos solventes e demais reagentes.



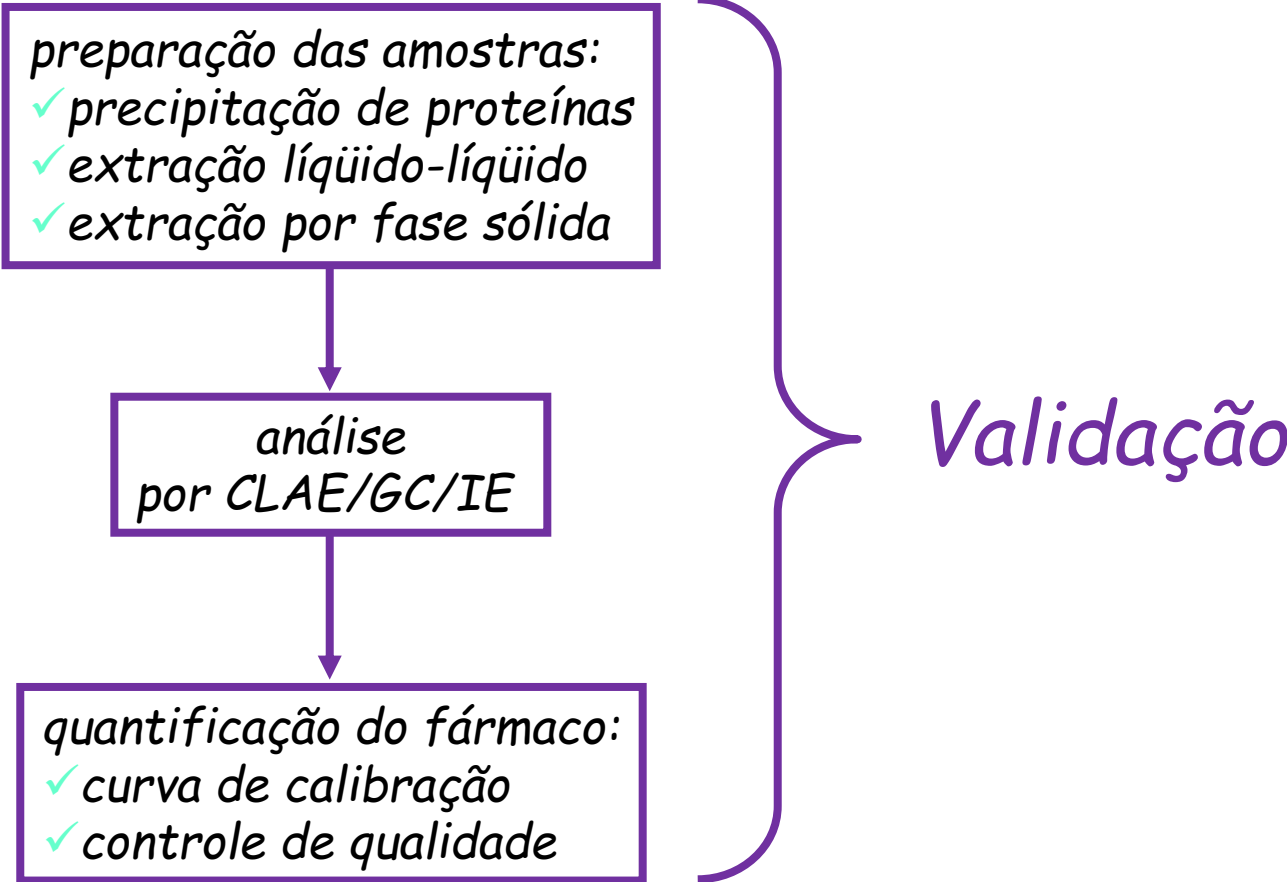
# Quantificação do Fármaco

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





# Etapa Analítica - Resumo





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

Abrange os seguintes parâmetros:

- ⇒ **seletividade;**
- ⇒ **precisão;**
- ⇒ **exatidão;**
- ⇒ limites de detecção e quantificação;
- ⇒ **curva de calibração;**
- ⇒ **estabilidade;**
- ⇒ recuperação;
- ⇒ **efeito residual;**
- ⇒ **efeito matriz;**
- ⇒ robustez.



# Seletividade



Capacidade do método de diferenciar e quantificar os analitos de interesse (fármaco e PI) na presença de outros componentes da amostra.

São investigados pela análise de amostras de plasma branco (quatro amostras normais, uma lipêmica, uma hemolisada) para verificação da existência de interferência por parte de componentes endógenos.

- ⇒ 5% para PI
- ⇒ 20% LIQ para analito

# Precisão



A precisão de métodos bioanalíticos é uma medida de erro aleatório e é definida como concordância entre várias medidas da mesma amostra, sendo expressa como coeficiente de variação (C.V. %) dessas medidas:

- ⇒ precisão intracorrida: cinco replicatas
- ⇒ precisão intercorridas ( $\geq 3$ , dias distintos): cinco replicatas

Concentrações: LIQ, CQB, CQM, CQA, CQD.

Não deve ser superior a 15% (20% para LIQ).

# Exatidão



A exatidão de métodos bioanalíticos é uma medida de erro sistemático e é definida como concordância entre o valor determinado e o valor real:

- ⇒ exatidão intracorrida: cinco replicatas
- ⇒ exatidão intercorridas ( $\geq 3$ , dias distintos): cinco replicatas

Concentrações: LIQ, CQB, CQM, CQA, CQD.

Não deve ser superior a 15% (20% para LIQ).



# Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção e quantificação expressam a capacidade do método analítico em determinar pequenas concentrações de analito:

- ⇒ **limite de detecção**: representa a menor concentração que pode ser diferenciada do nível de ruído;
- ⇒ **limite de quantificação**: deve apresentar resposta , no mínimo, duas vezes maior que a do limite de detecção, e representa a menor concentração que pode ser determinada com exatidão e precisão aceitáveis (20%).

# Curva de Calibração



A curva de calibração indica a relação entre concentração de analito e resposta do método, representada, no caso da CLAE, pela razão de áreas dos picos cromatográficos de analito e PI.

É definida utilizando-se no mínimo seis concentrações de padrão em plasma e três repetições. Deve-se estabelecer correlação de preferência linear entre concentração, considerada variável independente (x) e área do pico, considerada variável dependente (y).

# Estabilidade



Dados sobre estabilidade são necessários para garantir que a concentração da substância não sofre alteração entre a coleta da amostra e o momento da análise.

- ⇒ longa duração;
- ⇒ curta duração
- ⇒ ciclos de congelamento e descongelamento;
- ⇒ pós-processamento;
- ⇒ soluções-padrão refrigeradas ou congeladas.

Concentrações: CQA e CQB

# Recuperação



A recuperação corresponde ao resultado obtido após análise de amostra de plasma branco acrescida de padrão, submetida a pré-tratamento, expresso como porcentagem do resultado obtido após análise de padrão puro, não submetido a pré-tratamento.

# Efeito residual



Aparecimento ou aumento do sinal do analito ou PI causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente. Devem ser realizadas, no mínimo, 3 (três) injeções da mesma amostra branco, sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma ou mais amostras processadas do LSQ.

- ⇒ 5% para PI
- ⇒ 20% LIQ para analito



# Efeito matriz



Efeito na resposta do analito ou PI causado por componentes da matriz biológica.

Devem ser analisadas amostras de matrizes biológicas processadas (para plasma: 4 normais, 2 lipêmicas, 2 hemolisadas), posteriormente adicionadas de analito e PI, e soluções, nas mesmas concentrações das amostras de CQB e CQA.

Fator de matriz normalizado (FMN):  $CV < 15\%$

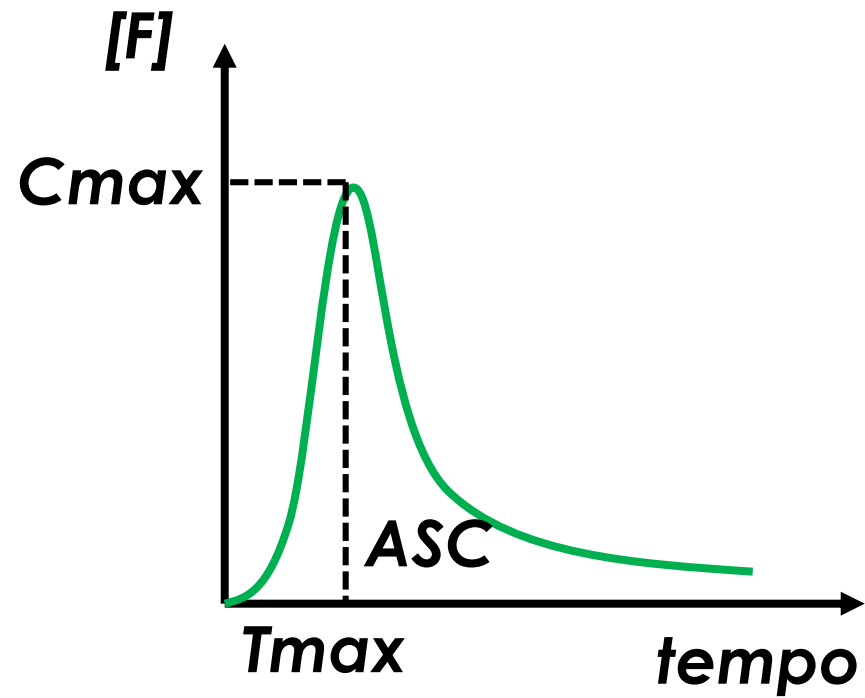
$$FMN = \frac{\frac{\text{pico analito matriz}}{\text{pico PI matriz}}}{\frac{\text{pico analito solução}}{\text{pico PI solução}}}$$



Avalia a suscetibilidade do método analítico a variações nas condições analíticas, tais como:

- ⇒ tempo de extração;
- ⇒ pH da fase móvel;
- ⇒ composição da fase móvel;
- ⇒ coluna;
- ⇒ temperatura;
- ⇒ fluxo.

# Parâmetros farmacocinéticos



# Análise estatística





- ⇒ análise multivariada (ANOVA) para  $C_{\max}$ ,  $t_{\max}$  e  $ASC_{0-t}$  nas escalas original e logarítmica, para avaliação dos efeitos de seqüência, período e produto
- ⇒ determinação do intervalo de confiança 90 % (I.C. 90 %) para as relações entre  $C_{\max}$  e  $ASC_{0-t}$  dos produtos teste e referência, na escala logarítmica

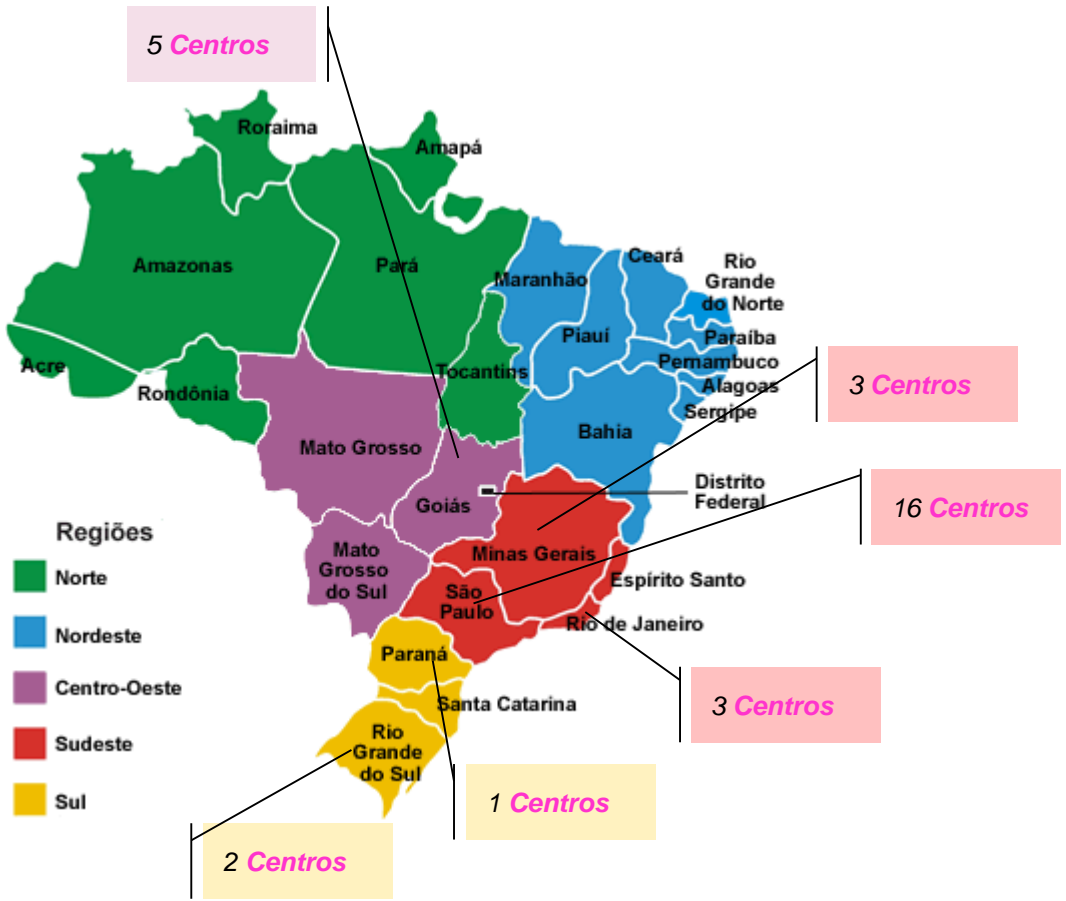


Dois produtos são considerados bioequivalentes se os intervalos de confiança 90 % para as relações entre os valores de  $C_{\max}$  e  $ASC_{0-t}$  de ambos, calculados com base nas transformações logarítmicas, estiverem entre 80 e 125 %.

$$80\% \leq \frac{C_{\max T}}{C_{\max R}} \leq 125\%$$
$$80\% \leq \frac{ASC_{0-tT}}{ASC_{0-tR}} \leq 125\%$$



# Centros de equivalência farmacêutica (EQFAR)



**Total de Centros no Brasil:  
30 Centros**

**Total de Centros no exterior:  
1 Centro (EUA)**

**Fonte: Anvisa**  
(atualizado em 03/2017)

# Centros de bioequivalência



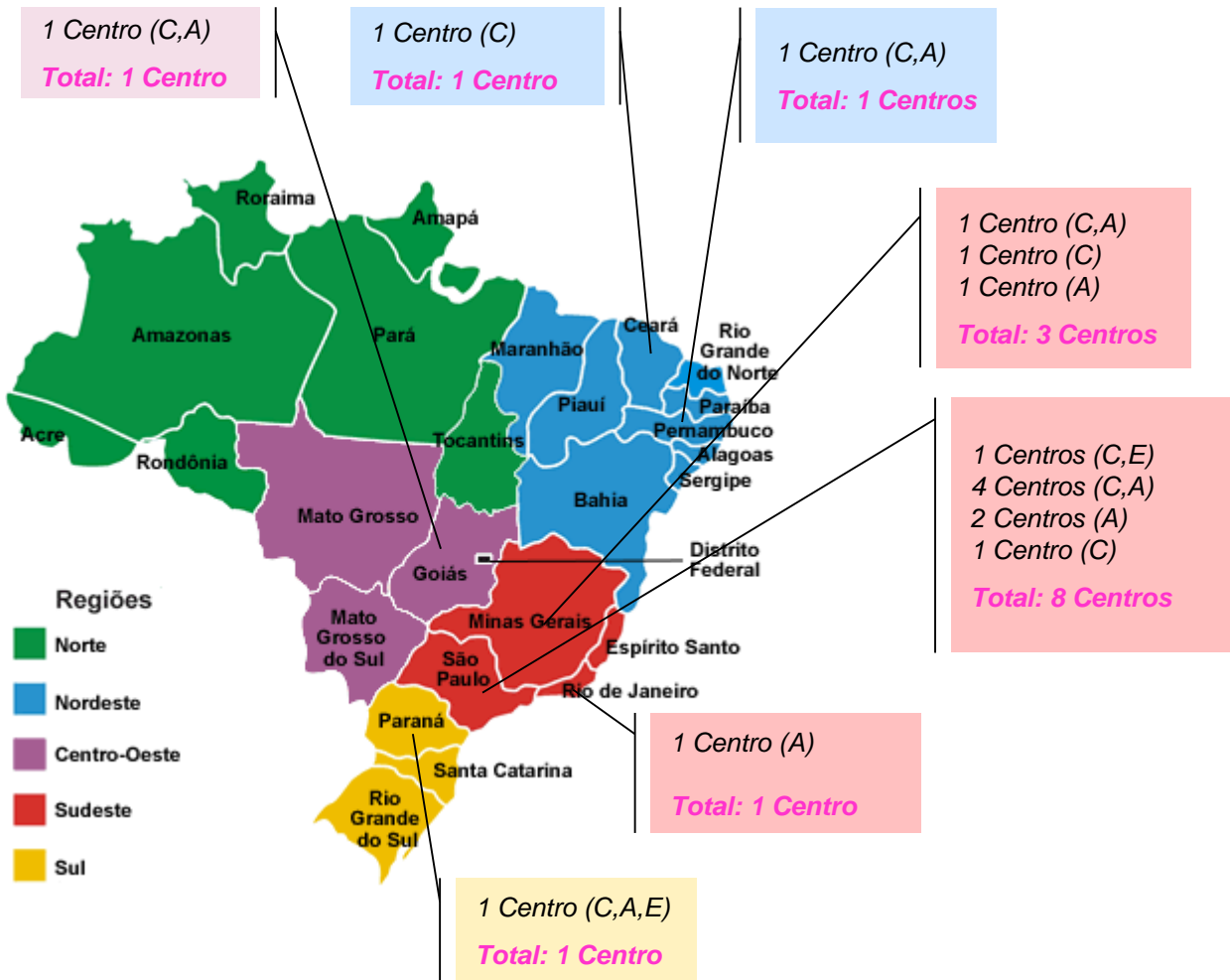
Ensaio de bioequivalência:

- etapa clínica;
- etapa analítica;
- etapa estatística.





# Centros de bioequivalência



**Total de Centros no Brasil:**  
**16 Centros**

**1 Etapa: 7 Centros**  
**2 Etapas: 8 Centros**  
**3 Etapas: 1 Centros**

**Clínica: 12 Centros**  
**Analítica: 12 Centros**  
**Estatística: 2 Centros**

**Total de Centros Inter-nacionais:**  
**35 Centros**

**Fonte: Anvisa**  
*(atualizado em 03/2017)*