

Manual de Boas Práticas em Biodisponibilidade Bioequivalência



Volume I

Módulo 1: Etapa Clínica
Módulo 2: Etapa Analítica
Módulo 3: Etapa Estatística



**Agência Nacional
de Vigilância Sanitária**



Gerente-Geral de Inspeção e Controle de Medicamentos e Produtos
Antônio Carlos da Costa Bezerra

Coordenação de Inspeção em Centros de Bioequivalência
Cláudia Franklin de Oliveira

E-mail: bioequivalencia@anvisa.gov.br

Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Manual de Boas Práticas em Biodisponibilidade Bioequivalência

Volume I

Brasília
2002

Direitos reservados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária
SEPN 515, Edifício Ômega, Bloco B, Brasília (DF), CEP 70770-502.
Internet: www.anvisa.gov.br

Copyright © 2002. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
Permitida a reprodução total ou parcial desta obra, desde que citada a fonte.

1ª edição - 2002

ISBN: 85-88233-07-X

Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Realização: Coordenação de Inspeção em Centros de Bioequivalência - Gerência-Geral de Inspeção e Controle de Medicamentos e Produtos

Coordenação Geral: Cláudia Franklin de Oliveira / Coordenação de Inspeção em Centros de Bioequivalência

Revisão: Karla de Araújo Ferreira / Coordenação de Inspeção em Centros de Bioequivalência

Divulgação: Unidade de Divulgação

Capas: João Carlos de Souza Machado / Gerência de Comunicação Multimídia

Diagramação, composição e impressão: Dupligráfica Editora Ltda./DF

Impresso no Brasil

Manual de boas práticas em biodisponibilidade: bioequivalência/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência-Geral de Inspeção e Controle de Medicamentos e Produtos. Brasília: ANVISA, 2002.

2 v.

QV38

1. Equivalência terapêutica. 2. Bioequivalência. 3. Disponibilidade biológica. 4. Medicamentos. I. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência-Geral de Inspeção e Controle de Medicamentos e Produtos.

Atualmente se acham em execução no Brasil inúmeros estudos clínicos com o objetivo de avaliar a Biodisponibilidade/Bioequivalência de produtos farmacêuticos. A partir de junho de 2001, a Anvisa, por meio da Coordenação de Inspeção em Centros de Bioequivalência – ligada à Gerência-geral de Inspeção e Controle de Medicamentos e Produtos – passou a avaliar estes centros em inspeções periódicas, a fim de garantir a qualidade dos estudos.

No decorrer das atividades de inspeção, que a princípio tinham caráter orientativo, a Coordenação observou a necessidade de esclarecer alguns pontos que restavam como dúvidas técnicas para os centros, em especial a relativa à padronização de métodos analíticos, análise estatística dos estudos, armazenamento de amostras biológicas, confinamento de voluntários e estudos de estabilidade de fármacos, entre outros.

A partir da identificação desta necessidade, e buscando prevenir o comprometimento da qualidade dos trabalhos realizados, surgiu a iniciativa da criação pela Coordenação de núcleos de discussão, com o objetivo de esgotar o esclarecimento de todos os aspectos relevantes à condução dos estudos e integração de suas fases. Esses núcleos contaram com a participação de 40 especialistas das áreas de Farmácia, Medicina, Estatística e Química.

É neste contexto que surge este “Manual de Boas Práticas em Biodisponibilidade/Bioequivalência”, composto por seis grandes tópicos apresentados de maneira didática, buscando transpor as dificuldades dos centros, e, por conseguinte, complementar as diretrizes já previstas na legislação sanitária brasileira para a realização dos estudos.

Os núcleos de trabalho iniciaram as discussões em setembro de 2001, cada um deles cuidando de uma das três etapas do processo – Clínica, Analítica e Estatística – sob a coordenação da Dra. Cláudia Franklin de Oliveira e inestimável colaboração da professora Sílvia Storpirts. Nos meses subseqüentes, foram realizadas diversas reuniões, de modo a promover debates técnicos e a alcançar consenso nas questões. Desta forma, cada grupo elaborou um conjunto de tópicos relevantes que devessem constar no manual. Posteriormente, todos foram objeto de cuidadosa pesquisa e os resultados relatados de modo a propiciar um bom entendimento por parte do público-alvo. O manual completo levou 11 meses para ser concluído. Este processo envolveu a participação, no total, de cerca de 50 profissionais de diversas áreas do conhecimento, entre pesquisadores de universidades públicas, técnicos da Anvisa e fabricantes de instrumentação laboratorial e equipamentos. A todos estes colaboradores a Anvisa registra sua gratidão pela contribuição impar a um trabalho tão singular.

A estrutura final consta de dois volumes e cada qual possui três módulos. O primeiro volume traz detalhadas tecnicamente cada uma das etapas dos estudos de Biodisponibilidade/Bioequivalência na seqüência natural de sua condução: Módulo 1: Etapa Clínica, Módulo 2: Etapa Analítica e Módulo 3: Etapa Estatística. O segundo volume abrange aspectos importantes no que diz respeito à instrumentação laboratorial e equipamentos utilizados na execução da etapa analítica, considerados críticos no processo. Neste volume, o Módulo 1 refere-se à Fundamentos e Operação de Micropipetas, o Módulo 2 aborda a Água para Análises Químicas Instrumentais e o Módulo 3 possui conteúdo

relacionado à Espectrofotometria de Ultra Violeta Visível, Cromatografia em Fase Líquida (LC), Cromatografia em Fase Gasosa (GC), Sistemas de Cromatografia Acoplados a Detectores de Massa e Verificação de Desempenho de Instrumentos Analíticos.

É importante ressaltar o ineditismo, mesmo em nível internacional, da reunião de informações provenientes de diversas disciplinas em um único compêndio, buscando a sintetização de todos os aspectos que envolvem as Boas Práticas em Biodisponibilidade/Bioequivalência.

Claro fica que o objetivo maior deste trabalho é o de aperfeiçoar a qualidade dos ensaios de Biodisponibilidade/Bioequivalência realizados no Brasil, e, por conseguinte, contribuir em parte com a qualidade dos medicamentos genéricos disponíveis no mercado, por meio do fornecimento de subsídios técnicos amplamente estudados e minuciosamente elaborados. Neste sentido, esperamos contribuir para a capacitação dos Centros de Biodisponibilidade/Bioequivalência, além de promover a formação de monitores de estudos para a indústria farmacêutica nacional e ajudar a formar agentes multiplicadores de conhecimento nas universidades brasileiras.

A realização deste manual só foi possível graças ao importante trabalho de inúmeras pessoas e antecipadamente peço desculpas por eventual esquecimento de algum nome. Foram fundamentais os editores José Pedrazzoli Júnior (USF/Unifag) e João Antônio Saraiva Fittipaldi (Pfizer), e os colaboradores Fernanda Maria Villaça Boueri (Anvisa), Eliana Regina Marques Zlochevsky (Anvisa), Cláudia Simone Costa da Cunha (Ministério da Saúde) e Beatriz Helena Carvalho Tess (Ministério da Saúde), no módulo Etapa Clínica; os editores Cláudia Franklin de Oliveira (GGIMP/Anvisa), Rui Oliveira Macedo (UFPA), Flávio Leite (T&E Analítica) e Pedro Eduardo Froehlich (UFRGS), e os colaboradores Pedro de Lima Filho (GGMEG/SP), Davi Pereira de Santana (UFPE), Rafael Eliseo Barrientos Astigarraga (Cartesius), Silvana Calafatti de Castro (Unifag), Thaís Reis Machado, Jaime Oliveira Ilha (Cartesius), Itapuan Abimael Silva (Anvisa), Karen Noffs Brisolla (Anvisa), Marcelo Cláudio Pereira (Anvisa), no módulo Etapa Analítica; os editores Arminda Lucia Siqueira (UFMG), Chang Chiann (GGMEG/SP), Cicilia Yuko Wada (Unicamp), Karla de Araújo Ferreira (Anvisa) e Gilberto Bernasconi (USF/Unifag), e os colaboradores Reinaldo Charnet (Unicamp) e Renato Almeida Lopes (Anvisa), no módulo Etapa Estatística; os editores Melissa M. Silva (Nova Analítica) e Walter Pereira (Nova Analítica), Fundamentos e Operação de Micropipetas; o editor José Muradian Filho (Millipore), Água para Análises Clínicas; os editores Ivan Jonaitis (Agilent), Renato Garcia Peres (Flowscience), Ricardo Lira (Flowscience), Renato Gouveia, José Aparecido Soares (Varian), Josué D.M. Neto (Sync Brasil), Juarez Araújo Filho (Sync Brasil), Alexandre Rosolia (Waters), Adauto Silva (Varian) e Reinaldo Castanheira (Agilent), Instrumentação Analítica; e a equipe de coordenação formada por Cláudia Franklin de Oliveira (GGIMP/Anvisa), Marcelo Cláudio Pereira (GGIMP/Anvisa), Max Weber Marques Pereira (GGIMP/Anvisa), Karla de Araújo Ferreira (GGIMP/Anvisa), Karen Noffs Brisolla (GGIMP/Anvisa), Itapuan Abimael da Silva (GGIMP/Anvisa) e Renato Almeida Lopes (GGIMP/Anvisa).

Dr. Gonzalo Vecina Neto

Manual de Boas Práticas em Biodisponibilidade Bioequivalência



Volume I

**Módulo 1:
Etapa Clínica**

Volume I – Módulo 1 – Etapa Clínica

Editores:

- João Antônio Saraiva Fittipaldi – Pfizer
- José Pedrazzoli Júnior – UNIFAG – USF

Colaboradores:

- Beatriz Helena Carvalho Tess – Ministério da Saúde
- Cláudia Simone Costa da Cunha – Ministério da Saúde
- Eliana Regina Marques Zlochevsky – ANVISA
- Fernanda Maria Villaça Boueri – ANVISA
- Gilberto de Nucci – USP

Coordenação:

- Cláudia Franklin de Oliveira – ANVISA
- Itapuan Abimael da Silva – ANVISA
- Karen de Aquino Noffs Brisolla – ANVISA
- Karla de Araújo Ferreira – ANVISA
- Marcelo Cláudio Pereira – ANVISA
- Max Weber Marques Pereira – ANVISA
- Renato Almeida Lopes – ANVISA

Apoio Logístico:

- Daniela Salles de A. B. Corrêa – ANVISA
- Diva Sales Freitas – ANVISA

1. PESQUISA CLÍNICA	05
1.1. Histórico	05
1.2. Novos medicamentos	07
1.3. Biodisponibilidade/ Bioequivalência.....	08
1.4. Estudos clínicos	09
1.5. Aspectos de segurança	10
1.5.1. Eventos adversos	10
1.5.2. Eventos adversos sérios.....	11
1.5.3. Resultados de testes laboratoriais anormais.....	13
1.6. Das responsabilidades	14
1.6.1. Patrocinador	14
1.6.2. Investigador principal	15
2. ESTUDOS DE BIODISPONIBILIDADE/BIOEQUIVALÊNCIA DE MEDICAMENTOS – ETAPA CLÍNICA	16
2.1. Introdução	16
2.2. Instalações.....	16
2.3. Recrutamento e seleção dos voluntários	17
2.4. Internação e alta dos voluntários	17
2.5. Administração do medicamento e coleta de material biológico	18
2.6. Manuseio das amostras biológicas	19
2.7. Documentação	19
2.7.1. Protocolo de pesquisa.....	19
2.7.2. Protocolo clínico	19
2.7.3. Termo de consentimento livre e esclarecido	21
2.7.4. Ficha clínica	23
2.8. Das responsabilidades	24
2.8.1. Patrocinador	24
2.8.2. Investigador Principal	24
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1. PESQUISA CLÍNICA

1.1. Histórico

Quando se analisam os procedimentos necessários para a condução de pesquisas em seres humanos, muitas vezes se tem a falsa impressão de uma burocracia desnecessária e normas que apenas servem para retardar o processo de investigação científica.

Um breve conhecimento da origem destes regulamentos demonstra de maneira inequívoca a importância dos mesmos e a necessidade contínua de pesquisas no campo da bioética.

Até o ano de 1906 não havia qualquer regulamentação quanto à venda de medicamentos ou alimentos. Exibições que percorriam cada povoado promoviam e vendiam medicamentos maravilhosos, os quais careciam de qualquer comprovação científica quanto à sua eficácia e segurança.

Em 1906, Upton Sinclair publica o livro “The Jungle” no qual descreve de maneira realística as péssimas condições de higiene dos matadouros de Chigaco. Esta publicação levou a uma onda de indignação da população norte americana, cujos protestos chegaram ao Congresso, que aprova a lei conhecida como “Pure Food and Drug Act”. Esta lei cria o FDA (“Food and Drug Administration”), que seria a Agência responsável pela regulamentação da produção, transporte e venda de produtos medicinais e alimentares dentro dos Estados Unidos. Infelizmente neste primeiro momento, a Lei apenas exigia uma correta rotulação dos produtos, não fazendo qualquer referência às condições de eficácia e segurança destes.

Um novo avanço neste campo só voltou a acontecer em face de novo episódio ocorrido em 1937. Neste ano, a Sulfanilamida (Prontosil) conhecida desde 1932 e utilizada com sucesso, na forma de pastilhas, para o tratamento das infecções por estreptococos, foi lançada na forma de xarope, tendo o dietilenoglicol como solvente. Este xarope apesar de ter sido testado quanto a sua aparência, gosto e odor não teve qualquer teste de segurança realizado antes do lançamento. O produto provoca a morte de 105 pessoas (34 crianças e 71 adultos) e o dietilenoglicol é incriminado. Este acontecimento fez com que em 1938 o Congresso Americano aprovasse o “Food Drug and Cosmetic Act” no qual se estabelece que os fabricantes de produtos farmacêuticos deveriam apresentar provas científicas da segurança dos medicamentos antes de liberá-los para venda.

Com o final da Segunda Guerra Mundial, vieram à tona as atrocidades cometidas em nome da ciência, contra seres humanos, por médicos alemães. Dentre as inúmeras atrocidades cometidas, podemos destacar os experimentos de “vacinação contra o tifo”, na qual se infectava indivíduos sãos com a bactéria, as “esterilizações não cirúrgicas” em massa de mulheres judias através da injeção na cavidade uterina de soluções de formalina e as experiências de “hipotermia prolongada e despressurização”, para se avaliar as respostas do organismo a estas condições.

Como uma reação aos abusos cometidos em nome do conhecimento, o Código de Nüremberg foi elaborado em 1947, estabelecendo parâmetros a serem cumpridos de forma a se evitar as situações então evidenciadas. Este código foi o primeiro a introduzir o conceito de um consentimento por parte dos sujeitos da pesquisa. Infelizmente, foi necessário ainda mais um acontecimento de profundo pesar para que as normas de pesquisa recebessem um aprimoramento.

Em 1957 é introduzida no mercado a “Talidomida” indicada como sonífero. Esta droga havia sido administrada a aproximadamente 300 pacientes sem que houvesse qualquer relato de efeito tóxico. Em 1962, a Talidomida é retirada do mercado após denúncias de milhares de casos de focomelia. No mesmo ano a emenda Kefauver-Harris, com requerimentos de provas científicas de eficácia e segurança antes de testes em seres humanos foi aprovada.

Em 1964, a Associação Médica Mundial aprova em Helsinque um documento com princípios para proteção de indivíduos em pesquisa biomédica. São introduzidos conceitos de responsabilidades do investigador, comitês de ética e consentimento livre e esclarecido. Com revisões periódicas posteriores (1975, 1983, 1989 e 2000), a Declaração de Helsinki constitui-se, atualmente, no documento universal que rege os parâmetros para o desenvolvimento científico e tecnológico envolvendo seres humanos.

Em 1977, o FDA publica as primeiras diretrizes para pesquisas clínicas com o objetivo de garantir qualidade dos dados e proteger os participantes das mesmas. Entre 1977 e 1981, novas diretrizes sobre Boas Práticas Clínicas são publicadas. Em 1988, uma consolidação de um Código de Boas Práticas Clínicas (GCP) é publicada pelo FDA.

As Boas Práticas Clínicas também foram adotadas em outros países:

1985 - Japão e Canadá

1986 - Inglaterra

1991 - Austrália e Comunidade Européia

1995 - Publicação do código de Boas Práticas Clínicas (GCP) pela OMS.

Em 1996, a realização da Conferência Internacional de Harmonização (ICH) e posterior introdução das alterações propostas serviram de alicerce para que os estudos clínicos pudessem ser conduzidos de acordo com normas e regulamentos similares em diferentes países e em conformidade com elevados padrões éticos e científicos.

No Brasil, a implantação de normas definindo a pesquisa em seres humanos deu-se com a Resolução nº 01/88, através de iniciativa do Professor Elisaldo Carlini. Em outubro de 1996, esta foi revogada pela resolução nº 196/MS/CNS, sendo posteriormente complementada pela Resolução nº 251/97. Por meio destas Resoluções, o Ministério da Saúde define diretrizes e normas objetivando promover a proteção de sujeito de pesquisas envolvendo seres humanos.

A Resolução 196/96, baseada nos quatro referenciais básicos da bioética, autonomia, não maleficência, beneficência e justiça, traz à comunidade científica, bem como à sociedade brasileira, reflexões sobre os aspectos éticos da pesquisa envolvendo seres humanos e estabelece as diretrizes para a

implantação de um sistema de revisão ética em pesquisa, composto por Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), do Conselho Nacional de Saúde.

Assim, a Resolução 196/96, bem como as demais que a complementam, traz ao pesquisador as orientações para que o mesmo possa desenvolver, de forma ética, pesquisas envolvendo seres humanos.

Esta Resolução estabelece que todas as pesquisas desenvolvidas com seres humanos devem ser submetidas à apreciação de um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), credenciado pela CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa). A resolução também preconiza que todas as instituições que realizem pesquisas implantem um CEP, a fim de se promover em toda a rede o desenvolvimento científico e tecnológico fundamentados nos princípios de ética e do respeito à cidadania. Na impossibilidade de constituir um CEP, a instituição ou o pesquisador principal deverá submeter o projeto a apreciação do CEP de outra instituição, dentre os indicados pelo CONEP.

Considerando a importância dos estudos de biodisponibilidade/bioequivalência no contexto da estratégia da política de implantação de medicamentos genéricos no Brasil, os pesquisadores deverão estar atentos às diretrizes estabelecidas pelo Ministério da Saúde na área de ética em pesquisas.

1.2. Novos medicamentos

Quando estudos em animais sugerem que uma nova molécula pode ser útil, ou seja, é efetiva e segura quando correlacionada com seus efeitos, geralmente a mesma é indicada para estudos envolvendo seres humanos. Novas drogas são introduzidas na prática médica através de estudos de farmacologia clínica, nos quais um número crescente de pacientes ou voluntários sadios é avaliado, até que um volume adequado de informação tenha sido obtido e um estudo terapêutico formal possa ser justificado.

Assim, estudos envolvendo seres humanos podem ser classificados em:

- **terapêuticos:** nos quais os sujeitos da pesquisa podem apresentar um ganho direto.
- **não terapêuticos:** nos quais os sujeitos da pesquisa não se beneficiam dos resultados durante o desenrolar do protocolo.

Quando consideramos a existência de novo medicamento, podemos considerar 3 períodos de vida útil. O primeiro deles é anterior a sua aprovação para uso público, quando estudos pré-clínicos e clínicos são realizados, visando avaliar eficácia e segurança. O segundo centra-se no período de vigência de sua patente, na qual a exclusividade de comercialização ainda existe. O último período inicia-se após o término da patente, quando outras empresas podem comercializar o produto, seja como similar ou como medicamento genérico. Assim, várias companhias podem manufaturar e comercializar diferentes formulações de uma mesma substância ativa, apresentando qualidade e performance semelhantes, de tal forma que a intercambiabilidade entre as diferentes formulações, quando administradas em doses equivalentes, apresente as mesmas segurança e eficácia.

Bases científicas e tecnológicas possibilitam a produção regular e reprodutível de formulações com as mesmas características farmacêuticas, bem como fornecem a confirmação de segurança, eficácia e intercambiabilidade destas.

A confirmação de intercambiabilidade é dada através dos estudos de equivalência farmacêutica e/ou bioequivalência. Tanto do ponto de vista dos órgãos regulatórios quanto da indústria, estudos de biodisponibilidade/bioequivalência podem ser solicitados mesmo após a concessão do registro do medicamento.

1.3. Biodisponibilidade/Bioequivalência

Pode-se afirmar que a era de estudos de biodisponibilidade iniciou-se a partir de 1945, com a primeira publicação do conceito de disponibilidade biológica. O desenvolvimento, durante a década de 1960, de técnicas analíticas possibilitou o desenvolvimento de métodos sensíveis o suficiente para permitir a quantificação de drogas ou metabólitos, inicialmente na urina, e posteriormente no plasma, o que possibilitou a avaliação e comparação da biodisponibilidade de diferentes formulações em voluntários, bem como a demonstração de que diferenças significativas entre estas podem ocorrer.

Após a legislação de registro compulsório de medicamentos em 1969, que facilitou a entrada de medicamentos genéricos no mercado canadense, o “Drugs Directorate” do “Canadian Federal Department of Health and Welfare” começou a utilizar bioequivalência como uma medida para aprovar o registro de um medicamento durante a década de 1970. Este programa, juntamente com outras informações, foi analisado pelo FDA, órgão a editar as primeiras diretrizes para a realização de estudos de bioequivalência em 1977. A aplicação destas diretrizes foi ampliada no “Drug Price Competition and Patent Term Restoration Act” de 1984, o qual concedia ao FDA poderes para autorizar a aprovação de drogas genéricas sem evidências clínicas de segurança ou eficácia, desde que a droga seja bioequivalente ao produto inovador.

A realização de estudos de biodisponibilidade e bioequivalência, de forma rotineira, no Brasil, pode ser creditada à Lei dos genéricos n 9787/99. O pioneirismo coube ao Dr. Gilberto de Nucci, na última década, através da implantação da Unidade Miguel Servet no Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp. Muitos dos profissionais que atuam na área de farmacologia clínica no Brasil realizaram parte de sua formação acadêmica sob orientação do professor Dr. Gilberto de Nucci.

O termo biodisponibilidade é, na verdade, uma contração de disponibilidade biológica. Considera-se biodisponibilidade como sendo a taxa e a extensão na qual uma molécula ativa é absorvida e torna-se disponível no sítio de ação da droga. Considerando-se que a quantidade do fármaco contida no fluido biológico está em equilíbrio com o sítio de ação, a biodisponibilidade é determinada através da medida da concentração do princípio ativo da droga em sangue total, soro ou outro fluido biológico apropriado, em função do tempo.

Os principais parâmetros farmacocinéticos utilizados para a avaliação da biodisponibilidade são:

- O pico de concentração máxima – **C_{máx}**;
- O tempo para ocorrer o pico – **T_{máx}**;
- A área sob a curva – **ASC_t**.

Essas medidas são obtidas diretamente das curvas de concentração sanguínea versus tempo, construídas no estudo.

Biodisponibilidade absoluta

É a fração da dose que é efetivamente absorvida após administração extravascular de um medicamento. É calculada tendo como referência a administração do mesmo fármaco por via intravascular, que possui por definição biodisponibilidade igual a 100%.

Biodisponibilidade relativa (Bioequivalência)

A bioequivalência entre medicamentos administrados pela mesma via extravascular pode ser avaliada pela comparação de parâmetros farmacocinéticos relacionados à biodisponibilidade, ou seja, à quantidade absorvida e à velocidade do processo de absorção. Compara-se dois produtos, administrados por via extravascular, tendo um deles como referência.

Medicamentos bioequivalentes são equivalentes farmacêuticos (mesma forma farmacêutica e quantidade do mesmo princípio ativo) que, ao serem administrados na mesma dose molar, nas mesmas condições experimentais, não apresentam diferenças estatisticamente significativas em relação à biodisponibilidade.

Medicamento genérico é um medicamento similar a um produto de referência ou inovador, que pretende ser com este intercambiável, geralmente produzido após expiração ou renúncia da proteção patentária ou de outros direitos de exclusividade, comprovada a sua eficácia, segurança e qualidade, e designado pela DCB ou, na sua ausência, pela DCI.

1.4. Estudos clínicos

Estudos clínicos utilizando drogas em seres humanos são divididos convencionalmente em 4 fases:

– Fase I

É o primeiro estudo em seres humanos. Envolve cerca de 20 a 50 indivíduos, sendo geralmente voluntários sadios, de acordo com a classe da droga a ser avaliada. São estudos de farmacologia clínica, nos quais se busca avaliar suas características de segurança e do perfil farmacocinético.

– Fase II

Estes estudos constituem a primeira administração do medicamento a pacientes, envolvendo cerca de 50 a 300 indivíduos. Têm como objetivo estudar o potencial terapêutico e os efeitos colaterais do medicamento, além de estabelecer as suas relações dose-resposta para empregá-las em ensaios terapêuticos mais definitivos.

– Fase III

São estudos terapêuticos multicêntricos, envolvendo no mínimo 250 indivíduos (usualmente este número chega a 3000/4000 pacientes), avaliando a eficácia da droga, sua segurança e comparando-as com placebo ou drogas já disponíveis no mercado com a mesma finalidade terapêutica. Exploram-se nesta fase o tipo e perfil das reações adversas mais frequentes.

– Fase IV

Geralmente, são estudos de vigilância pós-comercialização, para estabelecer o valor terapêutico, o surgimento de novas reações adversas e/ou confirmação da frequência de surgimento das já conhecidas, e as estratégias de tratamento. São realizados com base nas características com que foi autorizado o medicamento e/ou especialidade medicinal.

Assim, entre os estudos que buscam identificar parâmetros iniciais de eficácia e segurança, estão os estudos de biodisponibilidade, quando os dados de absorção, distribuição, metabolização e eliminação, bem como efeitos adversos ainda não são totalmente conhecidos. Nestes estudos, uma monitorização médica rigorosa durante toda fase de investigação da droga faz-se necessária. Estudos de bioequivalência, por outro lado, apresentam, como principal propósito, obter evidências de que uma formulação teste não é diferente, do ponto de vista farmacocinético, de uma dada formulação referência. Estes estudos são realizados geralmente como base para solicitação de registro de um medicamento genérico. Conduzidos habitualmente em voluntários sadios, ou seja, um estudo não terapêutico, as características farmacocinéticas e farmacodinâmicas da droga estudada já são conhecidas, apresentando assim um risco menor que estudos iniciais de biodisponibilidade.

1.5. Aspectos de segurança

1.5.1. Eventos adversos

A conceituação de evento adverso em estudos clínicos e sua correta e pronta notificação, quando necessário, são fundamentais para que um estudo clínico seja corretamente conduzido.

Todos os eventos adversos observados ou voluntariamente relatados, independentemente do grupo de tratamento ou de suspeita de relação causal com a medicação em estudo, deverão ser registrados na(s) página(s) correspondentes a Eventos Adversos, necessariamente presentes na Ficha Clínica.

Situações que envolvam eventos adversos a medicamentos, doenças que se iniciem durante o estudo ou exacerbações de doenças preexistentes também deverão ser registrados.

Exacerbação de doença preexistente, incluindo a doença em estudo, é definida como manifestação (sinal ou sintoma) da doença que indique piora significativa da gravidade da mesma em comparação à gravidade observada no início do estudo. Pode incluir piora na gravidade, aumento na frequência ou novos sinais ou sintomas.

Exacerbação de doença pré-existente deverá ser considerada, quando o paciente/indivíduo necessitar de novas medicações ou terapias não medicamentosas adicionais, concomitantes ao tratamento dessa doença durante o estudo.

Resposta clínica insuficiente ou ausência de resposta, benefício, eficácia, efeito terapêutico ou ação farmacológica não devem ser registrados como evento adverso. O investigador deverá distinguir entre exacerbação de doença preexistente e ausência de eficácia terapêutica.

Adicionalmente, alterações clinicamente significativas no exame físico, assim como, achados anormais em testes objetivos (por ex: laboratório, raio-x, ECG) também devem ser registrados como eventos adversos.

Qualquer resultado anormal de um teste, que seja confirmado como um erro, não precisa ser reportado como evento adverso.

O investigador deve se esforçar para obter informações adequadas para todos os eventos adversos, a fim de determinar a evolução do mesmo e avaliar se este preenche os critérios para evento adverso sério, necessitando notificação imediata. Para todos os eventos adversos, o investigador deve obter informações suficientes para determinar sua causalidade (verificar se a causa do evento é a medicação em estudo ou outra doença). O investigador deverá avaliar a causalidade do evento adverso e indicar tal avaliação na Ficha Clínica. O acompanhamento do evento adverso, após a descontinuação do tratamento, é necessário se este ou sua seqüela persistirem. O acompanhamento é necessário até a resolução do evento adverso ou de sua seqüela ou até que estes se estabilizem em nível aceitável pelo investigador.

1.5.2. Eventos adversos sérios

Todos os eventos adversos sérios (conforme definição abaixo), independentemente do grupo de tratamento ou de suspeita de relação causal com a medicação, deverão ser notificados ao Comitê de Ética em Pesquisa que aprovou o protocolo, além de seu registro na ficha clínica.

Um **evento adverso sério** é qualquer evento adverso que:

- Resulte em morte;
- Coloque em risco a vida do voluntário/paciente;
- Resulte em hospitalização ou prolongamento de hospitalização;
- Resulte em incapacidade persistente ou significativa;
- Resulte em anomalias congênitas ou mal formação ao nascimento.

Eventos médicos importantes podem não resultar em morte, colocar em risco a vida do paciente ou requerer hospitalização, mas podem ser considerados eventos adversos sérios quando, com base em julgamento médico adequado, possam comprometer o paciente/indivíduo e requerer intervenção clínica ou cirúrgica para evitar a ocorrência de um dos desfechos listados na definição anterior.

Exemplos de tais eventos incluem broncoespasmo alérgico que necessite de tratamento intensivo em pronto socorro ou em casa, discrasias sanguíneas ou convulsões que não resultem em hospitalização ou o desenvolvimento de dependência ou abuso de droga.

Independente dos critérios acima mencionados, qualquer evento adverso adicional considerado sério pelo investigador deverá ser notificado e incluído na ficha clínica.

Hospitalização inicial é definida como qualquer admissão hospitalar (mesmo que dure menos do que 24 horas). Para hospitalizações crônicas ou de longa duração, a admissão também inclui a transferência, dentro do próprio hospital, para uma unidade de terapia intensiva.

Em algumas ocasiões, a admissão hospitalar pode não ser considerada como um evento adverso. Por exemplo:

- Admissão para tratamento de condição preexistente não associada ao desenvolvimento de um novo evento adverso ou com piora da condição preexistente;
- Admissão social (por exemplo, o indivíduo não tem lugar para dormir);
- Admissão administrativa (por exemplo, para o exame clínico anual);
- Admissão especificada em protocolo durante o estudo clínico (por exemplo, para realização de procedimento solicitado pelo protocolo do estudo);
- Admissão opcional não associada ao evento adverso clínico precipitante (por exemplo, para cirurgia cosmética eletiva).

Entretanto, ocorrendo hospitalização por um evento desconhecido, esta deverá ser considerada como evento adverso sério.

No entanto, não serão considerados admissão hospitalar os seguintes casos:

- Atendimento em Pronto Socorro ou Unidades de Emergência;
- Procedimentos em regime ambulatorial/externos realizados no mesmo dia;
- Unidades de observação de permanência curta;
- Unidades de reabilitação;
- Casas de repouso;
- Clínicas com enfermagem especializada;
- Asilos e Casas de Saúde;
- Unidades de Pesquisa Clínica Fase I.

Prolongamento da hospitalização é definido como qualquer extensão da internação além do tempo previsto/necessário em relação à razão original para a admissão inicial, **conforme determinado pelo investigador principal ou pelo clínico**. Para as hospitalizações especificadas no protocolo do estudo clínico, prolongamento é definido como qualquer extensão no período de internação além da duração requerida em protocolo.

Tratamentos ou procedimentos cirúrgicos pré-planejados devem estar registrados na documentação inicial durante o período do protocolo e para cada indivíduo em particular.

Incapacidade é a perda substancial da competência de uma pessoa desempenhar normalmente as funções da vida diária.

Qualquer evento adverso sério ou morte devem ser imediatamente notificados, independentemente das circunstâncias ou de suspeita de relação causal com a medicação, caso ocorra ou venha a ser conhecida pelo investigador a qualquer momento durante o estudo até a última visita de acompanhamento solicitada pelo protocolo ou até 30 dias após a última tomada da medicação em estudo, o que ocorrer por último. Qualquer evento adverso sério que ocorra a qualquer momento após o término do estudo deve ser imediatamente notificado caso haja suspeita de relação causal com a medicação em estudo. A única exceção a estes procedimentos requeridos de relato refere-se a eventos adversos sérios que ocorrerem durante o período de *washout* durante o qual está sendo administrado placebo isoladamente, ou nenhuma medicação ativa do estudo esteja sendo administrada, como também nenhuma medicação de fundo especificada pelo protocolo .

Para todos os eventos adversos sérios, o investigador tem o dever de fornecer as informações mais completas possíveis. Em geral, isto inclui a descrição do evento adverso, com detalhes suficientes que permitam avaliação clínica completa do caso, e avaliação independente de possível relação causal com a medicação em estudo. Devem ser fornecidas informações sobre outras possíveis causas do evento, incluindo medicações e doenças concomitantes. A avaliação do investigador em relação à causalidade também precisa ser fornecida. Se a causalidade é desconhecida e o investigador não sabe se foi ou não a droga em estudo que causou o evento, esta deverá então ser atribuída à droga em estudo. Se a avaliação de causalidade por parte do investigador é “desconhecida, porém, não relacionada à droga em estudo”, isto deverá estar claramente documentado nos registros do estudo. Em caso de morte, um resumo dos achados da necrópsia deverá ser arquivado junto com os documentos do estudo. O investigador deverá garantir que a informação notificada e que a informação contida na Ficha Clínica sejam precisas e consistentes.

1.5.3. Resultados de testes laboratoriais anormais

Os resultados de todos os exames laboratoriais solicitados pelo protocolo deverão ser registrados na Ficha Clínica. Todos os resultados laboratoriais anormais clinicamente importantes que ocorrerem durante o estudo deverão ser repetidos a intervalos adequados de tempo até retornarem aos valores do período basal ou a um nível aceitável pelo investigador ou até que seja feito um diagnóstico que explique tais alterações.

Os critérios para determinar se um achado anormal de um teste deve ser reportado como evento adverso são os seguintes:

- Quando o resultado do teste está acompanhado de sintoma associado;
- Quando o resultado do teste necessita de um exame diagnóstico adicional ou intervenção médica/cirúrgica;

- Quando o resultado do teste leva a uma alteração da dose da medicação do estudo ou descontinuação do estudo, introdução de um tratamento medicamentoso concomitante significativo ou outra terapia;
- Quando o resultado do teste leva a qualquer um dos desfechos incluídos na definição de evento adverso sério;
- Quando o resultado do teste é considerado pelo investigador principal ou pelo patrocinador como evento adverso.

1.6. Das responsabilidades

1.6.1. Patrocinador

O Patrocinador é responsável por providenciar as informações necessárias ao Investigador Principal e seu grupo, de maneira que eles possam compreender os procedimentos do estudo, bem como concordar com os requisitos do Pesquisador.

É responsabilidade do Patrocinador a escolha do Centro de Pesquisa e do Investigador Principal.

O Patrocinador deverá certificar-se de que o estudo seja conduzido de acordo com as normas de Boas Práticas Clínicas e as regulamentações locais, confirmando a aprovação do estudo pelo CEP, antes do início do mesmo.

Todos os medicamentos requeridos pelo estudo, de acordo com o protocolo, deverão ser fornecidos sem ônus para os sujeitos da pesquisa e assegurar os benefícios resultantes do projeto, seja em termos de retorno social, acesso aos procedimentos, produtos ou agentes da pesquisa (Resolução 196/96CNS).

Ainda são obrigações:

- Providenciar tratamento para intercorrências clínicas com os sujeitos da pesquisa;
- Compensação por lesões;
- Relato dos eventos adversos para as Agências Reguladoras;
- Relatório final do estudo;
- Assinatura do contrato e protocolo c/ o investigador;
- Monitoração do estudo;
- Controle qualidade;
- Verificação do acesso dos monitores aos dados;
- Supervisão da condução da pesquisa;
- Arquivo dos documentos;
- Assegurar acesso ao medicamento em teste, caso se comprove sua superioridade em relação ao tratamento convencional (Resolução 251/97, CNS).

1.6.2. Investigador principal

O Investigador principal deve ser qualificado por sua formação educacional, treinamento e experiência para assumir a responsabilidade pela correta condução dos estudos, bem como possuir todas as qualificações especificadas pelas legislações vigentes. É recomendável que tais qualificações sejam documentadas.

É responsabilidade do investigador principal garantir que os direitos e bem estar dos sujeitos da pesquisa estejam garantidos, obtendo de forma correta, e no momento adequado, a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Também são responsabilidades do investigador principal:

- Supervisionar ou conduzir pessoalmente a pesquisa de acordo com as Normas de Boas Práticas Clínicas;
- Assegurar que todos os participantes dos estudos foram informados de suas obrigações referentes ao protocolo de pesquisa;
- Assegurar que os sujeitos da pesquisa recebam os medicamentos sem ônus;
- Providenciar recursos, pessoal e instalações necessárias e adequadas para a conclusão a bom termo do estudo;
- Conhecimento do produto, protocolo e conteúdo da brochura do investigador;
- Avaliação dos eventos adversos e evolução;
- Estar ciente das decisões médicas e tratamento dos eventos adversos;
- Aderência ao protocolo;
- Uso adequado do medicamento da pesquisa;
- Coleta, registro e notificação dos dados;
- Assinatura do contrato e do protocolo;
- Relato dos eventos adversos;
- Manutenção do arquivo com os documentos necessários;
- Facilitar o acesso aos documentos para o monitor ou nas auditorias;
- Delegação de responsabilidades aos subordinados, ou autorizar a realização de etapas do estudo em centros terceiros. Tal autorização deverá ser documentada de maneira formal e submetida aos órgãos competentes;
- Garantir a aprovação pelo CEP e as revisões necessárias;
- Relatos periódico e final ao CEP.

2. ESTUDOS DE BIODISPONIBILIDADE/BIOEQUIVALÊNCIA DE MEDICAMENTOS – ETAPA CLÍNICA

2.1. Introdução

A etapa clínica compreende desde a seleção dos voluntários até a alta hospitalar e o último retorno para acompanhamento.

Ao ser montado um centro de estudos de biodisponibilidade/bioequivalência que realize a etapa clínica, deve se considerar que os participantes de tais estudos não terão benefícios terapêuticos diretos pela participação nos estudos. Dessa forma, todos os cuidados serão tomados para minimizar os riscos inerentes à administração de medicamentos ou internação, além de propiciar aos participantes o maior conforto possível.

Na instalação de um centro de pesquisa clínica para realização de estudos de biodisponibilidade/bioequivalência, deve se levar em conta que tal centro não é somente constituído de suas instalações físicas, que seguem uma legislação específica, mas principalmente da interação de uma equipe que, por princípio, é multidisciplinar. Tendo em vista a multidisciplinaridade da equipe profissional necessária para a realização da etapa clínica de estudos, bem como a importância desta fase nas etapas seguintes (analítica e estatística) e no resultado final do estudo. É necessário que os profissionais envolvidos tenham conhecimentos gerais sobre os passos analíticos e estatísticos, pois sua atuação pode influenciar o resultado final dos estudos.

2.2. Instalações

O centro deve estar com sua situação legal regularizada, possuindo um responsável legal, bem como autorização de funcionamento junto à ANVISA e apresentar condições de segurança em conformidade com a legislação vigente. O investigador principal, responsável pela condução dos estudos, deverá estar definido, sendo que este não necessita ser simultaneamente seu representante legal.

As instalações deverão ser, preferencialmente, exclusivas para pesquisa clínica. Não deverá ser realizado o confinamento conjunto de voluntários e enfermos.

Os quartos, ou enfermarias, deverão possuir boa ventilação e iluminação, além do espaço mínimo, exigido pelas legislações sanitárias pertinentes, para o número de leitos instalados. Os sanitários deverão estar em boas condições de higiene e uso e ser em número suficiente para o número máximo de voluntários a serem internados. O conjunto de quartos ou as enfermarias deverão possuir posto de enfermagem próximo. O pessoal de apoio deverá ter a sua disposição vestiário, sala de estar e sanitários, em número suficiente e em boas condições de uso.

O local destinado a realização da etapa clínica deverá possuir uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI), localizada em ponto de fácil acesso a partir do local de internação. Se o centro não possuir UTI própria, uma UTI móvel deverá estar à disposição dos voluntários durante todo o período de confinamento, bem como uma instituição de apoio, com UTI, deverá estar ciente da realização do estudo clínico e concordar com o encaminhamento e recebimento de voluntários para a mesma, caso seja necessário. Esta anuência deverá estar devidamente documentada.

A ala de internação deverá contar com carrinho de emergências, contendo ambu, laringoscópio, cânulas de entubação oro-traqueal, cardioversor, seringas descartáveis e medicamentos necessários para realização de procedimentos de reversão de parada cárdio-respiratória, ou para o tratamento de eventos que potencialmente possam originar uma parada cárdio-respiratória. Tais itens deverão estar disponíveis durante todo o período referente à Etapa. É necessário ainda que o local de internação disponha de gerador elétrico de emergência, bem como os equipamentos elétricos imprescindíveis sejam ligados a estabilizadores de voltagem e “no breaks”.

2.3. Recrutamento e seleção dos voluntários

Os voluntários podem comparecer espontaneamente a um centro clínico de biodisponibilidade/bioequivalência ou serem recrutados por meio de anúncios, desde que os anúncios sejam previamente aprovados por um CEP. Após ser informado da natureza do estudo e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, o voluntário será submetido a uma consulta médica e a exames complementares de acordo com a legislação vigente e o protocolo de pesquisa em questão.

Caso alguma anormalidade (enfermidade) seja constatada durante o processo de seleção o indivíduo deverá ser encaminhado para um serviço de saúde para o devido acompanhamento. Estes dados deverão estar devidamente documentados na ficha clínica do estudo em questão.

Todo o processo de recrutamento e seleção de voluntários deverá estar devidamente descrito, ser conhecido e seguido por todos os profissionais envolvidos.

2.4. Internação e alta dos voluntários

Os voluntários selecionados para um ensaio de biodisponibilidade/bioequivalência deverão ser internados na noite anterior ao início do estudo, sendo reavaliados por médico, no momento da internação, preferencialmente em consultório da unidade clínica, onde terão seus dados vitais (pulso, pressão arterial e temperatura) avaliados. Tal medida busca reduzir as eventuais interferências que possam ocorrer na farmacocinética do medicamento a ser administrado, devido à ingestão de bebidas alcoólicas, poucas horas de sono ou atividade física intensa nas horas que antecedem ao estudo, bem como identificar acontecimentos entre a seleção e a internação de possíveis fatores de exclusão que possam impedir o voluntário de participar da fase clínica naquele momento.

Os procedimentos relativos à internação e alta dos voluntários deverão ser padronizados em documento específico e seguidos pelos responsáveis pela admissão e liberação. Os equipamentos utilizados na avaliação pré- internação (esfigmomanômetro, estetoscópio e termômetro) deverão estar em boas condições de uso. É recomendável que ao ser admitido, o voluntário receba uma programação dos eventos a serem realizados durante o período de confinamento, na qual conste, no mínimo, os horários previstos para a administração do medicamento, refeições, coletas e liberação.

Após o término das fases de administração do medicamento e coletas de material biológico previstas no protocolo, o indivíduo deverá obrigatoriamente ser submetido a uma nova avaliação médica e aos exames subsidiários previstos no protocolo de estudo para diagnóstico de possíveis intercorrências que por ventura tenham sido ocasionadas pela participação no ensaio clínico.

2.5. Administração do medicamento e coleta de material biológico

Os voluntários deverão permanecer em jejum por um período mínimo de 8 h antes da administração dos medicamentos a serem estudados. Imediatamente antes do início da administração do medicamento, deverá ser assegurada uma veia periférica para a obtenção do material biológico, a qual deverá ser mantida pelo período necessário.

As coletas deverão ser realizadas de acordo com as características farmacocinéticas do medicamento a ser estudado, conforme protocolo de pesquisa, sendo que a primeira coleta (coleta basal) deverá ser obrigatoriamente realizada antes da administração do medicamento (em torno de trinta minutos).

Todos os procedimentos de administração do medicamento, coleta, preparo e armazenamento de amostras deverão estar registrados em documento específico, com identificação do responsável. Os tempos determinados pelo protocolo para a coleta das amostras deverão ser rigorosamente seguidos. Qualquer intercorrência na coleta deverá ser registrada na planilha correspondente.

O medicamento deverá ser administrado conforme descrito no protocolo, sob supervisão médica, por enfermeiro, farmacêutico ou profissional habilitado. Os voluntários deverão ser supervisionados por médico nas horas posteriores após administração do medicamento, em período suficiente para assegurar suporte médico a eventuais efeitos adversos. Os dados vitais dos voluntários deverão ser controlados durante todo o período de confinamento. Medidas complementares deverão ser adotadas caso o protocolo da pesquisa assim o determine. Eventuais intercorrências deverão ser devidamente documentadas.

A unidade clínica deverá manter médico plantonista durante todo o período de internação, que deverá estar ciente da realização do estudo de biodisponibilidade/bioequivalência, quando não diretamente envolvido com este. Neste caso, o médico responsável pela etapa clínica deverá ser facilmente localizável e estar disponível para resolução de eventuais intercorrências. A ocorrência de eventos adversos, sua intensidade, bem como as medidas tomadas para sua reversão, deverão ser devidamente registradas em documento apropriado, com identificação e assinatura do responsável pelo atendimento ao voluntário, bem como pelo pesquisador principal. A ocorrência de efeitos adversos graves deverá ser documentada e notificada às autoridades competentes.

Durante o período de internação, a dieta dos voluntários deverá ter a supervisão de um nutricionista e ser definida de modo a não interferir com a análise e farmacocinética do medicamento estudado.

2.6. Manuseio das amostras biológicas

As amostras biológicas deverão ser preparadas para armazenamento, de forma padronizada e seguindo as características conhecidas do fármaco e metodologia de dosagem (p. ex.: plasma, sangue total ou soro, sensibilidade à temperatura ou luz, entre outras). Os “freezers” utilizados deverão ter sua temperatura monitorada de modo a garantir a integridade das amostras. Todos os procedimentos deverão ser padronizados, realizados por profissionais qualificados e todos os passos do processo, bem como os responsáveis pelos mesmos, deverão ser identificados e registrados.

2.7. Documentação

Todos os projetos de pesquisas, a fim de comprovar a biodisponibilidade de um medicamento em relação ao produto de referência, deverão compor um protocolo de pesquisa, com todos os documentos preconizados pelas Resoluções nº 196/96 e nº 84/02 e seus Guias e apresentá-lo a um CEP para apreciação.

Todo estudo deverá seguir as normas de boas práticas clínicas e os regulamentos locais em vigor, devendo ser realizado em conformidade com o protocolo do estudo.

2.7.1. Protocolo de pesquisa

O protocolo de pesquisa, em sua forma mais abrangente, conforme a Resolução 196/96 item II Termos e Definições, é o conjunto de documentos que contém a descrição da pesquisa em seus aspectos fundamentais, informações relativas ao sujeito da pesquisa, à qualificação dos pesquisadores e a todas as instâncias responsáveis.

O conteúdo de um protocolo de pesquisa pode variar na dependência do tipo de estudo, sendo que a Resolução 196/96 explicita as informações que devem estar contidas neste.

2.7.2. Protocolo clínico

Por definição, o protocolo clínico é o documento que descreve os objetivos, desenho, metodologia, considerações estatísticas, e organização de um estudo clínico. Os protocolos também contêm o histórico para o estudo clínico e sua justificativa.

Uma outra fonte de informações para a montagem de um protocolo clínico é a Conferência Internacional de Harmonização (ICH). Segundo a ICH as seções que podem estar contidas em um protocolo são:

- Informações gerais:
 - Título, número e data do protocolo;
 - Parágrafo de Confidencialidade;
 - Nome e endereço do patrocinador e monitor (caso não seja o patrocinador);
 - Nome, endereço dos laboratórios clínicos;
 - Nomes e títulos dos investigadores e co-investigadores;
- Informações do Desenho do Estudo:
 - Tipo de estudo e desenho;
 - Objetivos primários e objetivos secundários;
 - Descrição dos procedimentos de randomização e “blinding” ;
 - Tratamentos do estudo e regime de doses incluindo as informações de embalagem e rótulo;
- Informações da População do estudo:
 - Número de pacientes;
 - Duração da participação dos sujeitos;
 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
 - Manutenção dos códigos de randomização e procedimentos para abertura dos códigos (estudo duplo-cego);
- Seleção e Descontinuação:
 - Critérios de inclusão;
 - Critérios de exclusão;
 - Critérios de descontinuação de pacientes;
 - quando e como descontinuar;
 - tipo de dados a serem coletados;
 - substituição dos sujeitos;
 - follow-up dos sujeitos descontinuados;
 - Tratamento dos Sujeitos;
 - nomes de todos os produtos, doses, escalas de doses, via de administração, período de tratamento e período de acompanhamento;
 - medicações/tratamentos permitidos e não-permitidos antes e durante o estudo;
 - Procedimentos de monitorização da aderência;
- Avaliações de Eficácia e Segurança:
 - Especificação dos parâmetros de eficácia e segurança;
 - Métodos e tempo para avaliar, registrar e analisar estes parâmetros;
 - Procedimentos para registro e reporte de eventos adversos e doenças intercorrentes;
 - Tipo e duração do acompanhamento dos sujeitos após a ocorrência de evento adverso;
- Conduta do estudo:
 - Frequências das monitorizações;
 - Auditoria;
 - Manutenção dos dados e dos registros;
 - Política de Publicação;

- Procedimentos para monitorizar a aderência dos sujeitos (“compliance”);
- Outros:
 - Parâmetros laboratoriais clínicos;
 - Terapia concomitante;
 - Documentação da aprovação do investigador e data (página de assinaturas);
 - Financiamento e seguro;
 - Acesso direto;
 - Ética.

Todos os documentos solicitados a compor o protocolo constituem-se em ferramentas fundamentais para o exercício da apreciação ética pelos membros do CEP. Dentre estes, especial atenção deve ser dada ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) a ser assinado pelo voluntário da pesquisa.

2.7.3. Termo de consentimento livre e esclarecido

A Resolução 196/96 no item IV – Consentimento Livre e Esclarecido aborda todos os aspectos que devem ser contemplados no TCLE, aos quais o pesquisador deve atentar quando de sua confecção. Especial atenção deve ser dada ao processo de obtenção do TCLE, que, a despeito somente da obtenção de uma assinatura, compreende um verdadeiro processo educativo para o sujeito de pesquisa.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido deve fornecer ao sujeito do estudo toda a informação necessária sobre o estudo para que o mesmo possa decidir sobre sua participação na pesquisa. O sujeito do estudo deve ter liberdade para fazer perguntas livremente, esclarecendo qualquer dúvida que exista, bem como ter tempo adequado para refletir sobre sua participação.

O consentimento Livre e Esclarecido deve ainda:

- Ser aderente à Resolução 196/96/GCP/Declaração de Helsinki;
- Ser aprovado por um Comitê de Ética antes de sua utilização;
- Ser revisado toda vez que informações novas surgirem;
- Ser escrito em linguagem acessível ao sujeito do estudo;
- Não levar o sujeito a abdicar de nenhum de seus direitos legais;
- Uma cópia do termo de consentimento assinado ser entregue ao sujeito;
- Ser escrito em linguagem acessível;
- Abordar que o estudo envolve pesquisa;
- Que a participação do sujeito no estudo é voluntária;
- Fornecer a justificativa, os objetivos e procedimentos que serão utilizados na pesquisa, incluindo todos os procedimentos invasivos;
- Os desconfortos e riscos possíveis e os benefícios esperados e caso não haja benefício clínico pretendido ao sujeito, o mesmo deve ter consciência deste fato;
- Os métodos alternativos existentes, bem como seus benefícios e riscos potenciais;
- As responsabilidades do sujeito participante do estudo;

- Os aspectos experimentais do estudo;
- A forma de acompanhamento e assistência, assim como seus responsáveis;
- A duração esperada da participação do sujeito no estudo;
- O número aproximado de sujeitos envolvidos no estudo;
- A garantia de esclarecimentos, antes e durante o curso da pesquisa, sobre a metodologia, informando a possibilidade de inclusão em grupo controle ou placebo e a probabilidade de inclusão em cada braço;
- A pessoa de contato no caso de esclarecimentos adicionais em relação ao estudo e direitos dos sujeitos envolvidos. Quem contatar no caso de eventuais danos decorrentes da pesquisa;
- As formas de ressarcimento das despesas decorrentes da participação na pesquisa;
- As formas de indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa;
- Que o(s) monitores, auditor(es), Comitês de Ética em Pesquisa e autoridades regulatórias terão acesso direto aos registros médicos originais do sujeito para verificação dos procedimentos do estudo clínico e/ou seus dados, sem violar sua confidencialidade frente às leis e regulamentações aplicáveis e que, assinando o Consentimento Livre e Esclarecido, o sujeito ou seu representante legal autorizam este acesso;
- Os registros que identificam o sujeito serão mantidos confidenciais em conformidade com as leis e regulamentações aplicáveis, e não se tornarão de uso público. Se os resultados do estudo forem publicados, a identidade do sujeito terá sua confidencialidade resguardada;
- O sujeito ou seu representante legal será informado se alguma informação nova que possa ser relevante para a decisão do sujeito em relação a sua participação no estudo venha a surgir;
- Fornecer proteção para “populações vulneráveis”.

Como exemplos de populações vulneráveis, temos:

- Crianças;
- Membros das forças armadas;
- Empregados subordinados a hospitais e laboratórios;
- Estudantes de medicina;
- Minorias étnicas;
- Pessoas em casas de repouso;
- Pessoas mentalmente incapacitadas;
- Pacientes com doenças incuráveis ou em situações de emergência;
- Desempregados, mendigos, desabrigados, refugiados, nômades, menores, etc.

É muito importante ressaltar, dentre os vários itens acima, que a obtenção do Consentimento Livre e Esclarecido deverá ocorrer antes que qualquer procedimento seja realizado com o sujeito da pesquisa, bem como se exige que o esclarecimento aos sujeitos da pesquisa se faça em linguagem acessível.

O Consentimento Livre e Esclarecido deverá ser datado e assinado pelo participante do estudo, bem como pelo responsável pela aplicação do mesmo.

2.7.4. Ficha clínica

Uma ficha clínica do estudo que inclua as informações necessárias para a identificação do estudo e do sujeito participante deverá existir. Este documento contém os dados referentes ao acompanhamento do voluntário. Estes dados são considerados confidenciais, preservando a identidade do voluntário.

É necessário que o Protocolo Clínico e seu respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido sejam aprovados por um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) Registrado pela CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa) antes do início da pesquisa.

Qualquer emenda que este protocolo clínico ou Termo de Consentimento Livre e Esclarecido venha a sofrer no decorrer do estudo também deverá ser encaminhada ao CEP para aprovação. Caso a emenda vise resguardar a segurança do sujeito do estudo, a mesma poderá ser implementada imediatamente, sendo de maneira concomitante encaminhada ao CEP para a devida aprovação. Havendo alteração do Consentimento Livre e Esclarecido, os sujeitos da pesquisa que ainda estiverem participando da mesma deverão assinar também a nova versão do consentimento.

As características do Comitê de Ética em Pesquisa estão na Resolução 196/96 item VII – Comitê de Ética em Pesquisa – CEP.

O Comitê deverá ter ao menos 7 membros, não devendo haver mais que metade de seus membros pertencentes à mesma categoria profissional. Sua constituição terá caráter multi e transdisciplinar, incluindo pessoas dos dois sexos e a participação de profissionais da área de saúde, das ciências exatas, sociais e humanas, incluindo, por exemplo, juristas, teólogos, sociólogos, filósofos, bioeticistas e, pelo menos, um membro da sociedade representando os usuários da instituição. Poderá variar na sua composição, dependendo das especificidades da instituição e das linhas de pesquisa a serem analisadas.

O Comitê de Ética em Pesquisa poderá ou não pertencer a Instituição na qual o estudo é realizado, podendo valer-se de consultores “ad hoc” para análises específicas. Caso a Instituição não tenha um CEP, um CEP independente ou de outra Instituição poderá ser utilizado, desde que este CEP seja registrado pela CONEP.

Membros do CEP envolvidos em estudos clínicos não poderão participar da votação de projetos dos quais estejam participando.

Os documentos acima referidos, originais ou cópia, conforme aplicável, deverão estar devidamente arquivados junto a outros documentos do estudo à disposição para inspeções, pelo patrocinador e/ou agência reguladora, que por ventura venham a ocorrer.

Todos os documentos relativos a biodisponibilidade/bioequivalência de um estudo clínico deverão ser arquivados por um prazo mínimo de 15 anos, e deverão estar disponíveis para possíveis verificações por parte das autoridades regulatórias.

2.8. Das responsabilidades

2.8.1. Patrocinador

- Monitoração do estudo.
- Controle de qualidade.
- Supervisão da condução da pesquisa.
- Arquivo dos documentos.
- Subvenção financeira e logística.

2.8.2. Investigador principal

O investigador principal é responsável perante a ANVISA por todas as fases do estudo, mesmo aquelas não realizadas em seu centro, pela exatidão dos dados apresentados, bem como pelo cumprimento do delineamento experimental apresentado no protocolo de pesquisa.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Goldman DS. Principles of the Good Laboratory Practice Regulations Applied to Pharmacokinetics. In Welling PG e Tse FLS (eds). Pharmacokinetics. Regulatory-Industrial-Academic Perspectives. Second Edition Marcel Dekker, Inc, New York, Basel, Honk Kong, 1995, pgs 1-20

Gomes, GR. Manual de Investigación Clínica. Editorial ICIC, 1999, 25-210.

Hutchinson, D. The Trial Investigator's GCP Handbook: a practical guide to ICH requirements. Brookwood Medical Publications Ltd., 1997, 4-47.

Hutchinson, D. Which documents, why? A guide to essential clinical trial documentation for investigators. Brookwood Medical Publications Ltd., 1997, 3-36.

McGilveray IJ. Progress in Harmonization of Bioavailability and Bioequivalence Standards. In André J. Jackson (ed). Generics and Bioequivalence. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 1994, pgs 187-192

Narang PK. Issues in bioequivalence: An industrial Scientist's Perspective. In André J. Jackson (ed). Generics and Bioequivalence. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 1994, pgs 179-186.

Shargel L, Yu ABC. Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics. Fourth Edition. Appleton & Lange , USA, 1999

Manual de Boas Práticas em Biodisponibilidade Bioequivalência



Volume I

**Módulo 2:
Etapa Analítica**

Volume I – Módulo 2 – Etapa Analítica**Editores:**

- Flávio Leite – PUC – Campinas
- Cláudia Franklin de Oliveira – ANVISA
- Pedro Eduardo Froehlich – UFRS
- Rui Oliveira Macedo – UFPA

Colaboradores:

- Davi Pereira de Santana – UFPE
- Itapuan Abimael Silva – ANVISA
- Jaime Oliveira Ilha – Cartesius
- Karen Noffs Brisolla – ANVISA
- Marcelo Cláudio Pereira – ANVISA
- Max Weber Pereira – ANVISA
- Pedro de Lima Filho – ANVISA
- Rafael Eliseo Barrientos Astigarraga – Cartesius
- Silvana Calafatti de Castro – UNIFAG
- Thaís Reis Machado

Coordenação:

- Cláudia Franklin de Oliveira – ANVISA
- Itapuan Abimael da Silva – ANVISA
- Karen de Aquino Noffs Brisolla – ANVISA
- Karla de Araújo Ferreira – ANVISA
- Marcelo Cláudio Pereira – ANVISA
- Max Weber Marques Pereira – ANVISA
- Renato Almeida Lopes – ANVISA

Apoio Logístico:

- Daniela Salles de A. B. Corrêa – ANVISA
- Diva Sales Freitas – ANVISA

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA - MATERIAIS E REAGENTES	05
1.1. Introdução	05
1.2. Substâncias químicas de referência (SQR) e padrão interno	06
1.2.1. SQR disponível comercialmente	06
1.2.2. SQR não disponível comercialmente	06
1.2.3. Laboratório analítico autorizado (LAA)	07
1.3. Metabólitos	07
1.4. Padrões internos	07
1.5. Armazenamento e manuseio	07
1.6. Reagentes e solventes	08
1.6.1. Estocagem	08
1.6.2. Água grau cromatográfico	08
1.7. Vidraria	08
1.8. Balanças	09
1.8.1. Instalação	09
1.8.2. Manutenção e conservação	10
1.9. Equipamentos com temperatura controlada	10
1.10. Tubos de amostragem e análise	10
2. MÉTODO BIOANALÍTICO	11
2.1. Introdução	11
2.2. Pré-validação	11
2.2.1. Exatidão, precisão e recuperação	11
2.2.2. Linearidade e limites de quantificação	12
2.2.3. Especificidade/Seletividade	12
2.3. Estabilidade dos fármacos em fluidos biológicos	13
2.3.1. Introdução	13
2.3.2. Revisão da literatura	13
2.3.3. Cinética de degradação	15
2.3.4. Problemas analíticos relacionados à estabilidade	18
2.4. Armazenamento das amostras	19
2.5. Validação do método	19
2.5.1. Introdução	19
2.5.2. Método bioanalítico	20
2.5.3. Ferramentas para a validação	21

2.5.4. Glossário	23
2.6. Fluxograma operacional da etapa analítica da bioequivalência	26
3. RECOMENDAÇÕES PARA A ETAPA ANALÍTICA	28
3.1. Materiais de referência	28
3.1.1. Reagentes e solventes	28
3.1.2. Balanças e pesos de calibração	28
3.1.3. Termômetros e outros dispositivos de verificação de temperatura	28
3.1.4. Peagômetro (pHmetro)	28
3.1.5. Centrífuga	28
3.1.6. Sistema de evaporação de amostras	29
3.1.7. Vidraria	29
3.1.8. Pipetas	29
3.2. Recebimento de amostras	29
3.3. Estudo de estabilidade	30
3.3.1. Estabilidade de curta duração	30
3.3.2. Estabilidade de média duração	31
3.3.3. Estabilidade de longa duração	31
3.4. Validação	32
3.4.1. Seletividade	32
3.4.2. Recuperação	32
3.4.3. Limites	33
3.4.4. Linearidade	34
3.4.5. Precisão	34
3.4.6. Exatidão	36
3.4.7. Aceitação da validação	36
3.5. Aplicação do método validado no estudo	36
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA – MATERIAIS E REAGENTES

1.1. Introdução

O uso de substâncias químicas de elevado grau de pureza é fundamental para assegurar a qualidade dos dados analíticos (GARFIELD, 1997; CROSBY et al., 1997).

Assim como os reagentes químicos utilizados, o uso de SQR é fundamental para uma correta quantificação dos fármacos e/ou seus metabólitos.

Para uma melhor compreensão deste material, algumas definições são importantes:

Padrão primário: de acordo com SKOOG & WEST (1979), uma substância deve apresentar as seguintes características:

- deve apresentar elevado grau de pureza, que deve ser determinado;
- deve ser estável;
- não deve ser higroscópico ou eflorescente;
- deve ser de fácil obtenção e preferencialmente de baixo custo;
- deve apresentar um peso molecular relativamente elevado.

Como exemplos de padrão primário temos o dicromato de potássio, carbonato de sódio e biftalato de potássio.

Esta última definição parece ser a mais adequada para fármacos, uma vez que a maioria destes não satisfaz as condições descritas por Skoog & West.

As definições abaixo são baseadas em publicações do National Institute of Standards and Technology (NIST) e a Farmacopéia Americana (USP 25) e aceitos pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists), conforme resumidas por GARFIELD (1997):

Material de referência certificado (MRC): material com uma ou mais propriedades certificadas por procedimentos técnicos válidos, acompanhados por ou rastreáveis a um certificado ou outro tipo de documentação emitida por um órgão certificador.

Material de referência padrão (MRP): material produzido pelo NIST. MRPs são certificados em relação a propriedades físico-químicas específicas e acompanhados de certificados que reportam os resultados e indicam o uso do material.

Padrões de referência USP (USP Reference Standards): são fármacos purificados ou em elevado grau de pureza, distribuídos pela USP após recomendação do USP Reference Standards Committee. A seleção dos lotes de matérias-primas utilizadas na preparação destes padrões estão baseadas nas

características críticas de cada fármaco, analisados por três ou mais laboratórios, entre os laboratórios da USP, FDA, acadêmicos ou privados. (USP 25)

Padrão de trabalho ou padrão secundário: preparado a partir da análise de um lote de material de pureza adequada contra um do padrão ou SQR certificado, utilizando metodologia oficial e mantendo o registro das análises. Quando este padrão de trabalho é utilizado na análise de uma amostra, a SQR a partir da qual ele foi preparado deve ser mencionada.

Além da USP, várias outras farmacopéias, como a Européia e a Britânica, produzem seus padrões. Estas instituições chamam seus padrões de **substâncias químicas de referência** (do inglês “**chemical reference substance**”, ou simplesmente “CRS”). Além destas, padrões químicos e biológicos de vários fármacos também são distribuídos pela Organização Mundial da Saúde (OMS).

Procedimento semelhante foi adotado, recentemente, pela Farmacopéia Brasileira (F.Bras.) Em 2000, foi nomeada a Comissão de Material de Referência (Port. 733, DOU 201-E, de 18/10/2000), que iniciou a produção das primeiras substâncias químicas de referência (SQR) da Farmacopéia Brasileira.

Conforme Resolução – RDC nº 56, de 26 de fevereiro de 2002, D.O. de 27/02/2002, após disponíveis, as SQR da F. Bras. são as SQR oficiais em território nacional e devem ser utilizadas obrigatoriamente em relação às demais anteriormente citadas.

1.2. Substâncias químicas de referência (SQR) e padrão interno

O grau de pureza das substâncias químicas utilizadas como referência nos estudos analíticos pode afetar a qualidade dos resultados. O termo SQR refere-se aos padrões do fármaco em estudo e seu(s) metabólito(s), quando for o caso. São substâncias de elevado grau de pureza, devidamente certificadas. Podem ser de dois tipos:

1.2.1. SQR disponível comercialmente

Sempre que disponíveis, deverão ser utilizadas SQRs da Farmacopéia Brasileira ou aquelas fornecidas por outras instituições/empresas reconhecidas nacional ou internacionalmente, desde que possibilitem seu rastreamento.

1.2.2. SQR não disponível comercialmente

Deve ser obtida a partir de substâncias de grau farmacêutico, acompanhado do respectivo certificado de análise do lote e em quantidade suficiente para a produção de um padrão de trabalho que será utilizado nos estudos como referência. Este padrão de trabalho somente poderá ser produzido por um Laboratório Analítico Autorizado (LAA), que deverá manter os registros analíticos. Existem aqui duas possibilidades para desenvolver o roteiro de análises para quantificar a matéria-prima como padrão de trabalho:

– Existe monografia farmacopéica disponível

Neste caso o LAA deverá realizar todos os ensaios previstos na monografia e emitir um certificado de análise, sendo o teor obtido no ensaio de doseamento o valor de pureza adotado para o padrão de trabalho;

Obs.: Caso a monografia não esteja disponível na última edição da Farmacopéia Brasileira, utilizar preferencialmente as edições mais recentes das farmacopéias Européia, Britânica, Americana ou Portarias do INMETRO.

– Não existe monografia farmacopéica

Serão admitidos estudos com substâncias químicas desde que comprovado sua certificação.

1.2.3. Laboratório analítico autorizado (LAA)

LAA são os laboratórios REBLAS e Centros Analíticos de Bioequivalência, desde que apresentem capacidade técnica comprovada para o desenvolvimento da metodologia analítica indicada.

1.3. Metabólitos

No caso de metabólitos, o centro analítico deverá comprovar, através de certificado de análise do fornecedor ou ensaios realizados no próprio centro, que estes apresentam um grau de pureza definido e adequado para ser utilizado como padrão de trabalho.

1.4. Padrões internos

Os padrões internos utilizados devem apresentar grau analítico (p.a.) ou superior, de maneira que não interfiram na análise.

1.5. Armazenamento e manuseio

As SQRs devem ser armazenadas conforme instruções do distribuidor. Normalmente, devem ser armazenadas em local fresco, ao abrigo da luz e com baixa umidade, sempre em frascos bem vedados.

No ato do recebimento deve ser aberta uma cadeia de custódia para cada frasco recebido, na qual se controle o uso da SQR por meio de registro de massa utilizada para cada finalidade, com visto de quem utilizou. Junto à cadeia de custódia devem ser guardados os certificados de análise das substâncias. Deve ser registrado também o fim dado à massa que sobrou da SQR após o vencimento do prazo de validade.

1.6. Reagentes e solventes

Os reagentes e os solventes utilizados nos estudos não devem interferir nos resultados. Isto deve ser verificado através de procedimentos adequados.

Devem ser estabelecidos procedimentos de controle de fornecedores de maneira a assegurar que solventes e reagentes adquiridos tenham a qualidade desejada. Recomenda-se que os fornecedores apresentem certificados analíticos, assim como evidências documentadas para assegurar a confiabilidade dos mesmos.

1.6.1. Estocagem

As áreas de estocagem de substâncias, reagentes, solventes e soluções devem ser adequadas.

1.6.2. Água grau cromatográfico

Deve ter qualidade compatível com o uso em HPLC. Pode ser:

- deionizada
- destilada
- bi-destilada
- ultra-pura

A pureza da água deve ser comprovada através de testes adequados.

1.7. Vidraria

A medida precisa de volume é tão importante em muitos métodos analíticos como é a medida de massa. Para tanto, é preciso considerar alguns pontos imprescindíveis para a medição exata de um determinado volume como manutenção dos instrumentos de medição, qualidade dos instrumentos e calibração periódica.

As marcas de volume são feitas pelos fabricantes com os equipamentos volumétricos bem limpos. Um nível de limpeza análogo deve ser mantido no laboratório se estas marcas forem usadas com confiança. Somente superfícies de vidro limpas sustentam um filme uniforme de líquido. Poeira ou óleo rompe este filme. Portanto, a existência de rupturas no filme é uma indicação de uma superfície “suja”.

O volume ocupado por dada massa de líquido varia com a temperatura, assim como varia também o recipiente no qual está colocado o líquido, durante a medida. Entretanto, a maioria dos equipamentos de medida de volume é feita de vidro, o qual felizmente tem pequeno coeficiente de expansão. Conseqüentemente, as variações no volume em função da temperatura de um recipiente de vidro não precisam ser consideradas em trabalhos em química analítica. As medidas volumétricas devem

tomar como referência alguma temperatura padrão; este ponto de referência é geralmente 20°C. O coeficiente de expansão para líquidos orgânicos pode requerer correções para diferenças de temperatura de 1°C ou até menos, o que torna extremamente importante o controle de temperatura ambiente dos laboratórios.

De uma maneira geral, os procedimentos analíticos são conduzidos a uma temperatura que varia entre 15 e 25°C. (British Pharmacopoeia, 2000)

A vidraria volumétrica pode ser calibrada individualmente pelo INMETRO, ou laboratório certificado pelo INMETRO. Porém, vidraria “Classe A” satisfaz os padrões internacionais estabelecidos pela International Organisation for Standardization. (British Pharmacopoeia, 2000; GARFIELD, 1997; USP 25)

O laboratório deve verificar periodicamente os volumes dispensados pela vidraria volumétrica, utilizando para isso a massa da água. Para as pipetas, deve ser observado o tempo de escoamento, normalmente impresso no vidro e, ao final, tocar a parede do recipiente para onde está sendo transferido o volume com a ponta da mesma para escoar todo o conteúdo. (USP 2002)

A exatidão da vidraria “Classe A” é a seguinte:

BALÕES VOLUMÉTRICOS							
volume indicado, mL	10	25	50	100	250	500	1000
limite de erro, mL	0,02	0,03	0,05	0,08	0,12	0,15	0,30
limite de erro, %	0,20	0,12	0,10	0,08	0,05	0,03	0,03

PIPETAS VOLUMÉTRICAS							
volume indicado, mL	1	2	5	10	25	50	100
limite de erro, mL	0,006	0,006	0,01	0,02	0,03	0,05	0,08
limite de erro, %	0,60	0,30	0,20	0,20	0,12	0,10	0,08

BURETAS			
volume indicado, mL	10 (micro)	25	50
limite de erro, mL	0,02	0,10	0,10
limite de erro, %	0,02	0,03	0,05

1.8. Balanças

Balanças (de acordo com Port. 236, de 22 de dez de 1994, do Inmetro)

Pesos padrão (de acordo com Port. 233, de 22 de dez de 1994, do Inmetro)

1.8.1. Instalação

As balanças analíticas devem estar instaladas em local adequado, niveladas, livres de correntes de ar, em bancada exclusiva para as mesmas e estável. Sempre que possível em sala com temperatura controlada.

1.8.2. Manutenção e conservação

A balança deve ser imediatamente limpa após cada uso. Deve haver um programa de manutenção e conservação da balança, que inclua calibrações periódicas (no mínimo, anualmente), com todas as informações registradas em um livro de registros.

Para as balanças analíticas utilizadas em laboratório (Classe I), o valor da divisão real de verificação (d) deve ser de 0,1 mg ou inferior. (Port. 236, de 22 de dez de 1994, do Inmetro)

A carga mínima (min) da balança não deve ser inferior a $100 \times d$.

Ex.: Balança analítica com capacidade para 200 g e sensibilidade de 0,1 mg.

$$\text{min} = 100 \times 0,1 = 10,0 \text{ mg}$$

Porém, de acordo com a USP 25 (2002), a incerteza da pesagem (erro sistemático + randômico) não deve ser superior a 0,1% da massa pesada.

No caso de balanças eletrônicas que não possuam sistema de auto-calibração, a aferição deve ser feita diariamente, no início do trabalho, e os registros adequadamente armazenados. Os pesos utilizados devem ser recertificados anualmente.

1.9. Equipamentos com temperatura controlada

Refrigerador e freezer deverão ter suas temperaturas verificadas diariamente e registradas no livro de uso. Deve haver um termômetro de máxima e mínima, sendo que a temperatura máxima e mínima do período deverá ser anotada. O local mais adequado para colocar os termômetros é na parte central interna do equipamento. Caso a leitura da temperatura seja feita por pares térmicos, estes devem ser calibrados anualmente junto a RBC. Deve haver um POP para refrigerador/freezer descrevendo uso, manutenção, limpeza e descontaminação.

Em caso de equipamentos que façam registros automáticos de temperatura, estes devem permitir uma verificação diária da temperatura e os dados impressos ou anotados serão armazenados para controle.

1.10. Tubos de amostragem e análise

Podem ser de polipropileno ou polietileno de alta densidade e não devem ser reaproveitados. Deve-se evitar o uso de tubos de vidro, que podem quebrar durante o armazenamento ou transporte. Ao trocar fornecedor e/ou tipo de material, realizar teste de recuperação e branco para verificar se não existe interferência do material no resultado das análises.

2. MÉTODO BIOANALÍTICO

2.1. Introdução

A realização de uma pesquisa bibliográfica é a primeira etapa para a busca do método bioanalítico. Uma vez existindo o método, ele deverá ser testado quanto a sua reprodutibilidade. Na inexistência de um método bioanalítico para um determinado fármaco, o centro analítico deve desenvolver um método que responda satisfatoriamente ao estudo desejado.

A realização prévia das etapas necessárias no desenvolvimento do método analítico para os estudos de bioequivalência assegura ao centro analítico e ao seu contratante que os serviços contratados serão realizados no tempo previsto e com a confiabilidade necessária dos resultados, os quais serão avaliados para fins de registro do medicamento em estudo. Neste contexto pode-se afirmar que contratado e contratante não perderão tempo e nem recursos financeiros adicionais se por acaso os estudos realizados forem rejeitados no seu término em função da inadequabilidade do método utilizado e das condições de armazenamento não determinadas.

2.2. Pré-validação

Os estudos de bioequivalência empregam a utilização de voluntários humanos, em número relativamente elevado, que não podem ser envolvidos no estudo sem a certeza de que os seus sacrifícios resultem num benefício para a sociedade. A certeza desses resultados para os voluntários só pode ser garantida se o método analítico para realização do estudo tiver sido desenvolvido previamente de forma a assegurar que os fluídos biológicos obtidos dos voluntários serão devidamente analisados.

No desenvolvimento de um método é necessário verificar toda a metodologia de preparação da amostra, a qual envolve os processos de extração, separação, purificação, identificação e quantificação do fármaco na matriz biológica. Para tanto, alguns estudos preliminares de validação devem ser efetuados visando à determinação dos seguintes parâmetros: (3) exatidão, precisão e recuperação; (2) linearidade e limites de quantificação; (1) seletividade.

2.2.1. Exatidão, precisão e recuperação

A exatidão de um método analítico descreve a proximidade dos resultados médios obtidos pelo método em relação ao valor verdadeiro (concentração) do fármaco. A exatidão é determinada pela análise de amostras em replicata, contendo quantidades conhecidas do analito. A exatidão deve ser medida usando um mínimo de 5 determinações por concentração.

A precisão de um método analítico descreve a proximidade entre as diferentes medidas individuais de um fármaco. O parâmetro de repetitividade da precisão é obtido quando as amostras são preparadas nas mesmas condições de manuseio: lote, operador, equipamento, instrumento e ocasião.

Quando as amostras são preparadas com diferentes condições de manuseio, o parâmetro da precisão medida é a reprodutibilidade. No desenvolvimento do método, a precisão deve ser medida usando um mínimo de 03 concentrações com 5 repetições.

A recuperação de um fármaco de uma matriz biológica é a quantidade do analito obtida após o processo de separação. A quantificação é comparada com a concentração nominal de um padrão adicionada à matriz biológica antes do processo de separação. A recuperação indica a eficiência de todos os processos envolvidos no método analítico e deve ser tratada dentro de um limite de variabilidade. A recuperação de um fármaco não necessita ser de 100%, mas deve ser consistente, precisa e reprodutível. Quanto mais próxima de 100% for a recuperação, melhor o método analítico.

2.2.2. Linearidade e limites de quantificação

O método analítico em desenvolvimento deve atender aos requisitos de sensibilidade e detectabilidade planejados para o fármaco em função das suas concentrações plasmáticas na curva farmacocinética. Dessa forma é necessário determinar a relação concentração do fármaco versus resposta do detector, visando a determinação da faixa de concentração onde a resposta é linear e os respectivos limites de quantificação.

2.2.3. Especificidade/seletividade

Especificidade é a busca individualizada do sinal de uma espécie única do analito.

Seletividade é a capacidade de um método analítico de diferenciar e quantificar o analito na presença de outros compostos na amostra, denominados de interferentes.

Os interferentes em fluidos biológicos podem ser originários das fontes endo/exógenas.

Interferentes endógenos: são os metabólitos e/ou precursores; produtos de degradação do fármaco; co-administração de fármacos, vitaminas e/ou seus metabólitos, produtos de interação de fármaco, componente biológico e outras substâncias que ocorrem naturalmente em fluidos biológicos, isto é, hormônios, proteínas, lipídios, substâncias dietéticas, etc.

Interferentes exógenos: impurezas dos reagentes usados, substâncias liberadas pelos recipientes em uso ou resultantes de lavagem inadequadas de vidrarias, equipamentos e instrumentos.

Os níveis de interferentes devem ser avaliados antes de iniciar o desenvolvimento do método. Uma vez que o método esteja no estágio de validação, o teste de seletividade deve assegurar níveis e reprodutibilidade dos interferentes e o seu impacto na precisão e exatidão do método em relação ao limite de quantificação.

Uma vez que os interferentes tenham sido definidos e minimizados durante o desenvolvimento do método nos estudos preliminares com a matriz biológica, deve-se, então, planejar um estudo para melhorar a avaliação estatística da extensão dos interferentes das matrizes biológicas nos diferentes

voluntários. Na prática, interferência no estudo de pré-dose das amostras é um dos problemas mais comumente observados com os métodos analíticos validados, uma vez que eles são colocados em rotina. Isto surge da avaliação de um número insuficiente de voluntários durante a validação.

Pela conferência de Washington recomenda-se uma avaliação em de 6 voluntários [35].

2.3. Estabilidade dos fármacos em fluidos biológicos

2.3.1. Introdução

O desenvolvimento do método é a etapa mais importante nos estudos analíticos da bioequivalência, visto que o comportamento dos fármacos nas matrizes biológicas depende dos níveis de interferentes que interagem com a molécula ativa. Um outro aspecto a ressaltar é a mudança dos constituintes da matriz biológica submetida a processo de estocagem levando em consideração o tempo e a temperatura. Assim sendo, produtos de degradação, complexação, oxidação, metabólitos e outras substâncias alteram a resposta de um método se o mesmo não for suficientemente seletivo para os estudos com matrizes biológicas frescas e envelhecidas.

Os estudos prévios de estabilidade em matrizes biológicas são essenciais para fornecer os parâmetros de adequabilidade do método em amostras envelhecidas e condições de armazenamento das amostras para os estudos analíticos da bioequivalência. Tais estudos permitem a confiabilidade necessária ao método, pois os resultados a serem fornecidos não correrão risco de serem rejeitados por erros de metodologia, quando a amostra é submetida a processo de envelhecimento. Por outro lado o armazenamento da amostra em uma dada temperatura por um tempo determinado deve ser baseado em dados científicos que possam afirmar que naquelas condições de estocagem o fármaco não sofrerá alteração.

2.3.2. Revisão da literatura

A estabilidade de fármacos em fluidos biológicos é uma função do tempo e da temperatura de estocagem, da temperatura de estocagem, das propriedades químicas do fármaco, matriz e recipiente. A estabilidade de um analito numa matriz particular e recipiente é relevante apenas para aquela matriz e recipiente e não deve ser extrapolada para outros tipos de matrizes e recipientes. Os procedimentos de estabilidade devem avaliar a estabilidade do fármaco durante a coleta e manuseio da amostra, após estocagem de longa duração (congelamento na temperatura de estocagem pretendida), estocagem de curta duração (temperatura ambiente), após ciclos de congelamento e descongelamento e processo analítico. As condições usadas nos experimentos de estabilidade devem ser previamente estabelecidas. O procedimento deve também incluir uma avaliação da estabilidade do analito na solução estoque.

Naturalmente, deve-se evitar que os ensaios em HPLC sejam afetados por soluções reagentes não estáveis e/ou uma possível instabilidade da solução pronta para ser injetada. O último experimento

de estabilidade deve ser realizado antes dos estudos de validação para que se possa levar em consideração todos os parâmetros advindos da reatividade fármaco/matriz [1].

A estabilidade do analito é sempre crítica nas matrizes biológicas durante um curto período de tempo. Degradação não é rara, mesmo quando todas as precauções são tomadas para evitar especificamente problemas de estabilidade do analito (ex: proteção a luz). É importante verificar se há degradação relevante entre o tempo de coleta da amostra e sua análise para que o resultado do estudo não seja comprometido.

Hartmann *et al.* [1] reconhecem que a estabilidade do fármaco na matriz biológica deve ser parte integrante do processo de validação, embora aponte a escassez de diretrizes para os estudos de estabilidade. Diante desta situação, ele recomenda que o estudo de estabilidade deve envolver, no mínimo:

- a. A investigação da estabilidade do fármaco na matriz em temperatura ambiente (ou seja, a estabilidade do fármaco antes do processo de análise de uma amostra). Este estudo tem por finalidade decidir se a adição de um estabilizante é necessária durante o processo de coleta das amostras.
- b. A estabilidade do fármaco na solução final de extração durante um período estimado para o tempo máximo de análise, o que para injeção automática varia de 24 à 48 horas.
- c. A estabilidade do fármaco durante 3 (ou mais) ciclos de congelamento-descongelamento (um ciclo sendo entendido como, por exemplo, descongelar a amostra, deixá-la em temperatura ambiente por 1 hora e congelá-la por pelo menos 24 horas).
- d. O estudo de estabilidade de longa duração do fármaco em amostras congeladas.

Com relação a detalhes específicos do estudo de estabilidade os seguintes pontos são recomendados por Hartmann:

- O número de valores de concentração do fármaco para os quais a estabilidade deve ser investigada dependerá da faixa de concentração do método (dynamic range), mas em todos os casos deve incluir pelo menos o valor mínimo e o máximo.
- Para compatibilizar a qualidade dos dados obtidos com a carga de trabalho necessária, recomenda-se avaliar a estabilidade das amostras apenas para o tempo máximo que as amostras serão armazenadas e apenas após o último ciclo de congelamento-descongelamento a que as amostras serão submetidas. Nos casos onde o armazenamento se dará por períodos de seis meses ou maiores, recomenda-se incluir um ponto intermediário (por exemplo 3 meses) para que a estabilidade seja garantida pelo menos por este tempo.
- O número de replicadas deve ser determinado, mas um número mínimo de 5 replicadas parece ser suficiente na maioria dos casos.

2.3.3. Cinética de degradação

O estudo da estabilidade de fármaco é necessário para determinar o tempo de vida para degradar um percentual da sua concentração original, geralmente 10%, em determinadas condições de armazenamento.

O termo estabilidade química de um fármaco é definido como a manutenção das características de identidade, concentração e pureza da sua forma íntegra durante um período de tempo e condições pré-determinados.

Os estudos cinéticos determinantes da estabilidade podem ser efetuados por curta duração e longa duração. Os estudos de longa duração, realizados nas condições de armazenamento, geralmente demandam um tempo relativamente longo. Todavia na prática é necessário usar das equações cinéticas para abreviar este tempo e possibilitar uma maior rapidez nos resultados preliminares. No entanto, o resultado de estabilidade de longa duração deverá ser apresentado conforme preconizado na legislação vigente.

As reações químicas e/ou físicas de degradação do fármaco envolvem modelos cinéticos que utilizam as equações de Arrhenius para determinação das constantes de velocidade de reação e do tempo de vida útil. Estes modelos são classificados em: ordem zero, primeira ordem e segunda ordem.

Cinética de ordem zero

As reações de ordem zero aparecem em sistemas heterogêneos quando a superfície da fase sólida está saturada com algum reagente, mas podem ocorrer também em sistemas homogêneos. A constante de velocidade de reação pode ser determinada pela seguinte equação:

$$[F_f] = [F_i] - k_0 \cdot t$$

onde $[F_i]$ é a concentração do fármaco inicial, $[F_f]$ é a concentração do fármaco no tempo t em segundos, k_0 é a constante de velocidade de reação de ordem zero e t é o tempo em segundos decorrido para degradação de um determinado percentual do fármaco.

Cinética de primeira ordem

O modelo matemático de um processo cinético de primeira ordem corresponde ao consumo do fármaco na reação de forma proporcional à concentração do mesmo, presente no meio e do número de interações fármaco componentes do meio. Desta forma, a equação pode ser expressa:

$$\ln [F_f] = -k_1 \cdot t + \ln [F_i]$$

onde k_1 é a constante de velocidade de reação de primeira ordem, \ln = logaritmo neperiano.

Cinética de segunda ordem

Neste modelo cinético, a fração de degradação do fármaco não é uma constante, mas varia com a concentração do fármaco. Como a concentração do fármaco diminui com o tempo, a fração de degradação também diminui com o tempo. Assim sendo, podemos expressar matematicamente este modelo pela equação abaixo:

$$1 / [F_t] = k_2 \cdot t + 1 / [F_0]$$

onde k_2 é a constante de velocidade de reação de segunda ordem.

Uma vez definido o modelo cinético de reação para um determinado fármaco, pode-se utilizar as concentrações do fármaco nos diferentes dias de um estudo de estabilidade de média duração nas condições isotérmicas estudadas para calcular as constantes de velocidade de reação nos vários dias. A constante de velocidade de reação do fármaco será calculada por ponderação dos valores obtidos para cada tempo, conforme equação abaixo descrita:

$$k_m = \frac{k_1 \cdot 1 + k_2 \cdot 2 + k_4 \cdot 4 + k_8 \cdot 8 + k_{16} \cdot 16}{1 + 2 + 4 + 8 + 16}$$

A obtenção de k_m permite calcular o tempo de vida do fármaco naquela condição de armazenamento utilizando equações apropriadas, conforme modelo cinético de ordem zero, primeira ordem e segunda ordem.

Considerando-se um percentual de 10% de degradação do fármaco como sendo o máximo permitido, teremos as seguintes equações:

Ordem zero

$$t_m = \frac{[F_0] - [F_{90}]}{k_0}$$

onde $[F_0]$ é a concentração do fármaco inicial, $[F_{90}]$ é a concentração do fármaco correspondente a 90% da concentração inicial, t_m é o tempo de armazenamento da amostra para atingir a concentração de 90% do fármaco.

Primeira ordem

$$t_m = \frac{\ln[F_i] - \ln[F_{90}]}{k_1} \cdot 2,303$$

Segunda ordem

$$t_m = \frac{[F_i] - [F_{90}]}{[F_i] \cdot [F_{90}] \cdot k_2}$$

Simulação de dois exemplos de fármacos com instabilidades diferentes, exemplo captopril e ranitidina. Suponhamos que as análises nos 16 dias dos plasmas estocados a -20°C dêem os seguintes resultados, conforme tabela abaixo:

FÁRMACO	CONCENTAÇÃO DO FÁRMACO (ng/mL)					
	DIAS					
	Zero	01	02	04	08	16
Captopril	600	595	590	582	574	560
Ranitidina	1000	998	997	996	994	992

Os dados serão tratados para determinação do modelo cinético da ordem de reação zero, primeira ordem e segunda ordem, calculando-se o coeficiente de correlação para os pares de dados acima:

Ordem zero = massa versus tempo

Primeira ordem = Log massa versus tempo

Segunda ordem = 1 / massa versus tempo

Obs.: É importante esclarecer que o valor da massa utilizado é a fração residual.

Operacional

- 1 - A ordem de reação selecionada será aquela que apresentar o maior coeficiente de correlação.
- 2 - Os valores acima para uma reação com cinética de ordem zero apresentam as seguintes constantes de correlação e tempo de meia vida para um nível de degradação de 10% dos dois fármacos, utilizando as equações acima descritas.
- 3 - Sendo a reação de ordem zero, utilize da equação correspondente para determinar as cinco constantes (de k1 a k16).

$$[F_t] = [F_i] - k \cdot t$$

k = k1, k2, k4, k8, k16

4 - Com as constantes determinadas, calcule a constante do fármaco, k_m por meio da média ponderada de acordo com a equação estabelecida.

$$k_m = \frac{k_1 \cdot 1 + k_2 \cdot 2 + k_4 \cdot 4 + k_8 \cdot 8 + k_{16} \cdot 16}{1 + 2 + 4 + 8 + 16}$$

5 - Com o valor da k_m , determine o tempo estimado de estabilidade do produto (t_m) em dias.

$$t_m = \frac{[F_i] - [F_{90}]}{k_m}$$

Obs: Caso numa das concentrações estudadas o valor seja menor que 90% da concentração inicial, utilize, para o cálculo da estabilidade teórica, o valor da concentração anterior da mesma série, ou seja, igual ou maior que 90%.

FÁRMACO	k_m	t_{90} (dias)
Captopril	$3,69 \times 10^{-5}$	18,82
Ranitidina	$0,86 \times 10^{-5}$	134,58

Portanto, os resultados simulados mostram que as amostras devem ser armazenadas na temperatura de -20°C e analisadas até o máximo de 18,82 e 134,59 dias, respectivamente, para captopril e ranitidina.

2.3.4. Problemas analíticos relacionados à estabilidade

A aplicação de métodos cromatográficos com vários detectores na análise quantitativa de fármacos e compostos relacionados em amostras biológicas têm gerado um imenso número de trabalhos na literatura. Todavia, quando se necessita reproduzir uma metodologia para ser usada na rotina verifica-se, em muitos casos, uma baixa reprodutibilidade nos dados de exatidão e recuperação. Tal fato foi discutido por Causson [36] que sugeriu um maior rigor por parte dos *referees* ao aceitar a publicação de métodos bioanalíticos para quantificação de fármacos em amostras biológicas sem os parâmetros de validação minimamente consistentes.

Geralmente, os estudos de validação de métodos bioanalíticos são realizados em plasma vencido (envelhecido), o qual é contaminado com o fármaco em estudo e os parâmetros de validação são estudados. Dependendo da estabilidade do fármaco no fluido biológico e das substâncias endógenas dos indivíduos, algumas alterações na matriz biológica podem acontecer e afetar a eficiência do método.

Visando uma maior segurança do método bioanalítico para um determinado fármaco, sobretudo os mais instáveis, é sugerido na fase de pré-estudo uma validação mais rigorosa dos estudos de estabilidade, conforme itens abaixo mencionados:

- Verificar o comportamento do fármaco no solvente em relação aos parâmetros de precisão, exatidão e linearidade;
- Verificar a estabilidade do fármaco no solvente ao longo do tempo, mínimo de 05 tempos, durante 48 horas;
- Determinar os parâmetros de precisão, exatidão e linearidade do fármaco nos fluidos biológicos frescos;
- Contaminar o plasma com pelo menos 03 níveis de concentração do fármaco e determinar as suas concentrações no tempo zero, 6, 12, 24, 48, 96 horas, 7, 14, 30 e 60 dias nas soluções estocadas nas temperaturas de 25°, 4° e – 20°C ou eventualmente – 70°C;
- Determinar os parâmetros de precisão, exatidão e recuperação das amostras submetidas aos estudos de estabilidade;
- Comparar as diferenças percentuais entre o tempo zero e os demais tempos;
- Inferir as condições de armazenamento baseadas nos estudos de estabilidade.

2.4. Armazenamento das amostras

As condições de armazenamento relativas à temperatura e ao tempo são determinadas pelos estudos de estabilidade de longa duração no desenvolvimento do método.

As amostras para armazenamento devem ser embaladas em sacos plásticos, resistentes a baixas temperaturas e distribuídas por voluntário e agrupadas num mesmo estudo.

Obs: É importante que as amostras da duplicata (retém) sejam armazenadas em sacos diferentes das amostras a serem analisadas.

Controlar a temperatura de armazenamento com dispositivo de controle de temperatura ou termômetro de mínima e máxima e registrado diariamente.

2.5. Validação do método

2.5.1. Introdução

O roteiro que se segue é uma recomendação para a padronização da rotina de validação de metodologias analíticas, para a aplicação na etapa analítica dos processos de bioequivalência, que utilizam-se de material biológico como sangue, soro, plasma ou urina. A metodologia a ser empregada pressupõe a existência da melhor condição analítica, devendo levar em consideração os parâmetros obtidos dos estudos de estabilidade.

As informações contidas neste roteiro estão voltadas para a área instrumental. O instrumental considerado é: Cromatografia em Fase Gasosa (CFG e CG/EM), Cromatografia em Fase Líquida (CL, CL/EM ou CL/EM/EM), ou outros adequados ao que aqui se propõe.

As recomendações podem ser adaptadas ou modificadas, dependendo do método analítico usado. Na etapa da validação, a matriz de trabalho deve ser preferencialmente a mesma matriz objeto do estudo. No caso de disponibilidade limitada pode-se utilizar plasma proveniente de bolsa de sangue vencido na etapa de desenvolvimento do método, atentando sempre para os efeitos de matriz. Na etapa de validação deve-se trabalhar com o plasma obtido a partir de sangue recém coletado.

Não pode deixar de ser considerada, para a validação da metodologia, a estabilidade do fármaco em uma matriz biológica a qual é uma função das condições de armazenamento, propriedades químicas da droga, da matriz e do sistema de acondicionamento. A estabilidade de um analito em uma matriz particular e sistema de acondicionamento é relevante apenas para aquele caso e não deve ser extrapolada a outras matrizes e sistemas de acondicionamento. Procedimentos de estabilidade devem avaliar a estabilidade do analito durante a coleta e manuseio de amostras, após longa armazenagem (congelada à temperatura adequada), curta armazenagem (bancada na temperatura ambiente) e após a ocorrência de ciclos de congelamento/descongelamento e pós-preparo. Para a aplicação deste roteiro, consideram-se os seguintes tipos de validação:

a. Validação Total

Validação total é importante no desenvolvimento e implementação de um método quando aplicado pela primeira vez ou quando for utilizado para quantificar um novo analito nesta mesma condição analítica.

b. Validação Parcial

Validações parciais são modificações do método já validado. Uma validação parcial pode compreender desde uma pequena determinação de precisão/exatidão a até quase uma validação total. Algumas mudanças típicas no método se enquadram nesta categoria, mas não são limitadas a:

- Transferências de método bioanalítico entre laboratórios ou analistas;
- Mudança na metodologia analítica (ex. mudança no sistema de detecção);
- Mudança no anticoagulante na coleta do fluido biológico;
- Mudança no processamento das amostras;
- Mudança relevante na faixa de concentração;
- Mudanças nos instrumentos e/ou software;
- Volume de amostra limitado (ex. estudo pediátrico);
- Demonstração seletiva de um analito na presença de medicações concomitantes.

2.5.2. Método bioanalítico

A fase de desenvolvimento e estabelecimento do método define o ensaio bioanalítico. Os parâmetros fundamentais para a validação de um método são: exatidão, precisão (repetitividade e reprodutividade), seletividade, sensibilidade e estabilidade. As medidas de cada analito na matriz biológica devem ser validadas. Além disso, deve-se determinar a estabilidade do analito nas matrizes biológicas nas quais ele foi acrescentado para construção da curva de resposta. O desenvolvimento e estabelecimento de um método bioanalítico típico inclui a determinação:

- (1) Seletividade;
- (2) Recuperação;
- (3) Estabilidade de curta duração;
- (4) Limite de quantificação e detecção;
- (5) Linearidade;
- (6) Exatidão, precisão;
- (7) Estabilidade de longa duração.

2.5.3. Ferramentas para a validação

1 - Equações estatísticas

a) estimativa da variância

$$S^2 = \frac{\sum (xi - x)^2}{n - 1}$$

b) estimativa do desvio padrão

$$s = \sqrt{\frac{\sum (xi - x)^2}{n - 1}}$$

c) Coeficiente de Variação

$$CV = \frac{s.100}{X}$$

2 - Testes de rejeição

Teste Q

Rejeita valores com base na amplitude das medidas. Para a aplicação do Teste Q utiliza-se da amplitude ou faixa:

- 1 - colocar os valores obtidos em ordem crescente.
- 2 - determinar a diferença existente entre o maior e o menor valor da série (faixa).
- 3 - determinar a diferença entre o menor valor da série e o resultado mais próximo (em módulo).
- 4 - dividir esta diferença (em módulo) pela faixa, obtendo um valor Q (comparar com tabela).

NÚMERO DE RESULTADOS (n)	Q 95%
2	----
3	0,97
4	0,83
5	0,71
6	0,62
7	0,57
8	0,52
9	0,49
10	0,46

- 5 - se $Q > Q\%$ o menor valor é rejeitado e se $Q < Q\%$ o maior valor, por enquanto, é aprovado.
- 6 - se o menor valor for rejeitado, determinar a nova faixa e testar o maior valor da série (caso o menor valor não tenha sido rejeitado, utilizando-se da mesma faixa testar o maior valor da série).
- 7 - repetir o processo até que o menor e o maior valores sejam aceitos, ou seja, se o menor valor é aceito, então o maior valor é testado e o processo é repetido até que o maior e o menor valores sejam aceitos.

Teste de Grubbs

Rejeita valores em relação à estimativa do desvio padrão. Este teste, como no teste Q, observa valores dispersos anômalos maiores ou menores que aparecem no grupo de medidas.

Para a aplicação do Teste de Grubbs utiliza-se da amplitude em relação a média :

- 1 - colocar os valores obtidos em ordem crescente.
- 2 - determinar a média aritmética.
- 3 - determinar a amplitude do maior (maior valor - média).
- 4 - testar o **maior** valor do conjunto, segundo a equação:

$$G = \frac{(x_{maior} - \bar{x})}{s} \quad s = \text{estimativa do desvio padrão}$$

- 5 - testar o menor valor do conjunto, segundo a equação:

$$G = \frac{(\bar{x} - x_{menor})}{s}$$

- 6 - Compare os valores de G (teste de Grubbs) com os valores críticos a 95 % de confiança.

NÚMERO DE RESULTADOS (n)	G 95%
3	1,155
4	1,481
5	1,715
6	1,887
7	2,020
8	2,126
9	2,215
10	2,290

- 7 - se $G > G \%$ o maior valor é rejeitado e se $G < G \%$ o maior valor, por enquanto, é aprovado.
- 8 - se o maior valor for rejeitado, determinar a nova amplitude e testar o menor valor da série (caso o maior valor não tenha sido rejeitado, utilizando-se da mesma faixa testar o menor valor da série).
- 9 - repetir o processo até que o menor e o maior valores sejam aceitos, ou seja, se o menor valor é aceito, então, o maior valor é testado e o processo é repetido até que o maior e o menor valores sejam aceitos.

3 - Determinação do Limite de Quantificação (LQ)

Como sugestão, determinar o LQ por diluição aceitando o valor mais confiável dentro da melhor condição analítica. Normalmente atribui-se variação máxima, em CV de 20% ao LQ.

4 - Estimativa de CV em função da concentração a analisar, segundo Horvitz:

$$CV (\%) = 2^{(1 - 0,5 \log C)}$$

onde: CV = Coeficiente de Variação C = g de constituinte/g de amostra

2.5.4. Glossário

AMOSTRA: é um termo genérico que engloba controles, brancos, amostras processadas e desconhecidas, tal como descrito abaixo:

Branco: é uma amostra de matriz biológica na qual nenhum analito foi adicionado e é utilizada para nortear a seletividade e especificidade do método analítico.

Amostra de Controle de Qualidade: é uma amostra das matriz biológica ao qual o analito foi adicionado, usada para monitorar o desempenho do método e nortear a integridade e validade dos resultados, das amostras de concentrações desconhecidas analisadas em uma batelada individual.

Desconhecido: é uma amostra biológica que é objeto de análise.

AMOSTRA PROCESSADA: é o extrato final (anterior a uma análise instrumental) de uma amostra que foi submetida a várias manipulações (ex.: diluição, extração, concentração).

ANALITO: é um composto químico específico que é mensurado o qual pode ser um fármaco intacto, biomolécula ou seu derivado, metabólito e ou produto de degradação em uma matriz biológica.

COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (r): expressa a relação de x a y na curva, onde o valor ideal esperado é 1.

CORRIDA ANALÍTICA OU LOTE: é um conjunto completo de amostras analíticas em estudo com número apropriado de controles para sua monitoração. Uma corrida analítica deve ser completa na mesma condição analítica, respeitando-se a estabilidade do analito.

CURVA DE CALIBRAÇÃO: é utilizada com a finalidade de se obter ou verificar o ajuste ao projeto do sistema. Neste caso é definido pelo fabricante ou instituições que zelem pela qualidade.

CURVA DE RESPOSTA, CURVA DE QUANTIFICAÇÃO, CURVA DE CALIBRAÇÃO ANALÍTICA: é utilizada com a finalidade de se obter comparação analítica para a quantificação. Busca a linearidade dinâmica. Aplica-se na curva de resposta a relação sinal/concentração a fim de verificar linearidade igual à relação direta ou regressão linear.

CURVA PADRÃO: sucessão crescente ou decrescente de pontos obtidos da relação entre a unidade de grandeza da espécie padrão pela sua intensidade de sinal, proveniente do sistema de detecção.

DETECTABILIDADE: é a quantidade em unidade de grandeza ou concentração, percebida em confiabilidade, pelo sistema de detecção do sinal analítico.

EFEITO MATRIZ: são interferências que afetam a resposta do sinal analítico da substância em análise.

ESTABILIDADE: é a estabilidade química de um analito em uma dada matriz dentro de condições específicas e em determinados intervalos de tempos.

FAIXA DE QUANTIFICAÇÃO: é o grau de concentração incluindo : limite superior de quantificação e limite inferior de quantificação que pode ser confiavelmente reproduzido e quantificado com exatidão e precisão, por meio da relação concentração/resposta.

LIMITE DE DETECÇÃO: é a menor concentração de um analito na qual o procedimento bioanalítico pode seguramente diferenciar do ruído de fundo.

LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO: é a menor quantidade de um analito na amostra que pode ser quantitativamente determinada com aceitável precisão e exatidão. Também conhecido como Limite Inferior de Quantificação.

LIMITE SUPERIOR DE QUANTIFICAÇÃO: é a maior quantidade de um analito em uma amostra que pode ser quantitativamente determinada, com precisão e exatidão.

MATRIZ BIOLÓGICA: é um material individualizado de origem biológica que pode ser amostrado e processado de maneira reprodutiva. Exemplos: sangue, soro, plasma, urina, fezes, saliva e outros tecidos.

MÉTODO: é uma descrição compreensível de todos os procedimentos usados em análises de amostras.

PADRÃO DE CALIBRAÇÃO: é uma matriz biológica de concentração conhecida do analito que foi adicionado. Padrões de calibração são usados na construção de curvas de resposta nas quais as concentrações dos padrões de calibração são utilizados para a determinação da concentração do analito.

PADRÃO INTERNO: são compostos testes (exemplo: análogos com estruturas similares, composto estável marcado, etc.) adicionados aos padrões de calibração e amostras em concentrações conhecidas e constantes para facilitar a determinação do analito.

PRECISÃO: é a proximidade da concordância (grau de espalhamento) entre uma série de medidas obtidas de múltiplas amostragens de uma mesma amostra homogênea dentro de condições determinadas.

RECUPERAÇÃO: é a eficiência da extração de um processo analítico reportado como porcentagem da quantidade conhecida do analito conseguido por meio de passos de extração e processamento do método.

REPRODUTIVIDADE (REPRODUTIBILIDADE): é a precisão entre dois laboratórios ou ocasiões e fatos diferentes. Também representa a precisão do método dentro das mesmas condições de operação dentro de um período curto de tempo.

SELETIVIDADE: é a habilidade do método analítico em mensurar e diferenciar os analitos na presença de outros componentes que possam estar presentes. Eles podem ser metabólitos, impurezas, produtos de degradação ou componentes da matriz.

SENSIBILIDADE: é o grau de diferenciação entre duas concentrações próximas.

VALIDAÇÃO:

Total: é o estabelecimento de todos os parâmetros de validação determinados e aplicados à análise do analito na amostra.

Parcial: é a modificação de métodos validados que não necessariamente precisam de revalidação total.

CL: Cromatografia em fase Líquida.

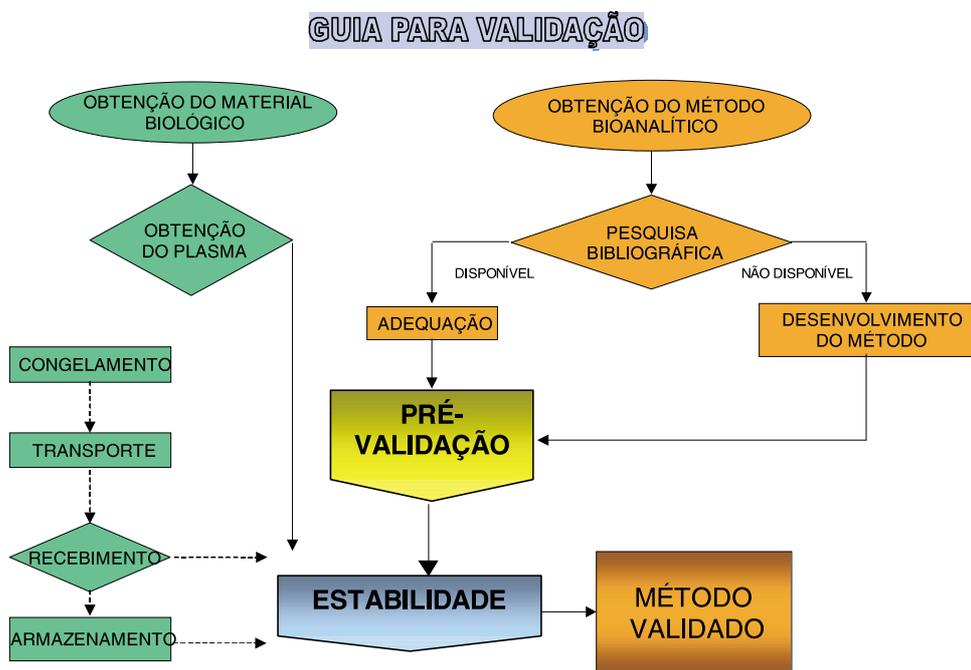
CL/EM: Cromatografia em fase Líquida acoplada à Espectrometria de Massas.

CFG: Cromatografia em Fase Gasosa.

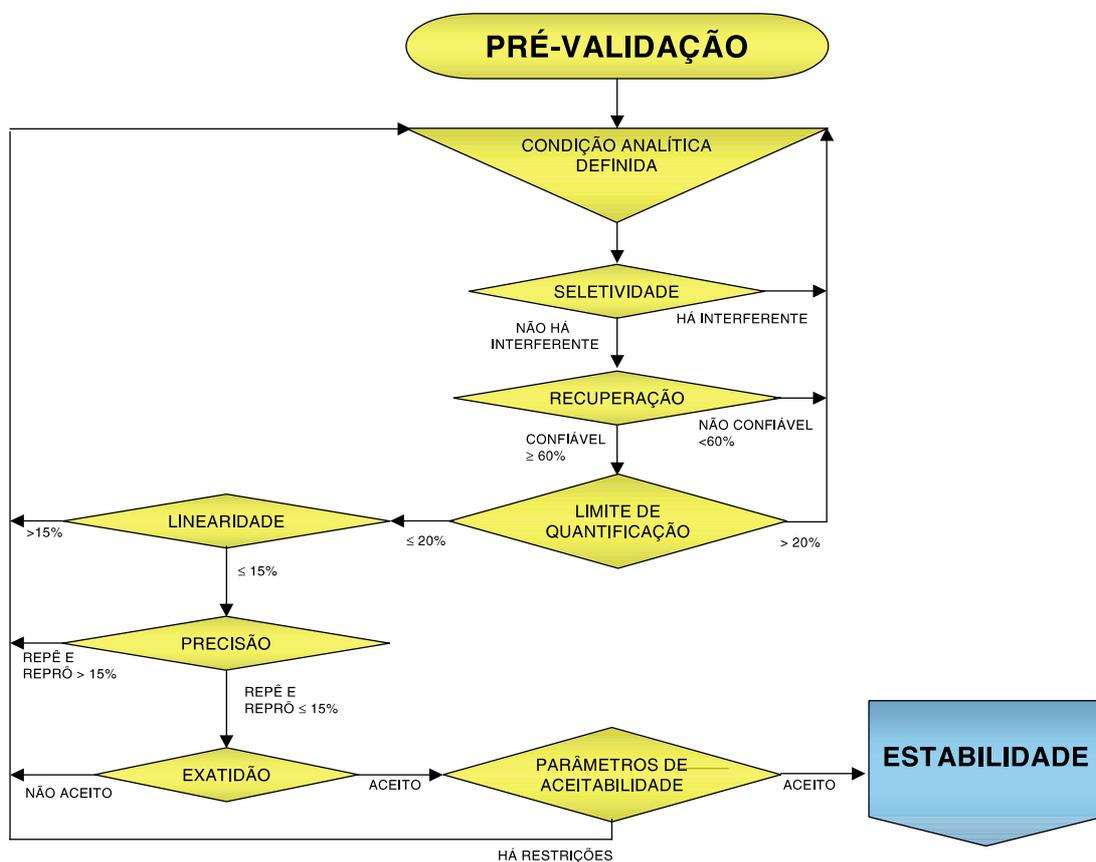
CG/EM Cromatografia em Fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas.

2.6. Fluxograma operacional da etapa analítica da bioequivalência

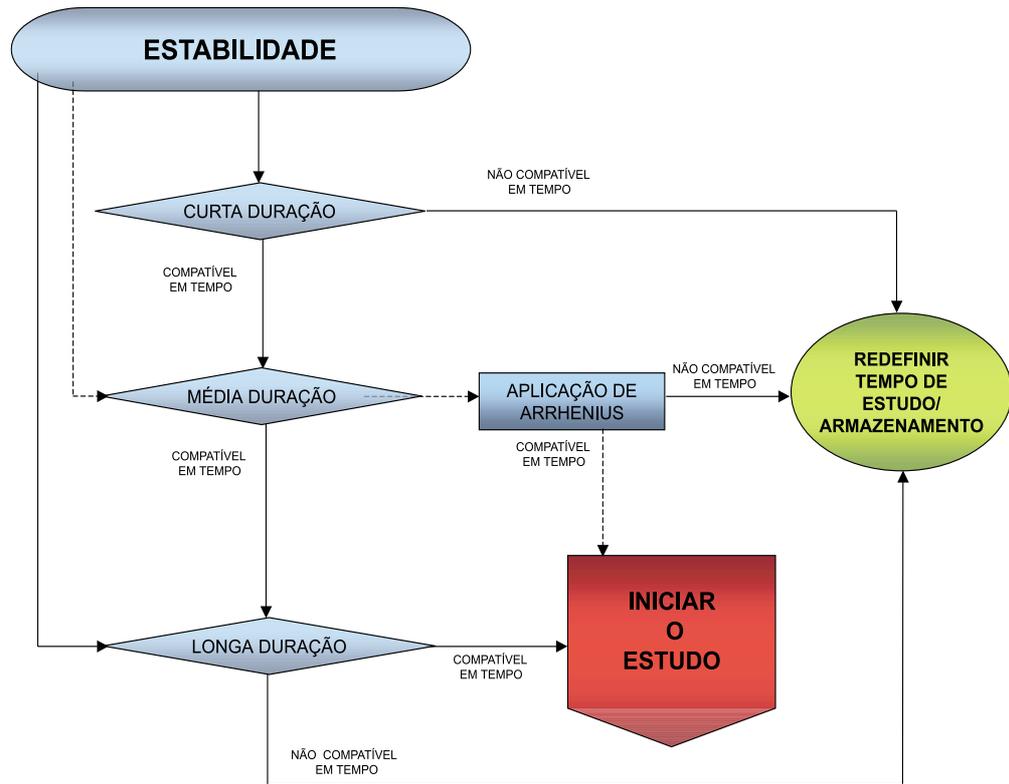
SEQÜÊNCIA 01



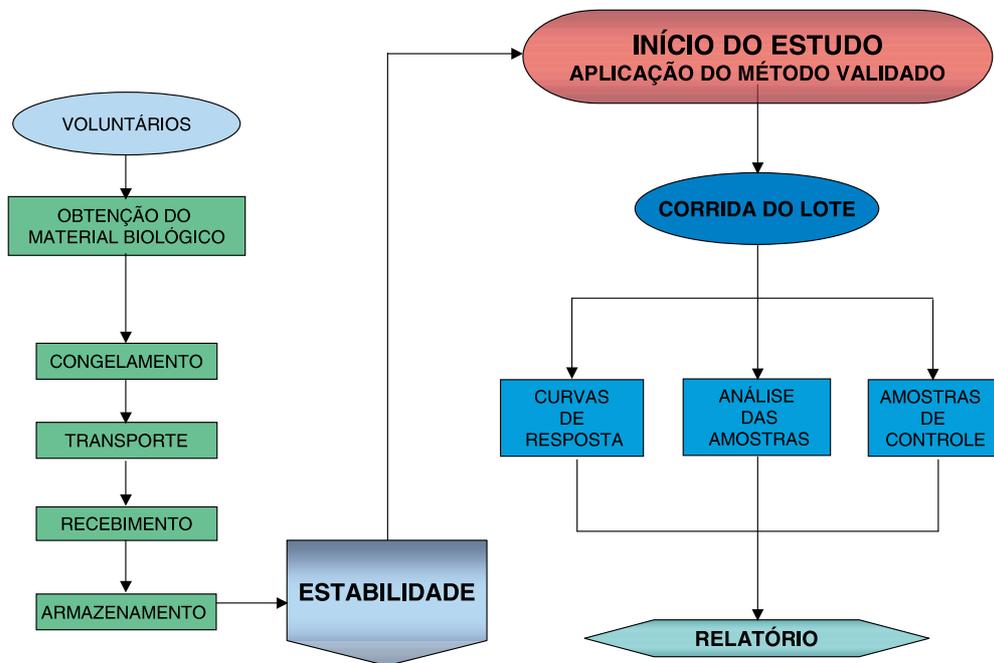
SEQÜÊNCIA 02



SEQÜÊNCIA 03



SEQÜÊNCIA 04



Completada a definição das seqüências que serão adotadas pelo centro e consultadas as respectivas interpretações na Fundamentação teórica e operacional do Guia da Etapa Analítica, atente para o item estabilidade, pois ele definirá o início da internação dos voluntários.

3. RECOMENDAÇÕES PARA A ETAPA ANALÍTICA

3.1. Materiais de referência

3.1.1. Reagentes e solventes

Os reagentes e solventes devem ser rotulados apropriadamente, indicando, no mínimo, procedência, identidade, lote, grau de pureza, prazo de validade (quando aplicável) e instruções específicas de armazenamento.

Para as soluções deve haver POP abrangendo, no mínimo, preparação, rotulagem, prazo de validade, situações de emergência, segurança, manuseio e descarte.

As SQRs (Substâncias Químicas de Referência) devem ser rastreáveis.

3.1.2. Balanças e pesos de calibração

3.1.2.1. Livro de registros ou de uso

Deve conter as seguintes informações: data, registro de verificação diária (caso a balança não realize a auto-calibração), nome do operador e dados sobre a pesagem.

3.1.2.2. POP (Procedimento Operacional Padrão)

Deve conter informações básicas sobre a operação do equipamento, limpeza e manutenção.

3.1.3. Termômetros e outros dispositivos de verificação de temperatura

O laboratório deve possuir pelo menos um termômetro calibrado junto a RBC, anualmente, na faixa de uso. Este servirá para a calibração dos demais termômetros utilizados no laboratório, que serão verificados trimestralmente. Deve haver um POP descrevendo este procedimento.

3.1.4. Peagômetro (pHmetro)

O POP para utilização do aparelho deve conter informações básicas sobre uso, cuidados de manutenção rotineira e não-rotineira, limpeza e armazenamento dos eletrodos. A eficiência dos eletrodos deve ser verificada periodicamente, enquanto que a calibração deverá ser feita antes do uso. Para a calibração, deverão ser utilizadas pelo menos duas soluções tampão, com um pH acima e outro abaixo do valor a ser medido. Todos estes registros deverão ser devidamente registrados no livro de uso do aparelho.

3.1.5. Centrífuga

Deve existir um POP descrevendo o uso correto (balanceamento, capacidade máxima), procedimentos de limpeza e descontaminação. As manutenções, rotineiras ou não, devem estar registradas no livro de uso.

3.1.6. Sistema de evaporação de amostras

Deve existir um POP descrevendo o uso correto, limpeza e manutenção rotineira, que devem ser registradas no livro de uso.

3.1.7. Vidraria

Toda a vidraria deve ser de boa qualidade, estar limpa e adequadamente armazenada, quando não estiver em uso.

A vidraria volumétrica deve ser “classe A” ou então calibrada anualmente.

Deve existir POP para limpeza da vidraria.

Deve haver POP para calibração da vidraria volumétrica, utilizando a massa da água como referência. Esta calibração deverá ser feita periodicamente e os resultados devidamente arquivados.

3.1.8. Pipetas

Para as pipetas automáticas deve haver um POP para a utilização, limpeza e conservação. As verificações de performance e calibrações externas devem estar no livro de registros.

Pipetas mecânicas de volume fixo

Exatidão e precisão usando a massa da água, a cada três meses.

Pipetas de volume variável

Exatidão e precisão usando a massa da água, 02 pontos, 05 vezes, antes do uso.

3.2. Recebimento de amostras

3.2.1. Dar encaminhamento imediato após o recebimento das amostras.

3.2.2. Preencher lista de verificação de recebimento, oriunda da etapa clínica em 03 vias – **ANEXO I**;

3.2.3. Devolver uma via para o pesquisador responsável e outra para o coordenador da etapa clínica, arquivando a terceira nos registros do estudo;

3.2.4. Documentar histórico da temperatura durante o transporte, se for o caso;

3.2.5. Encaminhar comunicação (documentada) à pessoa que enviou as amostras sobre possíveis irregularidades.

3.2.6. Registro de entrada de amostra

3.2.6.1. Livro para registro de entrada de amostras, indexado e etiquetado, com numeração de páginas;

3.2.6.2. O registro de entrada das amostras deve possuir cabeçalho com:

- Número do Estudo;
- Princípio ativo;

- Origem;
- Patrocinador.

3.2.6.3. Todas as amostras agrupadas juntas em uma ou mais páginas do livro.

3.2.6.4. Para cada voluntário anotar:

- Código do voluntário;
- Período de estudo;
- Tempos não recebidos;
- Data de recebimento;
- Anormalidades;
- Visto do responsável.

3.2.7. Descarte de Amostras

3.2.7.1. Em caso de perdas por acidentes:

- Descontaminação do local com solução de hipoclorito;
- Descarte do material biológico em lixeiras apropriadas, recebendo destinação normal de lixo hospitalar;
- Preencher notificação de ocorrência e encaminhamento para o responsável técnico;
- Informar a Comissão de Biossegurança se necessário.

3.2.7.2. O material biológico pós- uso deve ser descartado segundo os procedimentos:

- descontaminação por processos térmicos ou químicos, seguida de descarte como lixo doméstico;
- descarte como lixo biológico através de sistema especializado no tratamento desses resíduos, segundo Consulta Pública Nº 48 de 04 de julho de 2000, DOU 05/07/2000.

3.3. Estudo de estabilidade

A Resolução – RDC Nº 84 – de 19 de março de 2002, estabeleceu quais os tipos de estabilidade em fluidos biológicos que devem ser realizados na fase pré-estudo de bioequivalência visando a validação do método para fins do estudo propriamente dito. Neste sentido, os estudos de estabilidade foram classificados em: curta duração, longa duração e de soluções-padrão.

3.3.1. Estabilidade de curta duração

Congelamento e descongelamento

A estabilidade do analito deve ser determinada após 3 ciclos de congelamento e descongelamento. No mínimo 3 alíquotas a cada concentração (alta e baixa) devendo ser estocado a cada temperatura pretendida por 24 horas e descongelada sem auxílio a temperatura ambiente. Quando completamente descongelada, as amostras devem ser re-congeladas por 12 a 24 horas sob as mesmas condições. Os ciclos de congelamento e descongelamento devem ser repetidos por 3 vezes e analisados no terceiro ciclo. Se um fármaco é instável à temperatura ambiente, por exemplo, as amostras de estabilidade devem ser congeladas a – 20 ou – 70°C durante 3 ciclos de congelamento e descongelamento.

Condições de análise

Três (03) alíquotas de cada concentração (alta e baixa) devem ser descongeladas a temperatura ambiente e deixadas nesta temperatura durante o tempo máximo da análise do lote.

A estabilidade das amostras processadas, incluindo o tempo de residência no auto-injetor, deve ser determinada.

Deve ser demonstrado que os fármacos permanecem intactos se deixados por várias horas à temperatura ambiente na matriz biológica. Certos fármacos, por exemplo, captopril, AAS, etc., sofrem mudanças imediatas, degradação em matrizes biológicas. Em tais casos, aditivos apropriados e/ou agentes derivatizantes podem ser adicionados.

Soluções-padrão

A estabilidade do fármaco e padrão interno devem ser assegurados no tempo necessário para análise de todo o lote das amostras, incluindo possíveis interrupções acidentais.

Dados da literatura ou testes de laboratório devem ser conduzidos para determinar se o fármaco puro ou em mistura com metabólitos e padrão interno dissolvidos num sistema de solvente são estáveis sob as condições de ensaios, especificamente em relação aos fatores físicos, tais como: calor, umidade, luz e exposição ao ar.

A estabilidade da solução estoque, contendo o fármaco e padrão interno, deve ser avaliada à temperatura ambiente por no mínimo 6 horas. Se a solução estoque e padrão interno são refrigeradas ou congeladas por um período relevante, a estabilidade deve ser documentada. Após completar o tempo de estocagem desejado, a estabilidade deve ser testada por comparação com a solução preparada recentemente.

3.3.2. Estabilidade de média duração

A estabilidade de média duração deve ser determinada pelo armazenamento de no mínimo cinco alíquotas de cada concentração (alta, média e baixa) na temperatura de -20°C . As amostras para este estudo devem ser analisadas nos tempo zero, um, dois, quatro, oito e dezesseis dias de armazenamento. Os dados devem ser tratados com a utilização da equação de “Arrhenius” para cálculo da constante de velocidade de reação e do tempo de armazenamento na temperatura estudada. Com os dados de estabilidade obtida e viáveis com o tempo analítico, pode-se iniciar a internação ou o estudo sobre os indivíduos.

3.3.3. Estabilidade de longa duração

O tempo de estocagem num estudo de estabilidade de longa duração deve exceder o tempo entre a data da primeira coleta das amostras e a data da análise da última amostra. A estabilidade de longa duração deve ser determinada pela estocagem de no mínimo 3 alíquotas de cada concentração (alta,

média e baixa) sob as mesmas condições das amostras de estudo. Normalmente, é realizada em 03 temperaturas de estocagem, 4, -20 e -70°C. O volume das amostras deve ser suficiente para as análises no mínimo em 03 tempos diferentes (FDA, 1997). As concentrações médias das determinações de todas as concentrações utilizadas devem ser comparadas com as médias obtidas das análises das amostras recém-preparadas para os estudos de estabilidade de longa duração, ou seja, no tempo zero.

3.4. Validação

3.4.1. Seletividade

Seletividade é a habilidade de um método analítico em diferenciar e quantificar o analito na presença de outros componentes na amostra. Para a seletividade, análises de amostras “branco” da matriz biológica apropriada (plasma, urina ou outra matriz) devem ser obtidas de, pelo menos, seis fontes. Cada amostra branco deve ser testada para interferentes, e a seletividade deve ser assegurada no limite de quantificação.

Substâncias potencialmente interferentes numa matriz biológica incluem componentes endógenos da matriz, metabólitos, produtos de decomposição, e durante o estudo, medicação tomada concomitantemente e outros possíveis interferentes. Se o método for usado para quantificar mais de um analito, cada analito deve ser testado para assegurar que não há interferência.

Para verificar este item, recomenda-se que, para a matriz plasma, sejam utilizadas as seguintes amostras:

- 04 plasmas normais
- 01 plasma lipêmico
- 01 plasma hemolisado

Para verificar a interferência, trabalhar com adição de padrão sobre os plasmas em três concentrações distintas (alta, média e baixa) em triplicata por concentração.

Considerando HPLC ou CFG, desde que interferentes não coeluem com o analito e padrão interno, considera-se seletivo para análise. No caso do LC/MS no qual a distinção pode ser confirmada, será também considerada viável para análise. Havendo coeluição proceder:

- sendo 01 plasma : desprezar
- sendo mais de 01 plasma: refazer a amostragem ou rever a metodologia analítica.

3.4.2. Recuperação

A Recuperação de um analito em um ensaio é a resposta do detector de uma quantidade de analito adicionada e ou separada de uma matriz biológica. A recuperação está ligada à eficiência do método analítico de separação, dentro dos limites de variabilidade. A recuperação de um analito não precisa

ser 100%, mas a quantidade de analito recuperado e do padrão interno deve ser consistente, precisa e reprodutível. Experimentos para recuperação devem ser feitos comparando resultados analíticos de amostras a três concentrações (baixa, média e alta) com soluções-padrão nas mesmas concentrações representando 100% de recuperação.

Pode-se utilizar de processos analíticos para verificar a separação. Um processo diz respeito à monitoração da separação que neste caso trata-se da introdução de uma massa ou volume constante de uma substância não interferente, na qual pode-se acompanhar visualmente seu sinal analítico, permitindo assim identificar qualquer anomalia durante o processo de separação. Outro processo trabalha, também, com a introdução de uma substância não interferente, porém, a relação de sinal analítico e concentração devem ser conhecidos, o que permitirá, independente de ter-se extraído o teórico ou menos, obter a concentração do analito presente na amostra (metodologia por padronização interna). A recuperação deve ser confiável (deve repetir). O percentual recuperado deve ser tal que não interfira na quantificação da corrida analítica que se segue. O percentual de recuperação desejado é, na realidade, função da relação da detectabilidade do método com o limite de quantificação necessário. Por exemplo, se em função da faixa de concentração pertinente ao ensaio em questão for necessário obter um limite de quantificação na matriz biológica antes da separação de 10 ng/mL e em meio biológico pós-separação detectar-se com confiabilidade 6 ng/mL, a recuperação necessária será de no mínimo 60%. Como guia para estimar a % de recuperação mínima, pode-se utilizar da equação:

$$\% \text{ Recuperação Mínima} = \frac{\text{L.Q. Obtido no Fluido Biológico} \times 100}{\text{L.Q. Estimado no Fluido Biológico}}$$

Determinar em 03 níveis de concentração, concentrações estas pertinentes ao estudo de bioequivalência, sendo a menor concentração no máximo três vezes o Limite de Quantificação (LQ). Para a variabilidade das recuperações considerar em C.V. máximo de 20%.

3.4.3. Limites

3.4.3.1. Limite de quantificação

O padrão de concentração mais baixo deve ser o limite de quantificação se as seguintes condições forem obedecidas:

A resposta do analito no limite de quantificação for pelo menos 5 vezes maior que a resposta comparada com a do branco.

O sinal analítico for identificável, discreto e reproduzível com precisão de 20% e exatidão de 80-120%.

3.4.4. Linearidade

Uma curva de resposta (padrão) é a relação entre a resposta do instrumento e concentrações conhecidas do analito. Uma curva de resposta deve ser gerada para cada analito na amostra. Um número suficiente de padrões deve ser usado para definir adequadamente a relação entre concentração e resposta. Uma curva de resposta deve ser preparada na mesma matriz biológica que as amostras de um estudo, adicionando na matriz concentrações conhecidas do analito. O número de padrões usados na construção de uma curva de resposta será uma função dos valores analíticos esperados no estudo e da relação analito/resposta. Uma curva de calibração deve consistir de uma amostra “branco” (matriz processada sem o padrão interno), uma amostra “zero”, se pertinente, (matriz processada com o padrão interno) e seis ou mais amostras intermediárias cobrindo a faixa esperada, incluindo o limite de quantificação.

3.4.4.1. Curva de resposta

O modelo mais simples que descreve adequadamente a relação concentração/resposta deve ser usado. O uso de ajustes e equações de regressão complexas deve ser justificado.

A curva de resposta deve conter no mínimo 05 pontos incluindo-se o LQ e excluindo-se o branco. Caso haja exclusão de pontos, os mesmos devem ser registrados para posterior avaliação do órgão regulador.

3.4.4.2. Critérios de exclusão

- 1 - Os pontos não devem exceder em 15% do valor nominal e em 20% para o Limite de Quantificação.
- 2 - Os pontos excluídos não devem ser consecutivos.

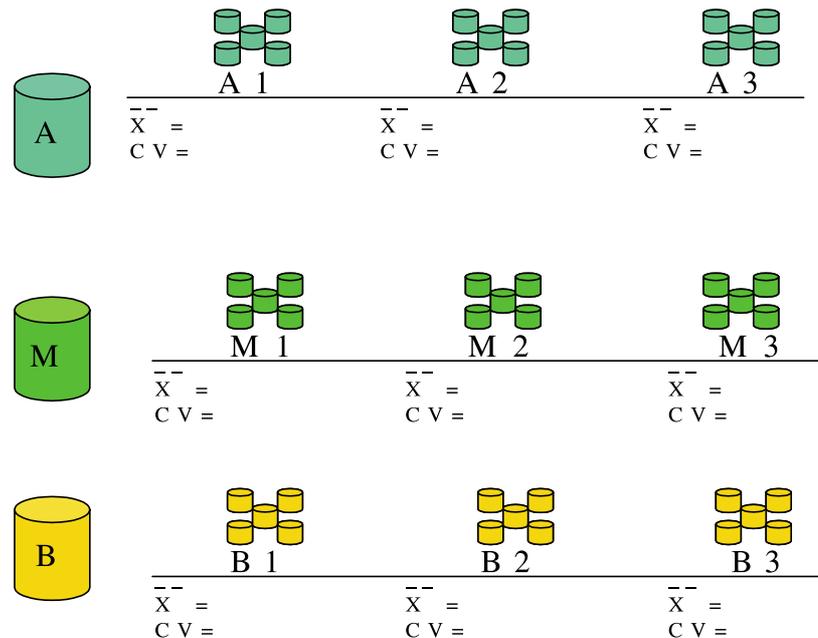
Obs.: Caso com a exclusão, ainda que os parâmetros fiquem fora do especificado, deve-se refazer a curva.

3.4.5. Precisão

A Precisão de um método analítico descreve a proximidade de medidas individuais de um analito quando o procedimento é aplicado repetidamente a múltiplas alíquotas de um único volume homogêneo de uma matriz biológica. A precisão deve ser medida usando um mínimo de cinco determinações por concentração. Um mínimo de três concentrações pertinente a toda faixa de estudo é recomendado. A precisão determinada a cada nível de concentração não deve exceder 15% em coeficiente de variação (CV) exceto no limite mínimo de quantificação, o qual não deve desviar mais de 20% em CV. A precisão é posteriormente subdividida em *precisão* ou *repetitividade* “dentro da corrida” ou “intra lote”, que fornece a precisão durante uma única corrida analítica, e *precisão* ou *reprodutividade* “entre corridas” ou “inter lote” que mede a precisão ao longo do tempo, podendo envolver diferentes analistas, equipamentos, reagentes e laboratórios.

3.4.5.1. Repetitividade de separação

Preparar 03 concentrações pertinentes e diferentes (Alta, Média e Baixa) de analito em plasma. Para cada concentração, obter 15 amostras, separando-os em 03 grupos. Cada grupo contendo 05 amostras da concentração Alta, 05 amostras da concentração Média e 05 amostras da concentração Baixa, que deverão ser analisadas nesta seqüência. Após o término do primeiro grupo, inicia-se o segundo e o terceiro



3.4.5.2. Aceitação da repetitividade

Aceita-se como Repetível para as séries A₁, A₂ e A₃, M₁, M₂ e M₃ e B₁, B₂ e B₃, valores de CV menor ou igual a 15%, caso a concentração baixa seja o L.Q., o C.V. não deverá ser maior que 20%.

3.4.5.3. Reprodutividade de separação

A Reprodutividade é aplicada sobre as medidas da Repetitividade.

3.4.5.4. Aceitação da reprodutividade

Aceita-se como reprodutível o CV das médias das series A₁, A₂ e A₃, M₁, M₂ e M₃ e B₁, B₂ e B₃. O CV resultante não deverá ser maior que 15%, caso a concentração baixa seja o L.Q., o C.V. não deverá ser maior que 20%.

Obs.: Para o procedimento de obtenção da Repetitividade, pode ser aplicado rejeição a 95% de confiança excluindo-se apenas 1 ponto em 05. Como recomendação sugere-se o testes: Q% ou de Grubbs ou ainda equivalente. O Centro da Etapa Analítica deve definir, a priori, o critério de rejeição a ser adotado. Independente da rejeição para fins de cálculo do CV, o valor rejeitado deve ser documentado.

3.4.6. Exatidão

A Exatidão de um método analítico descreve a proximidade da média dos resultados obtidos em um teste com o valor real (concentração) do analito. A exatidão é determinada pela repetição de análises de amostras contendo concentrações conhecidas do analito. A exatidão deve ser medida usando um mínimo de cinco determinações por concentração. Um mínimo de três concentrações na faixa de concentrações esperada é recomendado. O valor médio deve estar igual ou maior que 85% do valor real, exceto no limite de quantificação, no qual não deve estar abaixo de 80%.

Como expressão para verificar a exatidão utilize:

$$\% \text{ Exatidão} = \frac{\text{Média dos valores obtidos} \times 100\%}{\text{Valor esperado}}$$

3.4.7. Aceitação da validação

A aceitabilidade deve usar como base os parâmetros contidos das variabilidades aceitáveis da metodologia.

3.5. Aplicação do método validado no estudo

A aplicação do método validado do estudo analítico da bioequivalência deve ser conduzida obedecendo os parâmetros analíticos que reproduzam a confiabilidade do método, conforme procedimentos descritos na seqüência:

- 3.5.1. As análises devem respeitar os tempos disponíveis de estabilidades pré-determinadas.
- 3.5.2. Se o método tem variabilidade aceitável, as amostras podem ser analisadas através de uma única determinação, sem duplicata ou triplicata. Isto é válido para procedimentos nos quais a variação da precisão e exatidão, rotineiramente, caem dentro de limites de tolerância aceitáveis. Em um procedimento difícil, com um analito lábil, no qual altas especificações de precisão e exatidão são difíceis de obter, devem ser executadas análises em duplicata, ou mesmo em triplicata, para uma melhor estimativa do analito.
- 3.5.3. Deve ser preparada uma curva de resposta (segue o mesmo princípio do método analítico) para cada analito, e esta deve ser usada para calcular a concentração do analito em amostras na corrida. Amostras de controle de qualidade podem conter mais de um analito. A curva de resposta deve cobrir os valores esperados de concentração nas amostras, além de uma amostra no limite de quantificação. Não se recomenda extrapolações de valores. Nestes casos, a curva de resposta deve ser redefinida, ou amostras com concentração mais alta devem ser diluídas e reanalisadas. É preferível analisar todas as amostras de um estudo em uma única ocasião.

3.5.4. Uma corrida analítica consiste de amostras, amostras de controle e curva de resposta a serem analisadas como um lote.

Lote: entende-se como a quantidade de amostras preparadas pelo mesmo profissional e para a análise ininterrupta, podendo consistir de um ou mais voluntários.

3.5.5. Uma vez que o método analítico foi validado para uso rotineiro, sua exatidão e precisão devem ser monitoradas regularmente para assegurar que o método continua a ter um desempenho satisfatório. Para alcançar este objetivo, um número de amostras de controle preparadas separadamente deve ser analisado juntamente com amostras desconhecidas, em intervalos de 10 em 10 amostras. Segue como seqüência mínima:

As amostras de controle devem ser incorporadas em cada corrida e em três concentrações, sendo uma próxima (menor ou igual três vezes o LQ) do limite de quantificação, uma no meio da escala e uma próxima do máximo. Um mínimo de seis amostras de controle deve estar contido na corrida e pelo menos quatro dessas seis amostras de controle devem estar dentro de 15% do seu respectivo valor nominal. As amostras de controle devem ser usadas para aceitar ou rejeitar a corrida.

3.5.6. Reanálises devem ser feitas em triplicata, se o volume de amostra permitir. As razões para reanálise e seus resultados devem ser claramente documentados.

ANEXO I

LISTA DE VERIFICAÇÃO DE RECEBIMENTO DAS AMOSTRAS	
1. N do Estudo:	
2. Princípio Ativo:	
3. Origem:	
4. Coordenador Responsável pelo envio:	
RECEBIMENTO	
5. Data:	6. Hora:
7. Responsável:	
8. Livro de registro (n e página) :	
CONDIÇÕES DAS AMOSTRAS	
9. Embalagem:	
10. Rotulagem:	
11. Quantidade recebida:	
12. Temperatura no interior do recipiente de Transporte:	
13. OBSERVAÇÕES:	
TRANSPORTE	
14. Responsável:	
15. Data e horário do embarque::	
16. Tipo de gelo utilizado:	
17. OBSERVAÇÕES:	
ASSINATURAS DOS RESPONSÁVEIS	
18. Recebimento:	
19. Entrega:	
20. Coordenador da etapa Clínica:	
21. Coordenador da etapa Analítica:	
22. Pesquisador Principal:	

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Addison, R.S., Franklin, M.E. and Hooper, W.D. (1998) Sensitive, high-throughput gas chromatographic mass spectrometric assay for fluoxetine and norfluoxetine in human plasma and its application to pharmacokinetic studies. *Journal of Chromatography B* 716: 153-160

Ahmadiani, A. and Amini, H. (2001) Rapid determination of ranitidine in human plasma by high-performance liquid chromatography without solvent extraction. *Journal of Chromatography B* 751: 291-296

Bahmaei, M., Khosravi, A., Zamiri, C., Massoumi, A. and Mahmoudian, M. (1997) Determination of captopril in human serum by high performance liquid chromatography using solid-phase extraction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 15: 1181-1186

Bald, E., Sypniewski, S., Drzewoski, J. and Stepień, M. (1996) Application of 2-halopyridinium salts as ultraviolet derivatization reagents and solid-phase extraction for determination of captopril in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications* 681: 283-289

Biddlecombe, R.A. and Pleasance, S. (1999) Automated protein precipitation by filtration in the 96-well format. *Journal of Chromatography B* 734: 257-265

Bongiovanni, R., Yamamoto, B.K. and Jaskiw, G.E. (2001) Improved method for the measurement of large neutral amino acids in biological matrices. *Journal of Chromatography B* 754: 369-376

Braggio, S., Barnaby, R.J., Grossi, P. and Cugola, M. (1996) A strategy for validation of bioanalytical methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 14: 375-388

BRITISH Pharmacopoeia. The Stationery Office: London, 2000.

Causon, R. (1997) Validation of chromatographic methods in biomedical analysis - Viewpoint and discussion. *Journal of Chromatography B* 689: 175-180

Cociglio, M., Peyriere, H., Hillaire-Buys, D. and Alric, R. (1998) Application of a standardized coextractive cleanup procedure to routine high-performance liquid chromatography assays of teicoplanin and ganciclovir in plasma. *Journal of Chromatography B* 705: 79-85

Cordero, B.M., Pavon, J.L.P., Pinto, C.G., Laespada, M.E.F, Martinez, R.C. and Gonzalo, E.R. (2000) Analytical applications of membrane extraction in chromatography and electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 902: 195-204

CROSBY, N.T.; DAY, J.A.; HARDCASTLE, W.A.; HOLCOMBE, D.G.; TREBLE, R.D. *Quality in the analytical chemistry laboratory*. John Wiley & Sons: Chichester, 1997.

Dadgar, D. and Burnett, P.E. (1995) Issues in evaluation of bioanalytical method selectivity and drug stability. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 14: 23-31

- Dadgar, D., Burnett, P.E., Choc, M.G., Gallicano, K. and Hooper, J.W. (1995) Application Issues in Bioanalytical Method Validation, Sample Analysis and Data Reporting. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 13: 89-97
- Enanga, B., Labat, C., Boudra, H., Chauviere, G., Keita, M., Bouteille, B., Dumas, M. and Houin, G. (1997) Simple high-performance liquid chromatographic method to analyse megazol in human and rat plasma. *Journal of Chromatography B* 696: 261-266
- Farthing, D., Brouwer, K.L.R., Fakhry, I. and Sica, D. (1997) Solid-phase extraction and determination of ranitidine in human plasma by a high-performance liquid chromatographic method utilizing midbore chromatography. *Journal of Chromatography B* 688: 350-353
- Fu, I., Woolf, E.J. and Matuszewski, B.K. (1998) Effect of the sample matrix on the determination of indinavir in human urine by HPLC with turbo ion spray tandem mass spectrometric detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 18: 347-357
- GARFIELD, F.M. Quality assurance principles for analytical laboratories. AOAC International: Gaithersburg, 1997.
- GUENTHER, W.B. Química quantitativa: medições e equilíbrio. Edgard Blücher: São Paulo, 1972.
- Guidance for Industry-Bioanalytical Method Validation- US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration/Center for Drug Evaluation and Research (CDER)/Center for Veterinary Medicine (CVM)- May 2001-BP.
- Halperin, G., Elisaf, M., Leitersdorf, E. and Harats, D. (2000) A new method for determination of serum cholestanol by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B* 742: 345-352
- Hartmann, C., Smeyers-Verbeke, J., Massart, D.L. and McDowall, R.D. (1998) Validation of bioanalytical chromatographic methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 17: 193-218
- ICH Topic Q 2A Validation of Analytical Methods: Definitions and Terminology-Note for Guidance on Validation of Analytical Methods: Definitions and Terminology (CPMP/ICH/381/95)- Aprovado em 1994 e para operação em 01 de junho de 1995.
- Jankowski, A., Skorek, A., Krzysko, K., Zarzycki, P.K., Ochocka, R.J. and Lamparczyk, H. (1995) Captopril - Determination in Blood and Pharmacokinetics After Single Oral Dose. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 13: 655-660
- Jemal, M. and Hawthorne, D.J. (1997) Quantitative determination of BMS-186716, a thiol compound, in rat plasma by high-performance liquid chromatography positive ion electrospray mass spectrometry after hydrolysis of the methyl acrylate adduct by the native esterases. *Journal of Chromatography B* 698: 123-132
- Jemal, M., Teitz, D., Ouyang, Z. and Khan, S. (1999) Comparison of plasma sample purification by manual liquid-liquid extraction, automated 96-well liquid-liquid extraction and automated 96-well solid-phase extraction for analysis by highperformance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 732: 501-508

Kataoka, H., Narimatsu, S., Lord, H.L. and Pawliszyn, J. (1999) Automated in tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry for the determination of beta-blockers and metabolites in urine and serum samples. *Analytical Chemistry* 71: 4237-4244

Kelly, M.T., McGuirk, D. and Bloomfield, F.J. (1995) Determination of Cimetidine in Human Plasma By High-Performance Liquid-Chromatography Following Liquid-Liquid-Extraction. *Journal of Chromatography B* 668: 117-123

LopezCalull, C., GarciaCapdevila, L., Arroyo, C. and Bonal, J. (1997) Simple and robust high-performance liquid chromatographic method for the determination of ranitidine in microvolumes of human serum. *Journal of Chromatography B* 693: 228-232

Matsuki, Y., Ito, T., Fukuhara, K., Nakamura, T., Kimura, M., Ono, H. and Nambara, T. (1982) Determination of Captopril and Its Disulfide in Biological- Fluids. *Journal of Chromatography* 239: 585-594

McCauley-Myers, D.L., Eichhold, T.H., Bailey, R.E., Dobrozsi, D.J., Best, K.J., Hayes, J.W. and Hoke, S.H. (2000) Rapid bioanalytical determination of dextromethorphan in canine plasma by dilute-and-shoot preparation combined with one minute per sample LC-MS/MS analysis to optimize formulations for drug delivery. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 23: 825-835

Modamio, P., Lastra, C.F., Montejo, O. and Marino, E.L. (1996) Development and validation of liquid chromatography methods for the quantitation of propranolol, metoprolol, atenolol and bisoprolol: Application in solution stability studies. *International Journal of Pharmaceutics* 130: 137-140

Nightingale, Z.D., Blumberg, J.B. and Handelman, G.J. (1999) Purification of fatty acid methyl esters by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* 732: 495-500

Nomeir, A.A., McComish, M.F., Ferrala, N.F., Silveira, D., Covey, J.M. and Chadwick, M. (1998) Liquid chromatographic analysis in mouse, dog and human plasma; stability, absorption, metabolism and pharmacokinetics of the anti-HIV agent 2-chloro-5-(2-methyl-5,6-dihydro-1,4-oxathiin-3-yl carboxamido)isopropylbenzoate (NSC 615985, UC84). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 17: 27-38

Rees, S.A. (1996) Bioanalytical strategies to support a discovery research programme. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 14: 1185-1190

Resolução – RDC no 84, de 19 de março de 2002- Ministério da Saúde/ANVISA.

Rouan, M.C., Buffet, C., Marfil, F., Humbert, H. and Maurer, G. (2001) Plasma deproteinization by precipitation and filtration in the 96-well format. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 25: 995-1000

Safgren, S.L., Reid, J.M., Rios, R. and Ames, M.M. (2001) Validated high-performance liquid chromatographic assay for simultaneous determination of dacarbazine and the plasma metabolites 5-(3-hydroxymethyl-3-methyl-1-triazeno)imidazole-4- carboxamide and 5-(3-methyl-1-triazeno)imidazole-4-carboxamide. *Journal of Chromatography B* 754: 91-96

Shah, V.P. et al. (1992) Analytical Methods Validation - Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies. *Pharmaceutical Research* 9: 588-592

SKOOG, D.A.; WEST, D.N. Fundamentos de química analítica. Editorial Reverté: Barcelona, 1979.

Teitz, D.S., Khan, S., Powell, M.L. and Jemal, M. (2000) An automated method of sample preparation of biofluids using pierceable caps to eliminate the uncapping of the sample tubes during sample transfer. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 45: 193-204

Ugland, H.G., Krogh, M. and Rasmussen, K.E. (2000) Liquid-phase microextraction as a sample preparation technique prior to capillary gas chromatographic-determination of benzodiazepines in biological matrices. *Journal of Chromatography B* 749: 85-92

UNITED States Pharmacopoeia. 25.ed. United States Pharmacopoeial Convention: Rockville, 2002.

Validação em Análise Química- Flávio Leite, 4a Edição- Editora Átomo-2002.

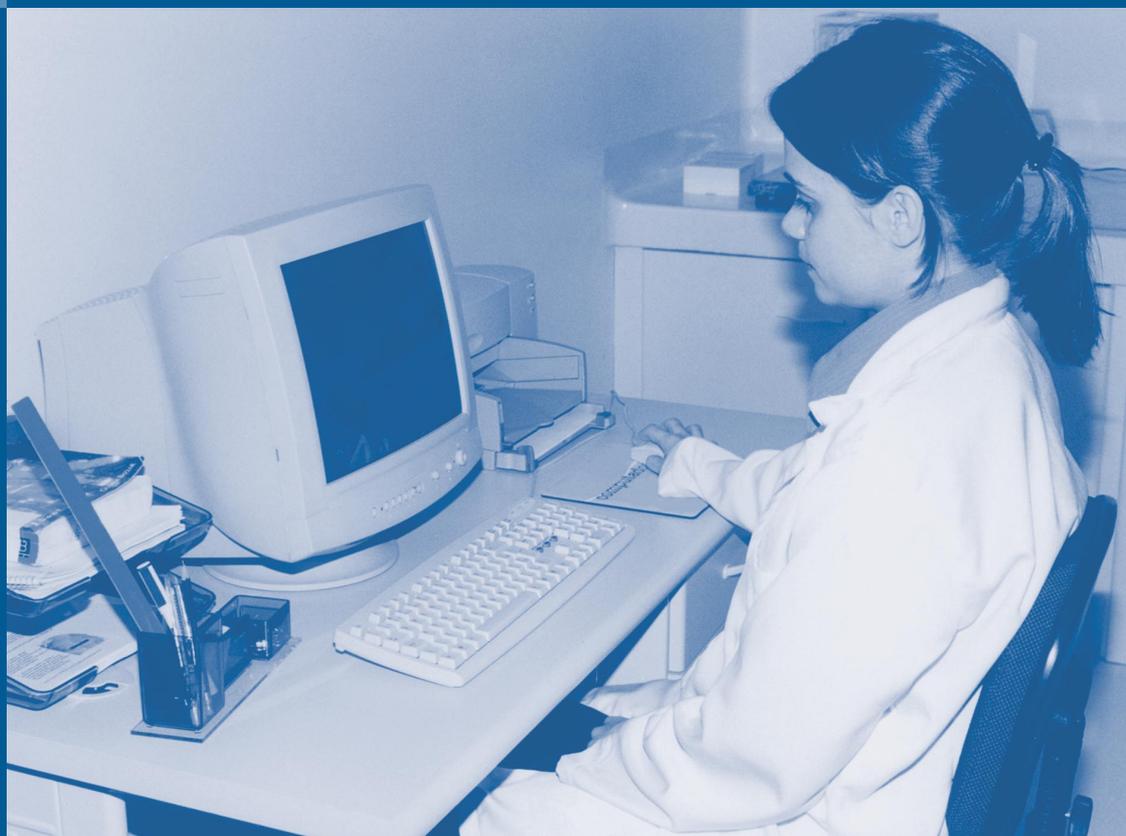
Validation of Analytical Procedures: Methodology-ICH Harmonised Tripartite Guideline- Encontro de 06 de novembro de 1996.

Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. Françoise Bressolle, Maguy Bromet-Petit, Michel Audran- *Journal Chromatography B: Biomedical Applications*-686(1996) 3-10.

Wong, C.F., Peh, K.K. and Yuen, K.H. (1998) Simple high-performance liquid chromatographic method for the determination of ranitidine in human plasma. *Journal of Chromatography B* 718: 205-210

Zhang, N.Y., Hoffman, K.L., Li, W.L. and Rossi, D.T. (2000) Semi-automated 96-well liquid-liquid extraction for quantitation of drugs in biological fluids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 22: 131-138.

Manual de Boas Práticas em Biodisponibilidade Bioequivalência



Volume I

**Módulo 3:
Etapa Estatística**

Volume I – Módulo 3 – Etapa Estatística

Editores:

- Arminda Lucia Siqueira – UFMG
- Círcia Yuko Wada – UNICAMP
- Chang Chiann – ANVISA
- Gilberto Bernasconi – USF
- Karla de Araújo Ferreira – ANVISA

Colaboradores:

- Reinaldo Charnet – UNICAMP
- Renato Almeida Lopes – ANVISA

Coordenação:

- Cláudia Franklin de Oliveira – ANVISA
- Itapuan Abimael da Silva – ANVISA
- Karen de Aquino Noffs Brisolla – ANVISA
- Karla de Araújo Ferreira – ANVISA
- Marcelo Cláudio Pereira – ANVISA
- Max Weber Marques Pereira – ANVISA
- Renato Almeida Lopes – ANVISA

Apoio Logístico:

- Daniela Salles de A. B. Corrêa – ANVISA
- Diva Sales Freitas – ANVISA

PREFÁCIO	5
1. INTRODUÇÃO	6
1.1. Considerações gerais sobre bioequivalência	6
1.2. Principais medidas farmacocinéticas	6
1.3. Outras medidas farmacocinéticas	9
1.4. Métodos de análise de bioequivalência	10
1.5. Exemplo	10
2. DELINEAMENTO DO ESTUDO	13
2.1. Planejamento <i>crossover</i>	13
2.1.1. Período de eliminação (<i>washout</i>) e efeitos residuais (<i>carry-over effects</i>)	13
2.1.2. Descrição do planejamento	14
2.1.3. Considerações de um delineamento básico	14
2.1.4. Tipos de delineamento	15
2.1.5. Seleção do delineamento experimental	18
2.1.6. Modelo estatístico	19
2.2. Inferência estatística sobre efeitos de um delineamento <i>crossover</i> 2x2	19
2.2.1. Os efeitos residuais (<i>carryover</i>)	21
2.2.2. O efeito da droga	23
2.2.3. O efeito de período	25
2.3. Análise de variância	26
2.4. Exemplo	29
3. MÉTODOS ESTATÍSTICOS PARA BIOEQUIVALÊNCIA MÉDIA	31
3.1. Introdução	31
3.2. Intervalo de bioequivalência	32
3.2.1. Medidas farmacocinéticas sem transformação	32
3.2.2. Medidas farmacocinéticas com transformação logarítmica	33
3.3. Avaliação da bioequivalência média	34
3.3.1. Intervalo de confiança	35
3.3.2. Teste de hipóteses	38
3.4. Poder dos dois testes unilaterais	41
3.5. Exemplo	42
4. ROTEIRO DA ETAPA ESTATÍSTICA EM ENSAIOS DE BIOEQUIVALÊNCIA	46
4.1. Roteiro da etapa estatística	46
4.2. Ilustração das etapas de análise estatística	46

5. OUTRAS CONSIDERAÇÕES SOBRE BIOEQUIVALÊNCIA	59
5.1. Dimensionamento da amostra	59
5.1.1. Introdução.....	59
5.1.2. Conceitos básicos	60
5.1.3. Tamanho de amostra através de hipóteses de intervalo (modificado).....	60
5.2. Observações atípicas em estudos de bioequivalência (<i>outliers</i>)	61
5.3. Ocorrência de observações faltantes	64
5.4. Bioequivalência individual e populacional	64
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
APÊNDICE - CONCEITOS ESTATÍSTICOS BÁSICOS	66

Atualmente, estão sendo feitos no Brasil inúmeros estudos com o objetivo de avaliar a biodisponibilidade e a bioequivalência de produtos genéricos, como também de novas formulações de medicamentos já existentes no mercado.

No decorrer das atividades de inspeção dos Centros de Pesquisa que realizam esses estudos, conduzidas pela Coordenação de Inspeção em Centros de Bioequivalência/GGIMP/ANVISA, observou-se uma grande carência quanto ao esclarecimento dos métodos estatísticos associados a esses ensaios. Essa carência tem como principal reflexo o comprometimento da qualidade dos trabalhos realizados por esses Centros, que na maioria das vezes não contam com a colaboração de um profissional de Estatística. Dessa forma, uma série de problemas é detectada durante a inspeção dessa etapa, e muitos deles seriam facilmente contornados caso as técnicas necessárias à avaliação da bioequivalência estivessem disponibilizadas de forma clara aos pesquisadores e demais envolvidos.

A partir dessa necessidade, surgiu a iniciativa por parte desta Coordenação da criação do Núcleo de Discussão da Etapa Estatística, um grupo de estudo que tem por objetivo a determinação de todos os aspectos relevantes à execução da etapa estatística nos ensaios de bioequivalência, e que conta com a participação de vários especialistas da área.

Na primeira reunião de trabalho do grupo, levantou-se a possibilidade da elaboração de um manual que viesse atender as dificuldades dos Centros, e por conseguinte estabelecer as diretrizes reguladoras relativas à etapa estatística dos ensaios. O material desenvolvido para o módulo da etapa estatística é composto por tópicos específicos bem definidos, apresentados de maneira altamente didática, buscando o completo aproveitamento do público alvo, caracterizado em geral por profissionais da área de saúde sem especialização em métodos estatísticos. É importante ressaltar que esse material vem atender os requisitos mínimos exigidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, além de abordar outros pontos de igual relevância. O presente manual proposto tem também por objetivo a indicação de diretrizes reguladoras de modo a respaldar as atividades de inspeção, no sentido de melhorar cada vez mais a qualidade dos ensaios de bioequivalência realizados no Brasil.

O módulo da etapa estatística é composto basicamente por métodos estatísticos associados à avaliação da bioequivalência, considerando o critério da bioequivalência média sob delineamento experimental *crossover* 2X2. No capítulo de introdução, estão definidos os conceitos de biodisponibilidade e bioequivalência, além das medidas farmacocinéticas que são avaliadas nos ensaios, que estão exemplificadas por conjunto de dados hipotéticos que será trabalhado em todos os capítulos, de acordo com cada novo conceito abordado. Os capítulos 2 e 3 tratam dos métodos para o planejamento *crossover* e dos métodos estatísticos para a bioequivalência média, respectivamente. No Capítulo 4 é apresentado um roteiro para a realização da etapa estatística exemplificado pela análise completa de uma medida farmacocinética. Finalmente, no Capítulo 5 são apresentadas algumas considerações adicionais e essenciais na prática de um estudo de bioequivalência. No apêndice são apresentados alguns conceitos básicos de estatística úteis no entendimento dos métodos apresentados.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais sobre bioequivalência

A equivalência terapêutica de produtos farmacêuticos depende diretamente da biodisponibilidade, que é definida pela quantidade e velocidade pela qual o princípio ativo é absorvido e se torna disponível em seu sítio de ação. Um estudo comparativo de biodisponibilidade refere-se à comparação das biodisponibilidades de diferentes formulações do mesmo fármaco, ou de fármacos diferentes. Dois produtos são considerados bioequivalentes se as suas quantidades e velocidades de absorção não apresentam diferenças significativas, quando administradas à mesma dose molar do princípio ativo, sob condições experimentais similares.

Os níveis de concentração de um fármaco no organismo dependem em parte da via de administração, que pode ser classificada como intravascular ou extravascular. A administração intravascular se dá diretamente na corrente sanguínea por via intravenosa ou intra-arterial. A extravascular inclui os meios de administração oral, intramuscular, subcutâneo, transdérmico e outros. Quando um fármaco é administrado no organismo, ele geralmente atravessa as fases de absorção, distribuição, metabolização, e finalmente, eliminação. Dessa forma, a biodisponibilidade é geralmente determinada pelas medidas farmacocinéticas, ou seja, aquelas que se relacionam com a quantidade de fármaco absorvido e com a velocidade do processo de absorção. Essas medidas podem ser obtidas a partir de resultados da quantificação do fármaco em líquidos biológicos, como sangue ou urina, após administração extravascular com dose única.

Dois medicamentos são considerados bioequivalentes se as suas quantidades e velocidades de absorção não apresentam diferenças estatisticamente significativas, quando administrados à mesma dose molar do princípio ativo, sob as mesmas condições experimentais.

Um estudo de bioequivalência refere-se basicamente à comparação das principais medidas farmacocinéticas observadas no experimento, relativas aos produtos a serem testados.

1.2. Principais medidas farmacocinéticas

As medidas farmacocinéticas avaliadas na bioequivalência derivam diretamente da curva de concentração do medicamento ao longo do tempo, que é caracterizada pela quantificação de um determinado número de amostras biológicas, relativas a tempos de coleta previamente estabelecidos.

A primeira e mais importante medida avaliada é a área sob a curva de concentração plasmática do fármaco versus tempo, freqüentemente utilizada para medir a extensão da absorção, ou o montante total de droga absorvido pelo organismo, após administração de dose única de um medicamento. A determinação da bioequivalência entre dois medicamentos resulta da comparação das *ASCs* obtidas no experimento. Através de sua representação matemática

$$ASC = \frac{FD}{K_e Vd} \quad (1.1)$$

observa-se que esta medida é diretamente proporcional à quantidade de fármaco efetivamente absorvido e disponível para ser distribuído no organismo (FD). O termo $K_e Vd$, dado em (1.6), expressa o *clearance* total do fármaco (depuração), ou seja, sua velocidade de eliminação a partir do volume de distribuição, sendo que K_e corresponde à constante de velocidade de eliminação total do fármaco no organismo. Os conceitos de depuração e volume de distribuição serão abordados mais adiante.

Dentre diversos métodos para a determinação da ASC do tempo zero até o tempo da última coleta (t_k), o mais utilizado é o método dos trapezóides (Chow & Liu, 1992). Esse método consiste na soma das áreas dos trapézios determinados pelos tempos de coleta e respectivas concentrações (ver Figura 1.1). Sejam $C_0, C_1, C_2, \dots, C_k$, as concentrações obtidas em um experimento para os tempos de coleta $0, t_1, t_2, \dots, t_k$, respectivamente. A ASC de zero a t_k , denotada por $ASCt_k$, é obtida da seguinte forma:

$$ASCt_k = \sum_{i=1}^k \left(\frac{C_{i-1} + C_i}{2} \right) (t_i - t_{i-1}) \quad (1.2)$$

A área sob a curva de concentração versus tempo (ASC) pode também ser extrapolada e calculada do tempo zero até o tempo relativo à completa eliminação do fármaco. Essa medida é citada na literatura como a área sob a curva do tempo zero a infinito. A porção adicional é expressa por uma relação entre a última concentração medida C_k e a constante de velocidade de eliminação do fármaco K_e . A constante de eliminação é calculada para cada voluntário como o coeficiente de inclinação da reta de regressão ajustada nos 4 a 6 últimos valores de concentração transformados em \log_{10} , multiplicada por $-2,303$. A área sob a curva de zero a infinito é obtida da seguinte maneira:

$$ASC_{\infty} = ASCt_k + \frac{C_k}{K_e} \quad (1.3)$$

Observa-se que a ocorrência de alguns valores faltantes e/ou valores inesperados na curva de concentração, geralmente não acarretará um grande impacto no cálculo de ASC. Por outro lado, se esses valores forem relativos aos últimos pontos da curva, como por exemplo t_k , a estimativa de ASC pode vir a ter um viés. De acordo com a legislação vigente no Brasil, a área sob a curva do tempo zero ao tempo t_k , deve ser igual ou superior a 80% da área sob a curva de zero a infinito.

C_{max} é a medida que representa a maior concentração do fármaco observada e é diretamente proporcional ao montante total de droga absorvido pelo organismo. T_{max} é o tempo de coleta no qual foi observada a ocorrência de C_{max} e relaciona-se com a velocidade de absorção do fármaco. A determinação da bioequivalência entre dois medicamentos, inclui também a comparação das medidas de C_{max} e T_{max} obtidas no experimento para cada uma das formulações (medicamentos teste e referência).

A RE n° 478 de 19 de março de 2002 estabelece três medidas fundamentais à determinação da bioequivalência entre medicamentos: a área sob a curva de concentração versus tempo (ASC), a concentração máxima observada (C_{max}), e o tempo no qual essa concentração foi alcançada (T_{max}).

A Figura 1.1 mostra uma curva de concentração plasmática de um fármaco e ilustra as principais medidas farmacocinéticas: ASC_{t_k} , C_{max} e T_{max} .

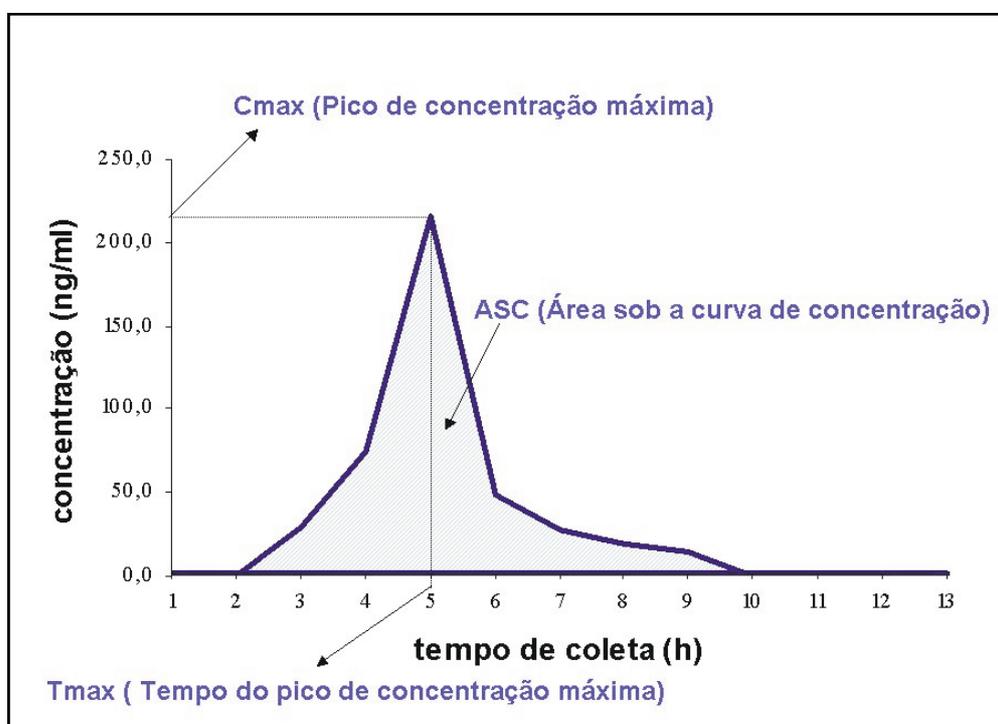


Figura 1.1. Curva de concentração plasmática de um fármaco

1.3. Outras medidas farmacocinéticas

Outras medidas farmacocinéticas que também devem ser apresentadas nos estudos de bioequivalência, embora não necessitem de tratamento estatístico comparativo, são o volume aparente de distribuição (V_d), a meia vida de eliminação do fármaco ($t_{1/2}$) e a depuração (D).

O volume aparente de distribuição (V_d) é uma medida que correlaciona a quantidade de fármaco no organismo com a sua concentração (C) no sangue ou no plasma, dependendo do fluido biológico que se esteja trabalhando. O volume não se refere a um valor fisiológico identificável, mas simplesmente ao volume de líquido que seria necessário para conter todo o fármaco no organismo na mesma concentração presente no sangue ou no plasma:

$$V_d = \frac{\text{Quantidade de fármaco no organismo}}{C} \quad (1.4)$$

Dessa forma, o volume de distribuição de determinado fármaco pode variar em função da idade, sexo, doença e composição orgânica de cada pessoa. Nesse sentido, são extremamente importantes os critérios de inclusão do estudo para a seleção dos voluntários, na tentativa de se utilizar um grupo com características mais homogêneas possíveis.

A meia-vida ($t_{1/2}$) de um fármaco é o tempo gasto para que a concentração plasmática ou para que a quantidade do mesmo no organismo diminua em 50%, e é definida por:

$$t_{1/2} = \frac{\log 2}{K_e} \quad (1.5)$$

Embora a meia-vida seja considerada um parâmetro fraco para a determinação da eliminação de um fármaco, ela proporciona uma boa indicação sobre o tempo gasto para que um fármaco seja removido do organismo, funcionando como um meio para se calcular os intervalos entre as doses de administração de um medicamento. No caso da bioequivalência, essa medida funciona como uma ferramenta essencial para a determinação do tempo de descanso (*washout*) necessário para completa eliminação do medicamento ingerido no primeiro período do estudo. A legislação brasileira prevê que o intervalo entre os períodos do estudo deve ser de no mínimo sete vezes à meia-vida do fármaco estudado.

A depuração (D) ou *clearance* de um determinado indivíduo é a medida da capacidade do organismo em eliminar um fármaco, e é dada pelo produto do volume aparente de distribuição e da constante de eliminação:

$$D = V_d K_e \quad (1.6)$$

Atualmente, existem vários programas para uso em computador, que realizam os cálculos de todas as medidas farmacocinéticas e que são amplamente usados nos estudos de biodisponibilidade/bioequivalência.

1.4. Métodos de análise de bioequivalência

A análise de bioequivalência entre duas formulações de referência (R) e teste (T) tem sido realizada com base nas medidas farmacocinéticas apresentadas anteriormente, portanto, considerando medidas resumo dos dados longitudinais. Os métodos de análise estatística são os chamados bioequivalência média, individual e populacional. O primeiro considera a análise sob o enfoque das médias das formulações R e T, enquanto que os últimos consideram a variabilidade existente nas medidas farmacocinéticas. A bioequivalência média é o método mais comumente usado e será abordado neste manual.

Os métodos estatísticos de bioequivalência média surgiram no fim da década de 70 e início da década de 80, como consequência dos esforços do FDA (Food and Drug Administration) de apontar as necessidades de métodos apropriados de avaliação estatística dos estudos de bioequivalência. Os principais desenvolvimentos foram a reformulação das hipóteses de bioequivalência (Anderson e Hauck, 1983; Schuirmann, 1981), o método do intervalo de confiança (Meltzer, 1974; Westlake, 1972, 1976 e 1981) e a abordagem bayesiana (Rodda e Davis, 1980; Madallaz e Mau, 1981). Diversos estudos têm sido realizados desde então para análise de bioequivalência com estudos comparativos dos métodos; podemos citar Hauck e Anderson (1992) entre eles. Chow e Liu (1992) apresentaram a primeira edição do livro, *Design and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies*, incluindo já seus estudos realizados nesta área. Em 2000, é publicada a segunda edição do livro, com exaustiva apresentação dos métodos de análise de bioequivalência.

A apresentação dos métodos de bioequivalência média deste manual ficará restrita somente a métodos padrões, tanto em testes de hipóteses como em intervalos de confiança.

1.5. Exemplo

A ilustração dos métodos para análise de bioequivalência média entre duas formulações R (referência) e T (teste) será realizada neste manual utilizando dados hipotéticos. As concentrações de 24 voluntários são apresentadas nas tabelas 1.1 e 1.2, com coletas realizadas em 13 tempos diferentes (dados longitudinais), respectivamente nas formulações R e T.

As tabelas 1.3 e 1.4 mostram as principais medidas farmacocinéticas calculadas para as concentrações das tabelas 1 e 2 e de acordo com o planejamento de estudo *crossover* (cap.2), considerando a seqüência de administração dos medicamentos (RT=1,TR=2) e também o período de administração (períodos 1 e 2) das formulações R e T, respectivamente.

Tabela 1.1. Concentrações plasmáticas (ng/ml) ao longo do tempo (horas) referentes ao medicamento de referência (R)

Voluntário	Tempo (horas)												
	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	6	8	10	12
1	0,0	0,0	18,3	82,9	205,4	62,3	53,9	33,6	19,8	0,0	0,0	0,0	0,0
2	0,0	19,2	23,4	104,7	287,0	275,9	217,9	133,2	77,5	36,0	17,9	14,5	0,0
3	0,0	0,0	9,4	0,0	23,5	132,5	198,3	135,9	81,3	25,4	0,0	0,0	0,0
4	0,0	0,0	0,0	115,2	193,7	204,2	150,5	142,2	58,4	36,2	17,6	0,0	0,0
5	0,0	0,0	0,0	25,8	56,9	270,3	115,4	112,3	38,6	13,0	0,0	0,0	0,0
6	0,0	0,0	70,3	129,6	60,7	51,9	32,6	17,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
7	0,0	29,2	256,9	92,9	55,2	32,0	28,2	22,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
8	0,0	19,1	233,3	160,26	103,3	88,4	62,9	34,5	33,0	28,2	0,0	0,0	0,0
9	0,0	0,0	32,3	215,9	317,2	153,9	99,5	92,3	36,9	12,6	0,0	0,0	0,0
10	0,0	13,2	12,0	98,5	259,2	113,6	51,9	45,0	30,9	21,8	7,2	0,0	0,0
11	0,0	0,0	0,0	81,1	117,6	64,3	63,9	58,2	41,7	15,2	19,0	10,9	0,0
12	0,0	0,0	0,0	114,2	138,4	146,6	156,2	177,9	80,5	37,2	22,8	17,5	0,0
13	0,0	0,0	94,5	125,8	154,2	137,9	95,8	39,8	28,7	0,0	0,0	0,0	0,0
14	0,0	32,5	114,2	171,6	123,9	91,9	84,0	74,3	50,2	19,7	16,5	15,9	16,5
15	0,0	0,0	0,0	22,8	82,5	178,3	58,2	44,3	24,8	11,9	8,4	0,0	0,0
16	0,0	19,5	54,2	97,2	165,3	157,9	145,6	80,6	29,2	22,6	15,9	0,0	0,0
17	0,0	23,5	59,6	145,2	131,5	80,9	64,1	61,8	28,9	14,4	18,5	0,0	0,0
18	0,0	0,0	19,2	39,5	115,2	297,4	164,2	145,2	80,5	32,2	11,5	0,0	0,0
19	0,0	0,0	78,2	209,7	172,6	159,1	66,9	37,2	29,4	9,4	0,0	0,0	0,0
20	0,0	11,5	63,9	248,6	186,6	74,2	29,5	23,4	15,0	0,0	0,0	0,0	0,0
21	0,0	0,0	79,2	215,3	168,2	51,9	37,8	33,9	15,7	0,0	0,0	0,0	0,0
22	0,0	0,0	357,1	372,3	177,4	122,3	64,9	55,6	14,9	0,0	0,0	0,0	0,0
23	0,0	0,0	209,6	515,5	230,8	102,0	129,4	64,9	21,4	25,2	20,9	10,0	0,0
24	0,0	0,0	25,3	183,1	70,3	25,1	14,2	11,5	8,4	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabela 1.2. Concentrações plasmáticas (ng/ml) ao longo do tempo (horas) referentes ao medicamento teste (T)

Voluntário	Tempo (horas)												
	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	6	8	10	12
1	0,0	0,0	29,3	75,2	215,9	48,2	26,9	19,5	14,3	0,0	0,0	0,0	0,0
2	0,0	0,0	67,3	315,8	335,5	209,8	233,8	116,9	58,7	28,4	22,1	15,2	0,0
3	0,0	0,0	89,5	105,3	285,5	180,9	65,4	32,9	23,0	15,9	12,5	0,0	0,0
4	0,0	0,0	0,0	196,9	291,4	297,7	324,5	97,2	56,9	23,5	18,7	0,0	0,0
5	0,0	0,0	13,7	188,8	221,6	147,2	58,4	44,3	29,9	11,9	0,0	0,0	0,0
6	0,0	0,0	75,8	188,0	82,3	63,7	48,0	11,3	10,7	0,0	0,0	0,0	0,0
7	0,0	129,6	291,4	209,2	85,9	54,7	32,5	30,9	28,4	12,4	9,0	0,0	0,0
8	0,0	39,5	250,4	226,9	80,4	75,3	59,2	49,1	42,5	0,0	0,0	0,0	0,0
9	0,0	0,0	12,5	256,3	304,8	219,7	115,0	33,1	14,9	15,3	0,0	0,0	0,0
10	0,0	12,2	29,4	12,4	127,8	65,8	81,7	49,3	39,6	33,1	15,2	0,0	0,0
11	0,0	49,5	117,0	103,5	78,3	74,3	63,2	55,1	48,7	39,2	23,0	12,2	0,0
12	0,0	0,0	0,0	125,5	175,0	208,5	161,3	95,9	65,0	18,0	13,7	0,0	0,0
13	0,0	0,0	75,2	141,9	95,4	72,9	56,0	41,0	24,7	0,0	0,0	0,0	0,0
14	0,0	37,7	107,5	215,2	100,3	96,5	64,6	56,5	51,7	31,9	23,2	17,1	0,0
15	0,0	0,0	43,4	93,3	117,7	91,0	42,6	36,9	27,2	12,9	0,0	0,0	0,0
16	0,0	25,5	75,5	203,9	177,3	88,5	53,5	29,9	27,0	25,8	16,0	0,0	0,0
17	0,0	43,4	45,2	78,2	205,3	95,8	45,7	32,5	19,3	17,8	16,5	12,2	0,0
18	0,0	0,0	23,4	72,4	256,3	166,9	124,8	96,2	88,2	25,4	12,9	0,0	0,0
19	0,0	0,0	0,0	227,0	195,2	82,5	45,2	22,9	18,0	11,2	0,0	0,0	0,0
20	0,0	9,3	32,5	189,4	277,5	83,9	77,4	53,6	33,1	12,4	8,9	0,0	0,0
21	0,0	0,0	45,3	133,2	267,4	165,2	95,4	52,4	33,8	15,4	0,0	0,0	0,0
22	0,0	0,0	139,3	325,9	249,3	127,2	104,8	64,2	11,9	0,0	0,0	0,0	0,0
23	0,0	22,3	245,8	586,2	241,2	105,0	100,2	42,5	20,4	15,8	9,6	0,0	0,0
24	0,0	44,8	250,1	53,6	38,9	22,5	23,7	18,9	14,2	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabela 1.3. Medidas farmacocinéticas dos indivíduos no medicamento de referência (R)

Fármaco	Indivíduo	Período	Seqüência	Tmax	Cmax	Ke	t _{1/2}	ASC _t	ASC _∞
R	1	1	RT	2	205,4	1,00	0,69	252,95	252,92
R	2	2	TR	2	287,0	0,41	1,69	764,33	785,23
R	3	1	RT	3	198,3	0,68	1,03	402,23	414,41
R	4	2	TR	2,5	204,2	0,30	2,31	583,50	624,60
R	5	1	RT	2,5	270,3	0,84	0,83	364,60	367,10
R	6	2	TR	1,5	129,6	1,07	0,65	181,45	193,63
R	7	2	TR	1	256,9	0,33	2,07	258,65	321,37
R	8	1	RT	1	233,3	0,08	8,66	448,55	772,56
R	9	2	TR	2	317,2	0,78	0,88	526,88	530,35
R	10	1	RT	2	259,2	0,37	1,86	393,33	405,44
R	11	2	TR	2	117,6	0,27	2,53	334,88	363,72
R	12	1	RT	3,5	177,9	0,19	3,68	622,28	697,60
R	13	1	RT	2	154,2	1,12	0,62	359,88	356,86
R	14	2	TR	1,5	171,6	0,24	2,95	529,65	599,80
R	15	1	RT	2,5	178,3	0,27	2,56	264,65	287,29
R	16	1	RT	2	165,3	0,15	4,56	473,65	562,38
R	17	2	TR	1,5	145,2	0,36	1,92	385,23	417,87
R	18	2	TR	2,5	297,4	0,49	1,42	578,38	590,51
R	19	2	TR	1,5	209,7	0,56	1,25	417,40	424,91
R	20	1	RT	1,5	248,6	1,21	0,57	337,60	334,99
R	21	2	TR	1,5	215,3	1,04	0,67	312,78	312,16
R	22	2	TR	1,5	372,3	1,15	0,60	593,43	591,43
R	23	1	RT	1,5	515,5	0,23	3,00	765,05	798,33
R	24	1	RT	1,5	183,1	0,53	1,32	175,25	182,85

Tabela 1.4. Medidas farmacocinéticas dos indivíduos no medicamento teste (T)

Fármaco	Indivíduos	Período	Seqüência	Tmax	Cmax	Ke	t _{1/2}	ASC _t	ASC _∞
T	1	2	RT	2	215,9	0,63	1,10	225,38	233,71
T	2	1	TR	2	335,5	0,16	4,44	844,33	926,39
T	3	2	RT	2	285,5	0,15	4,55	465,30	534,8
T	4	1	TR	3	324,5	0,35	1,96	759,38	793,66
T	5	2	RT	2	221,6	0,53	1,32	398,18	408,92
T	6	1	TR	1,5	188,0	1,18	0,59	247,93	246,33
T	7	1	TR	1	291,4	0,28	2,46	495,40	518,33
T	8	2	RT	1	250,4	0,33	2,09	443,53	529,26
T	9	1	TR	2	304,8	0,82	0,85	519,93	523,34
T	10	2	RT	2	127,8	0,27	2,57	335,40	376,48
T	11	1	TR	1	117,0	0,29	2,38	480,13	509,73
T	12	2	RT	2,5	208,5	0,52	1,33	527,75	540,35
T	13	2	RT	1,5	141,9	0,66	1,05	272,08	284,84
T	14	1	TR	1,5	215,2	0,16	4,45	548,18	640,77
T	15	2	RT	2	117,7	0,40	1,72	272,25	291,31
T	16	2	RT	1,5	203,9	0,13	5,52	444,40	555,81
T	17	1	TR	2	205,3	0,07	9,55	390,18	546,04
T	18	1	TR	2	256,3	0,48	1,46	556,85	571,03
T	19	1	TR	1,5	227,0	0,27	2,55	331,30	361,26
T	20	2	RT	2	277,5	0,44	1,57	445,78	457,09
T	21	1	TR	2	267,4	0,46	1,50	452,50	470,42
T	22	1	TR	1,5	325,9	1,19	0,58	520,23	518,33
T	23	2	RT	1,5	586,2	0,19	3,68	747,90	789,24
T	24	2	RT	1	250,1	0,51	1,35	244,00	257,52

2. DELINEAMENTO DO ESTUDO

2.1. Planejamento *crossover*

A escolha dos delineamentos e os métodos estatísticos para análise de dados são dois aspectos importantes num estudo de bioequivalência. Esses dois aspectos são muito relacionados, uma vez que o método de análise depende do delineamento utilizado. Considerações gerais de um estudo devem levar em conta:

- Qual é o objetivo do estudo?
- Qual é o delineamento utilizado?
- Qual é o método estatístico utilizado?

Neste manual, restringimos a comparação de diferentes formulações da mesma droga. Um critério para escolher um delineamento apropriado é verificar se o delineamento selecionado pode identificar e isolar a variabilidade inter-individual em análise de dados. Qualquer delineamento que venha remover essa variação da comparação entre formulações pode ser apropriado.

O planejamento experimental mais utilizado nos ensaios de biodisponibilidade/ bioequivalência é o *crossover*, cujos detalhes serão discutidos a seguir.

2.1.1. Período de eliminação (*washout*) e efeitos residuais (*carry-over effects*)

É importante introduzir os conceitos de período de eliminação (*washout*) e efeitos residuais (*carry-over effects*) num planejamento *crossover*, pois a presença de efeitos residuais tem um grande impacto na inferência estatística de biodisponibilidade entre formulações.

O **período de eliminação (*washout*)** é definido como um intervalo de tempo suficientemente grande entre dois períodos de tratamentos para que o efeito residual de uma formulação administrada num período de tratamento seja eliminado das unidades experimentais para o próximo período.

O experimento *crossover* deve ser usado quando não existe efeito residual nos tratamentos. Se uma droga tem uma meia-vida longa ou se o intervalo entre os períodos de tratamentos é muito curto, o efeito da droga pode persistir depois do fim de período da dosagem. Neste caso, é necessário distinguir a diferença entre o efeito de droga e os efeitos residuais.

O **efeito da droga** é aquele observado durante o período no qual ela é administrada, enquanto que o **efeito residual** é o efeito da droga que persiste depois do fim do período da dosagem.

Os efeitos residuais de primeira ordem são aqueles relativos a um único período de tratamento, enquanto que efeitos residuais de ordem C são aqueles que persistem nos últimos C períodos de tratamento. No estudo de bioequivalência, como o período de eliminação é normalmente considerado, é raro aparecer um efeito de droga relativo a mais de um período de tratamento. Neste manual, consideramos apenas os efeitos residuais de primeira ordem, caso eles existam.

2.1.2. Descrição do planejamento

O **crossover** é um planejamento de blocos aleatorizados modificados nos quais cada bloco recebe mais de uma formulação de uma mesma droga em períodos diferentes. Um bloco pode ser um indivíduo ou um grupo de indivíduos. Os indivíduos em cada bloco recebem uma seqüência diferente de formulações. As vantagens em se utilizar esse planejamento para estudos de bioequivalência são:

- cada indivíduo serve como seu próprio controle, o que permite uma comparação do indivíduo com ele mesmo, para as diferentes formulações;
- a variabilidade inter-individual é removida da comparação entre formulações, o que torna o teste de diferença de tratamentos em geral mais poderoso;
- com uma aleatorização apropriada de indivíduos para a seqüência de administração de formulações, o planejamento produz as melhores estimativas não viciadas para diferença (ou razão) entre formulações.

2.1.3. Considerações de um delineamento básico

A legislação brasileira indica que um delineamento básico para um estudo de biodisponibilidade *in vivo* deve considerar:

- questões científicas a serem respondidas;
- natureza do material de referência e a forma de dosagem a ser testada;
- disponibilidade de métodos analíticos;
- considerações de benefício em teste humano.

Além disso, algumas considerações específicas para um estudo de bioequivalência são dadas a seguir.

Delineamento experimental

A legislação brasileira recomenda que para um estudo de biodisponibilidade (dose simples ou múltipla) deve ser adotado um delineamento do tipo *crossover*, a não ser que um delineamento paralelo ou algum outro seja mais apropriado por razões científicas válidas. Para um delineamento paralelo, cada indivíduo recebe ao acaso somente uma das formulações, enquanto que em um delineamento *crossover*, cada indivíduo recebe mais de uma formulação em períodos diferentes.

O planejamento adequado do experimento deve ter como objetivo minimizar a variabilidade que pode advir de várias fontes:

- variabilidade inter-individual;
- variabilidade intra-individual;
- efeito dos períodos, que pode ser causado por ação residual de tratamentos precedentes;
- erro experimental;
- variabilidade associada a tratamentos diferentes, como administração de produtos ou dosagens diferentes.

Aleatorização

Inferências estatísticas válidas são normalmente baseadas nas suposições de que os erros do modelo empregado são variáveis aleatórias independentemente distribuídas, o que pode ser assegurado através da aleatorização. A forma de aleatorização é feita de acordo com o delineamento a ser utilizado no estudo.

Cronograma de coleta

A legislação brasileira recomenda que o cronograma de coleta das amostras deve contemplar um tempo igual ou superior a 3-5 vezes a meia-vida de eliminação do fármaco ou do metabólito, quando o mesmo for ativo.

Período de eliminação

A legislação brasileira recomenda que o intervalo entre os períodos deve ser de no mínimo sete meias-vidas de eliminação do fármaco, ou do metabólito, quando o mesmo for ativo.

Número de voluntários

O número de voluntários sadios deverá sempre assegurar poder estatístico suficiente para garantir a confiabilidade dos resultados do estudo de bioequivalência.

2.1.4. Tipos de delineamento

Esta seção descreve os delineamentos comumente utilizados nos estudos de bioequivalência.

Delineamento *crossover* para dois medicamentos (T = teste; R = referência)

a) Delineamento *crossover* 2x2

É um delineamento convencional não replicado com duas formulações, dois períodos, duas seqüências, que pode ser representado como segue:

Seqüência	Período	
	1	2
1	R	T
2	T	R

Cada indivíduo é aleatoriamente alocado para a seqüência RT ou TR em dois períodos de dosagem. Isto é, indivíduos alocados na seqüência RT (TR) recebem formulação R (T) no primeiro período de dosagem e formulação T (R) no segundo período de dosagem. Os períodos de dosagem são separados por um tempo suficiente para que a droga recebida no primeiro período seja completamente metabolizada e/ou eliminada do corpo quando inicializar o segundo período de dosagem.

Aleatorização para um estudo *crossover* 2x2 pode ser feita através de tabelas de números aleatórios ou procedimentos de aleatorização implementados em *softwares* estatísticos.

b) Delineamento *crossover* replicado

Este delineamento é recomendado para estudos de bioequivalência de formulações com dosagem de liberação modificada ou produtos de alta variabilidade (coeficiente de variação intra-individual $\geq 30\%$), incluindo aqueles que são de liberação imediata, liberação modificada e outros produtos de administração oral.

Para este delineamento os mesmos lotes das formulações teste e referência devem ser usados para a administração replicada. Os períodos devem ser suficientemente espaçados (*washout*) para garantir a inexistência do efeito residual.

Os delineamentos *crossover* replicados mais comumente usados para comparar duas formulações são:

i) Delineamento com quatro seqüências e dois períodos (delineamento de Balaam):

Seqüência	Período	
	1	2
1	T	T
2	R	R
3	R	T
4	T	R

ii) Delineamento com duas seqüências e quatro períodos:

Seqüência	Período			
	1	2	3	4
1	T	R	R	T
2	R	T	T	R

iii) Delineamento com quatro seqüências e quatro períodos:

Seqüência	Período			
	1	2	3	4
1	T	T	R	R
2	R	R	T	T
3	T	R	R	T
4	R	T	T	R

iv) Delineamento com duas seqüências e três períodos:

Seqüência	Período		
	1	2	3
1	T	R	T
2	R	T	R

ou

Seqüência	Período		
	1	2	3
1	T	R	R
2	R	T	T

Um número maior de voluntários é recomendado para o delineamento de três períodos, comparado com o delineamento de quatro períodos, para poder alcançar o mesmo poder estatístico para a bioequivalência.

Delineamento crossover para três medicamentos (delineamento de Williams com T1 = teste 1, T2 = teste 2, R = referência)

Para comparar três formulações de uma droga, existe um total de três possíveis pares de comparações entre formulações: formulação 1 versus formulação 2, formulação 1 versus formulação 3 e formulação 2 versus formulação 3. Como o número de formulações a serem comparadas é grande, mais seqüências e conseqüentemente mais indivíduos serão necessários, o que pode ser inviável. Um delineamento de uso prático proposto por Williams (1949) possui propriedades de balanceamento e requer poucas seqüências e períodos. Um delineamento é dito balanceado se satisfaz as seguintes condições:

- cada medicamento é aplicado somente uma vez em cada voluntário;
- em cada período, o número de voluntários que recebem cada medicamento tem que ser igual;
- o número de voluntários que recebem o medicamento i em algum período seguido pelo medicamento j no período seguinte é o mesmo para todo $i \neq j$.

Um delineamento de Williams é ilustrado como segue:

Seqüência	Período		
	1	2	3
1	R	T2	T1
2	T1	R	T2
3	T2	T1	R
4	T1	T2	R
5	T2	R	T1
6	R	T1	T2

Delineamento *crossover* para quatro medicamentos (delineamento de Williams):

Seqüência	Período			
	1	2	3	4
1	R	T3	T1	T2
2	T1	R	T2	T3
3	T2	T1	T3	R
4	T3	T2	R	T1

2.1.5. Seleção do delineamento experimental

Selecionar um delineamento apropriado ao planejar um estudo de bioequivalência é uma questão importante. A resposta dessa questão depende de vários fatores, tais como:

- número de formulações a serem comparadas;
- características da droga e sua disponibilidade;
- objetivo do estudo;
- variabilidade inter e intra individuais;
- duração do estudo e número de períodos empregados;
- custo de adição de um voluntário relativo à adição de um período;
- taxa de desistência (*dropout*).

A análise dos dados, a interpretação dos resultados e a determinação de bioequivalência entre formulações dependem diretamente do delineamento selecionado. Portanto, todos os fatores citados acima devem ser cuidadosamente avaliados para que um delineamento apropriado seja escolhido.

2.1.6. Modelo estatístico

Num planejamento *crossover*, é importante remover os efeitos residuais da comparação já que o efeito de droga pode ser confundido com qualquer efeito residual. Entretanto, em algumas situações isso não é possível.

Levando em consideração os efeitos residuais, o seguinte modelo estatístico é normalmente considerado. Seja Y_{ijk} a resposta (por exemplo, $ASCt_k, C_{max}$) do i -ésimo indivíduo na k -ésima seqüência no j -ésimo período:

$$Y_{ijk} = \mu + S_{ik} + P_j + F_{(j,k)} + R_{(j-1,k)} + \epsilon_{ijk} \quad (2.1)$$

onde:

- μ : média geral;
- S_{ik} : efeito aleatório do i -ésimo indivíduo na k -ésima seqüência, onde i (indivíduo) = 1, 2, ..., n_k e k (seqüência) = 1, 2, ..., g ;
- P_j : efeito fixo do j -ésimo período, $j = 1, \dots, p$ tal que $\sum_j P_j = 0$;
- $F_{(j,k)}$: efeito fixo da formulação administrada na k -ésima seqüência e j -ésimo período tal que, $\sum F_{(j,k)} = 0$;
- $R_{(j-1,k)}$: efeito residual fixo de primeira ordem da formulação administrada na k -ésima seqüência e $(j-1)$ -ésimo período, tal que $R_{(0,k)} = 0$ e $\sum R_{(j-1,k)} = 0$;
- ϵ_{ijk} : erro aleatório (intra-indivíduo).

Assume-se que $\{S_{ik}\}$ e $\{\epsilon_{ijk}\}$ são independentes, identicamente distribuídos (i.i.d) com média zero e variâncias σ_s^2 e σ_t^2 respectivamente, onde $t=1,2, \dots, L$ (número de formulações a serem comparadas). Assume-se também que $\{S_{ik}\}$ e $\{\epsilon_{ijk}\}$ são mutuamente independentes. As estimativas de σ_s^2 são geralmente usadas para explicar a variabilidade inter-individual, enquanto que as estimativas de σ_t^2 são usadas para descrever a variabilidade intra-individual, para a t -ésima formulação.

2.2. Inferência estatística sobre efeitos de um delineamento *crossover* 2x2

O modelo para o delineamento *crossover* 2x2, corresponde a um caso particular de (2.1), com i (indivíduo) = 1, 2, ..., n_k , j (período) = 1, 2 e k (seqüência) = 1, 2. Nesse caso, a notação anterior pode ser simplificada de modo que $F_{(j,k)} = F_R$ ou F_T e $R_{(j-1,k)} = R_R$ ou R_T como segue:

Como a formulação administrada no primeiro período na primeira seqüência é de referência, então:

$$F_{(j, k)} = F_R \text{ se } k = j;$$

$$F_{(j, k)} = F_T \text{ se } k \neq j.$$

Para esse delineamento, os efeitos residuais podem ocorrer somente no segundo período. Denota-se o efeito residual da formulação, referência do primeiro para o segundo período na seqüência 1 por R_R . Portanto,

$$R_{(j-1, k)} = R_R \text{ se } k = 1, j = 2;$$

$$R_{(j-1, k)} = R_T \text{ se } k = 2, j = 2.$$

Para cada indivíduo, os efeitos fixos em cada período e seqüência são dados por:

Seqüência	Período 1	Período 2
1 (RT)	$\mu_{11} = \mu + P_1 + F_R$	$\mu_{21} = \mu + P_2 + F_T + R_R$
2 (TR)	$\mu_{12} = \mu + P_1 + F_T$	$\mu_{22} = \mu + P_2 + F_R + R_T$

onde $\mu_{jk} = E(Y_{ijk})$, $P_1 + P_2 = 0$, $F_R + F_T = 0$ e $R_R + R_T = 0$.

Para a comparação de biodisponibilidade entre formulações, é desejável estimar e separar os efeitos residuais do efeito da droga. Na prática, é normal assumir que:

- não existe efeito de período;
- não existem efeitos residuais.

Isso se deve aos fatos de que:

- um estudo bem conduzido pode eliminar o possível efeito de período;
- o período de eliminação suficientemente espaçado pode ser escolhido para assegurar a ausência dos efeitos residuais.

Entretanto, em vários casos, o efeito de período e/ou os efeitos residuais ainda podem permanecer. A presença de efeitos residuais pode certamente aumentar a complexidade da análise estatística para a verificação da bioequivalência entre formulações. Portanto, é de interesse estabelecer alguns testes preliminares para a presença do efeito de período e/ou dos efeitos residuais antes que a comparação de biodisponibilidades entre formulações seja feita.

2.2.1. Os efeitos residuais (*Carryover*)

Considere $U_{ik} = Y_{i1k} + Y_{i2k}$, i (indivíduo) = 1, 2, ..., n_k , k (seqüência) = 1, 2, a soma da medida farmacocinética em estudo nos períodos 1 e 2 na k -ésima seqüência e a média da soma na k -ésima seqüência:

$$\bar{U}_{.k} = \frac{1}{n_k} \sum U_{ik}, k = 1, 2, \quad (2.2)$$

onde $\bar{U}_{.1}$ e $\bar{U}_{.2}$ são variáveis aleatórias independentes provenientes de populações normais com variâncias iguais.

A existência de efeito residual significa que existem efeitos residuais diferentes nas seqüências de tratamentos;

A inexistência do efeito residual não implica necessariamente que tais efeitos sejam nulos, mas que se existirem, têm a mesma intensidade em ambas seqüências de tratamentos.

Seja $R = R_T - R_R$. Sob a restrição de que $R_T + R_R = 0$, os efeitos residuais são iguais para duas formulações, isto é, $R = 0$ se e somente se $R_T = R_R = 0$. Portanto, um teste para ausência de efeitos residuais é equivalente a um teste de igualdade de efeitos residuais. Quando há inexistência de efeitos residuais, os efeitos de droga (isto é, $F = F_T - F_R$) podem ser estimados baseado nos dados de ambos períodos. Mas não há estimadores não-viciados para os efeitos de droga caso os efeitos residuais estejam presentes. Portanto, é de interesse examinar a existência desses efeitos.

Os efeitos residuais podem ser determinados testando-se as hipóteses:

$$H_0: R = 0 \text{ (ou } R_T = R_R \text{)}$$

$$H_a: R \neq 0 \text{ (ou } R_T \neq R_R \text{)}$$

A rejeição da hipótese nula nos leva à conclusão da presença de efeitos residuais entre formulações.

Definindo

$$\hat{R} = \bar{U}_{.2} - \bar{U}_{.1} \quad (2.3)$$

pode-se mostrar que \hat{R} é normalmente distribuído com média R e variância

$Var \hat{R} = \sigma_u^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)$ estimada por:

$$V\hat{a}r (\hat{R}) = \hat{\sigma}_u^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right) \quad (2.4)$$

onde

$$\hat{\sigma}_u^2 = \frac{1}{n_1 + n_2 - 2} \sum_{k=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} (U_{ik} - \bar{U}_{.k})^2 \quad (2.5)$$

Sob H_0 , a estatística

$$T_r = \frac{\hat{R}}{\sqrt{(\hat{\sigma}_u^2) \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} \quad (2.6)$$

tem uma distribuição t de student com $n_1 + n_2 - 2$ g. l.

Rejeitamos H_0 ao nível de α se

$$|T_r| > t(\alpha/2, n_1 + n_2 - 2),$$

onde $t(\alpha/2, n_1 + n_2 - 2)$ é o valor crítico da distribuição t de student, ao nível de significância α , com $n_1 + n_2 - 2$ graus de liberdade.

Como a estatística T_r envolve a estimativa de $\sigma_u^2 = 2(\sigma_s^2 + \sigma_e^2)$ que inclui as variabilidades inter e intra individuais, ela pode ter pouco poder quando a variabilidade inter-individual é relativamente maior que a intra-individual. Para aumentar o poder do teste, Grizzle (1965) sugeriu testar H_0 usando $\alpha = 0,10$.

2.2.2. O efeito da droga

Consideremos a diferença das medidas em estudo entre os períodos 1 e 2 na k-ésima seqüência:

$$d_{ik} = \frac{1}{2} (Y_{i2k} - Y_{i1k}), \quad i=1, \dots, n_k; k=1,2 \quad (2.7)$$

e a média destas diferenças na seqüência k:

$$d_{.k} = \frac{1}{n_k} \sum_{i=1}^{n_k} d_{ik}, \quad k=1,2 \quad (2.8)$$

Denota-se o efeito da droga por $F = F_T - F_R$. Se $R_T \neq R_R$, então não existem estimadores não-viciados para F baseado nos dados de ambos os períodos. Por outro lado, se $R_T = R_R$, então

$$\hat{F} = \bar{d}_{.1} - \bar{d}_{.2} = \bar{Y}_T - \bar{Y}_R \quad (2.9)$$

onde:

$$\begin{aligned} \bar{Y}_R &= \frac{1}{2} (\bar{Y}_{.11} + \bar{Y}_{.22}) \\ \bar{Y}_T &= \frac{1}{2} (\bar{Y}_{.21} + \bar{Y}_{.12}) \end{aligned} \quad (2.10)$$

\bar{Y}_R e \bar{Y}_T são chamados médias dos mínimos quadrados (*least squares means*) para as formulações R e T, respectivamente, e diferem das médias diretas das formulações R e T a menos que $n_1 = n_2$. Todos os métodos estatísticos para verificação da bioequivalência média devem utilizar as médias apresentadas em (2.10). Pode-se demonstrar que, sob as suposições da Seção 2.1.5, \hat{F} é normalmente distribuído com média F e variância $\text{Var} \hat{F} = \sigma_d^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)$, onde a estimativa de σ_d^2 é dada por:

$$\hat{\sigma}_d^2 = \frac{1}{n_1 + n_2 - 2} \sum_{k=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} (d_{ik} - \bar{d}_{.k})^2 \quad (2.11)$$

A presença do efeito da droga pode ser examinada testando-se as hipóteses:

$$H_0: F_R = F_T$$

$$H_a: F_R \neq F_T$$

Através da estatística

$$T_d = \frac{\hat{F}}{\hat{\sigma}_d \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (2.12)$$

Rejeitamos H_0 ao nível de significância α se
 $|T_d| > t(\alpha/2, n_1+n_2-2)$,
 onde $t(\alpha/2, n_1+n_2-2)$ é o valor crítico da distribuição t de Student,
 ao nível de significância α , com n_1+n_2-2 graus de liberdade.

Na presença de efeitos residuais, um estimador não-viciado para F pode ser obtido usando-se somente os dados do primeiro período. Neste caso, um intervalo de $(1 - \alpha)100\%$ de confiança (IC) para F é dado por

$$\hat{F}^* \pm t(\alpha/2, n_1 + n_2 - 2) \hat{\sigma}_d \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}} \quad (2.13)$$

onde $\hat{F}^* = \bar{Y}_{.12} - \bar{Y}_{.11}$ e

$$\hat{\sigma}_d^2 = \frac{1}{n_1 + n_2 - 2} \sum_{k=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} (Y_{ilk} - \bar{Y}_{.1k})^2 \quad (2.14)$$

A hipótese nula de inexistência de efeito da droga é rejeitada se

$$|T_{d/r}| > t(\alpha/2, n_1+n_2-2),$$

onde

$$T_{d/r} = \frac{\hat{F}^*}{\hat{\sigma}_d \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (2.15)$$

e $t(\alpha/2, n_1+n_2-2)$ é o valor crítico da distribuição t de Student, ao nível de significância α .

Na prática, na presença de efeitos residuais, os dados do primeiro período podem ser analisados para avaliar a bioequivalência entre formulações no estudo de biodisponibilidade. Entretanto, tem-se as seguintes conseqüências:

- há pouco poder para detecção de uma diferença clinicamente significativa devido ao aumento em variabilidade;
- a desconsideração da informação do segundo período elimina o benefício de um delineamento *crossover*, que remove a variabilidade inter-individual da comparação entre formulações.

2.2.3. O efeito de período

Um estimador não-viciado para o efeito de período P pode ser obtido como

$$\hat{P} = \frac{1}{2} [(\bar{Y}_{.21} - \bar{Y}_{.11}) - (\bar{Y}_{.12} - \bar{Y}_{.22})]$$

As hipóteses a serem testadas são

$$H_0: P_1 = P_2$$

$$H_a: P_1 \neq P_2$$

Rejeitamos H_0 ao nível α se

$$|T_p| > t(\alpha/2, n_1+n_2-2),$$

onde

$$T_p = \frac{\hat{P}}{\hat{\sigma}_d \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

e $t(\alpha/2, n_1+n_2-2)$ é o valor crítico da distribuição t de Student, ao nível de significância α , com n_1+n_2-2 graus de liberdade

2.3. Análise de variância

O objetivo da análise de variância é estudar a variabilidade nos dados observados particionando a soma de quadrados total (SQ_{total}) das observações em componentes dos efeitos fixos e dos erros aleatórios. Por exemplo, para o delineamento *crossover* padrão 2x2, devemos particionar a soma de quadrados total das $2(n_1+n_2)$ observações em componentes dos efeitos residuais, do efeito de período, do efeito de droga e do erro. Seja $\bar{Y}...$ a média geral das observações. Então,

$$\begin{aligned} SQ_{total} &= \sum_{k=1}^2 \sum_{j=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} (Y_{ijk} - \bar{Y} \dots)^2 = \\ &= \sum_{k=1}^2 \sum_{j=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} (Y_{ijk} - \bar{Y}_{i.k})^2 + 2 \sum_{k=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} (\bar{Y}_{i.k} - \bar{Y} \dots)^2 = \\ &= SQ_{dentro} + SQ_{entre} \end{aligned} \quad (2.18)$$

onde $\bar{Y}_{i.k} = \frac{1}{2} \sum_{j=1}^2 Y_{ijk}$ e SQ_{entre} é a soma dos quadrados referente aos indivíduos (inter-individual) e SQ_{dentro} é a soma dos quadrados dentro de cada indivíduo (intra-individual). Além disso, SQ_{entre} pode ser particionada em duas componentes: uma para os efeitos residuais e outra para os erros entre os indivíduos, ou seja,

$$SQ_{entre} = SQ_{residual} + SQ_{inter} \quad (2.19)$$

onde

$$SQ_{residual} = \frac{2 n_1 n_2}{n_1 + n_2} \left\{ \frac{1}{2} [(\bar{Y}_{.12} + \bar{Y}_{.22}) - (\bar{Y}_{.11} + \bar{Y}_{.21})] \right\}^2 \quad (2.20)$$

e

$$SQ_{inter} = \sum_{k=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} \frac{Y_{i.k}^2}{2} - \sum_{k=1}^2 \frac{Y_{.k}^2}{2 n_k} \quad (2.21)$$

Onde $Y_{i.k}$ e $Y_{.k}$ são as somas de Y_{ijk} nos índices correspondentes .

Para testar a existência de efeitos residuais, deve-se usar a estatística

$$F_r = \frac{QM_{residual}}{QM_{inter}} \quad (2.22)$$

com os quadrados médios definidos por $QM_{\text{residual}} = SQ_{\text{residual}}$ e $QM_{\text{inter}} = SQ_{\text{inter}}/(n_1+n_2-2)$, distribuída segundo uma F com $(1, n_1+n_2-2)$ graus de liberdade.

Rejeitamos a hipótese nula (inexistência de efeitos residuais) ao nível α se $F_r > F(\alpha, 1, n_1+n_2-2)$, onde $F(\alpha, 1, n_1+n_2-2)$ é o valor crítico da distribuição F de Snedecor com $(1, n_1+n_2-2)$ graus de liberdade.

Nota-se que uma distribuição F com $(1, v)$ graus de liberdade é igual ao quadrado de uma distribuição t com v graus de liberdade. Portanto, a estatística F_r é equivalente ao teste T_r já que $F_r = T_r^2$.

Analogamente, a soma dos quadrados dentro de cada indivíduo pode ser decomposta em três componentes:

$$SQ_{\text{dentro}} = SQ_{\text{droga}} + SQ_{\text{período}} + SQ_{\text{intra}} \quad (2.23)$$

onde

$$SQ_{\text{droga}} = \frac{2 n_1 n_2}{n_1 + n_2} \left\{ \frac{1}{2} [(\bar{Y}_{.21} - \bar{Y}_{.11}) - (\bar{Y}_{.22} - \bar{Y}_{.12})] \right\}^2 \quad (2.24)$$

$$SQ_{\text{período}} = \frac{2 n_1 n_2}{n_1 + n_2} \left\{ \frac{1}{2} [(\bar{Y}_{.21} - \bar{Y}_{.11}) - (\bar{Y}_{.12} - \bar{Y}_{.22})] \right\}^2 \quad (2.25)$$

e

$$SQ_{\text{intra}} = \sum_{k=1}^2 \sum_{j=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} Y_{ijk}^2 - \sum_{k=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} Y_{i.k}^2/2 - \sum_{k=1}^2 \sum_{j=1}^2 Y_{.jk}^2/n_k + \sum_{k=1}^2 Y_{..k}^2/(2n_k) \quad (2.26)$$

Quando $R_R = R_T$, a hipótese nula de inexistência de efeito de droga pode ser testada usando a estatística

$$F_d = \frac{QM_{\text{droga}}}{QM_{\text{intra}}} \quad (2.27)$$

com $QM_{\text{droga}} = SQ_{\text{droga}}$ e $QM_{\text{intra}} = SQ_{\text{intra}}/(n_1+n_2-2)$, que é distribuída segundo uma F com $(1, n_1+n_2-2)$ graus de liberdade.

Rejeitamos a hipótese nula (inexistência de efeito da droga) ao nível α se $F_d > F(\alpha, 1, n_1+n_2-2)$, onde $F(\alpha, 1, n_1+n_2-2)$ é o valor crítico da distribuição F de Snedecor com $(1, n_1+n_2-2)$ graus de liberdade.

Note que a estatística F_d é equivalente ao teste estatístico T_d já que $F_d = T_d^2$.

Para testar a hipótese nula de inexistência de efeito do período, podemos considerar a seguinte estatística:

$$F_p = \frac{QM_{período}}{QM_{intra}} \tag{2.28}$$

com $QM_{período} = SQ_{período}$ e F_p distribuída segundo uma F com $(1, n_1+n_2-2)$ graus de liberdade.

Rejeitamos a hipótese nula (inexistência de efeito do período) ao nível α se $F_p > F(\alpha, 1, n_1+n_2-2)$, onde $F(\alpha, 1, n_1+n_2-2)$ é o valor crítico da distribuição F de Snedecor com $(1, n_1+n_2-2)$ graus de liberdade.

Pode-se verificar que $F_p = T_p^2$, portanto, o teste estatístico F_p é equivalente ao teste estatístico T_p .

Para um delineamento geral de *crossover*, o método de análise de variância é útil na inferência estatística para os efeitos fixos do modelo especificado anteriormente (2.1), sob algumas suposições de normalidade. Pode-se notar que para um delineamento *crossover* padrão 2x2, a estatística t de duas amostras é equivalente ao caso especial do método de ANOVA. A tabela ANOVA é apresentada a seguir.

Tabela 2.1. Análise de variância para um delineamento *crossover* 2x2

Fonte	g.l.	SQ	QM=SQ/g.l.	Estatística F
Inter-individual				
<i>Residual</i> (Seqüência)	1	SQ _{residual}	SQ _{residual}	F _r
<i>Resíduos (inter)</i>	n_1+n_2-2	SQ _{inter}	SQ _{inter/(n_1+n_2-2)}	
Intra-individual				
<i>Droga</i>	1	SQ _{droga}	SQ _{droga}	F _d
<i>Período</i>	1	SQ _{período}	SQ _{período}	F _p
<i>Resíduos (intra)</i>	n_1+n_2-2	SQ _{intra}	SQ _{intra/(n_1+n_2-2)}	
Total	$2(n_1+n_2)-1$	SQ _{total}		

Essa Anova pode ser modificada desde que o efeito dos resíduos seja não significativo, considerando $\alpha = 0,10$. Neste caso, o modelo (2.1) pode ser reduzido para:

$$Y_{ijk} = \mu + S_{ik} + P_j + F_{(j,k)} + \varepsilon_{ijk} \quad (2.29)$$

onde Y_{ijk} , μ , S_{ik} , P_j , $F_{(j,k)}$ e ε_{ijk} estão definidos em (2.1). A Tabela 2.1 será modificada com o não particionamento da SQ_{entre} como em (2.19), e, portanto, $QM_{\text{entre}} = SQ_{\text{entre}} / (n_1 + n_2 - 1)$ para o efeito inter-individual e o teste estatístico é obtido através de $F = QM_{\text{entre}} / QM_{\text{intra}}$.

2.4. Exemplo

Utilizamos a medida $ASCT_k$ do exemplo do Capítulo 1 para ilustrar as inferências estatísticas para os efeitos fixos do modelo (2.1). Para uma análise preliminar dos dados, obtemos:

Seqüência	Período I	Período II	Média
1 (RT)	$\bar{Y}_{.11} = 404,96$	$\bar{Y}_{.21} = 401,80$	$\bar{Y}_{..1} = 403,38$
2 (TR)	$\bar{Y}_{.12} = 512,17$	$\bar{Y}_{.22} = 455,52$	$\bar{Y}_{..2} = 483,85$
Média	$\bar{Y}_{.1.} = 458,57$	$\bar{Y}_{.2.} = 428,66$	$\bar{Y}_{...} = 443,61$

Esses resultados indicam que as médias amostrais de $ASCT_k$ para as formulações de teste e referência na seqüência 2 são maiores que aquelas na seqüência 1. Para um delineamento *crossover* 2x2, a interação entre seqüência e período representa o efeito de droga se não existem efeitos residuais. Portanto, um teste preliminar para a presença de efeitos residuais deve ser necessariamente realizado antes que a avaliação da bioequivalência entre formulações seja feita.

Os efeitos residuais

Como $\bar{U}_1 = 806,77$, $\bar{U}_2 = 967,69$ e $\hat{\sigma}_u^2 = 96.080,86$, os resultados do teste são $T_r = 1,27$ (valor- $p = 0,11$), ou seja, para qualquer $\alpha \geq 0,11$ rejeitamos a hipótese da existência de efeitos residuais. O resultado do teste indica a utilização dos dados dos dois períodos para a análise do efeito de droga.

O efeito da droga

Como $\bar{d}_1 = -1,58$, $\bar{d}_2 = -28,32$ e $\hat{\sigma}_d^2 = 1.783,76$, os resultados do teste são $T_d = 1,55$ (valor- $p = 0,07$), ou seja, para qualquer $\alpha \geq 0,07$ rejeitamos a hipótese da existência de efeito de droga.

Deve-se notar que a hipótese nula da igualdade entre formulações não implica na bioequivalência entre formulações.

O efeito de período

Como $\hat{p} = -29,90$, os resultados do teste são $T_p = -1,73$ (valor-p = 0,05), ou seja, para qualquer $\alpha \geq 0,05$ rejeitamos a hipótese da existência do efeito de período.

Análise de variância

Os resultados da ANOVA são apresentados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2. Análise de variância para $ASCt_k$

Fonte	g.l.	SQ	QM=SQ/g.l.	Estatística F	Valor-p
Inter-individual					
Residual (Sequência)	1	77697,00	77697,00	1,62	0,22
Resíduos (inter)	22	1056882,06	48040,09		
Intra-individual					
Droga	1	8581,40	8581,40	2,41	0,14
Período	1	10729,32	10729,32	3,01	0,10
Resíduos (intra)	22	78485,54	3567,53		
Total	47	1232375,32			

Note que esses resultados são equivalentes aos obtidos através da estatística t de duas amostras.

Os resultados indicam que o efeito dos resíduos não é significativo (valor-p = 0,22) e o modelo *crossover* pode ser reduzido para o modelo (2.29), cuja Anova correspondente é apresentada na Tabela 2.3.

Tabela 2.3. Análise de variância para ASC_t

Fonte	g.l.	SQ	QM=SQ/g.l.	Estatística F	Valor- p
Inter-individual	23	1143627,50	49722,93	14,96	0,0001
Intra-individual					
Droga	1	8581,40	8581,40	2,41	0,14
Período	1	10729,32	10729,32	3,01	0,10
Resíduos (intra)	22	78485,54	3567,53		
Total	47	1232375,32			

Nota-se que o efeito inter-individual é significativo, o que indica a presença de variabilidade inter-individual. Os efeitos de período e de droga não são significantes.

O ajuste do modelo através da análise dos resíduos inter e intra-individuais deve ser baseado no modelo reduzido.

3. MÉTODOS ESTATÍSTICOS PARA BIOEQUIVALÊNCIA MÉDIA

3.1. Introdução

No capítulo anterior foi discutido o modelo de análise estatística para experimentos cruzados, em particular o experimento 2×2 , isto é, com duas amostras de tamanhos n_1 e n_2 alocadas aleatoriamente para as formulações de referência (R) e teste (T) e cruzados em dois períodos. A análise do experimento cruzado permite verificar os efeitos do período, seqüência e droga utilizando hipóteses formuladas como: $H_0: \mu_1 = \mu_2$ contra $H_a: \mu_1 \neq \mu_2$, onde μ_i ($i = 1, 2$) é a média do i -ésimo nível do fator (período, seqüência ou droga, cada um com dois níveis). Estas hipóteses são avaliadas através do teste F. Entretanto, para verificar a bioequivalência entre as formulações, a hipótese formulada acima não é adequada, já que a não rejeição da hipótese H_0 conclui pela igualdade das duas formulações, mas isto não implica em bioequivalência.

Igualdade de médias e bioequivalência média entre duas formulações R e T são conceitos diferentes

O objetivo dos estudos de biodisponibilidade é verificar se a taxa e a extensão da absorção do fármaco no sistema circulatório referentes às duas formulações (R e T) são equivalentes. Sabe-se que os perfis de biodisponibilidade de duas formulações podem variar para um mesmo indivíduo e por isto trabalha-se com uma avaliação em termos médios. Se consideramos μ_R e μ_T as médias populacionais de alguma das medidas farmacocinéticas da biodisponibilidade, as duas formulações são consideradas bioequivalentes se a diferença ($\mu_R - \mu_T$) ou a razão (μ_R / μ_T) entre as duas médias diferem por menos que os limites especificados (a regra de $\pm 20\%$ é a mais utilizada). Este método de verificar a bioequivalência é denominada **bioequivalência média**. Existem outros métodos de verificar a bioequivalência (individual e populacional), brevemente citadas no Capítulo 5, mas neste capítulo tratamos apenas do método de bioequivalência média.

O objetivo deste capítulo é apresentar os métodos utilizados para verificar a bioequivalência média. Estes métodos são baseados em intervalos de confiança e testes de hipóteses para a diferença ou razão das médias.

Em algumas situações, há necessidade de se trabalhar com uma transformação da medida farmacocinética (a logarítmica é a mais usual) e por isto neste capítulo consideramos as análises com e sem transformação.

Ilustramos todos os métodos apresentados com os dados do exemplo do Capítulo 1 para a medida farmacocinética $ASCt_k$.

3.2. Intervalo de bioequivalência

Nesta seção apresentamos os limites de bioequivalência baseados na diferença ou na razão das médias para os casos de medidas farmacocinéticas originais ou transformadas.

3.2.1. Medidas farmacocinéticas sem transformação

Nesta situação utilizam-se as médias aritméticas das medidas farmacocinéticas (μ_T e μ_R) para definir os intervalos de bioequivalência entre R e T.

Diferença das médias

O intervalo de bioequivalência é expresso por $\theta_{inf} < \mu_T - \mu_R < \theta_{sup}$. Utilizando a regra de $\pm 20\%$, os limites de bioequivalência são:

$$\theta_{inf} = -0,20 \mu_R \text{ e } \theta_{sup} = 0,20 \mu_R \quad (3.1)$$

e então o intervalo de bioequivalência é:

$$-0,20 \mu_R < \mu_T - \mu_R < 0,20 \mu_R \quad (3.2)$$

Na prática estes limites devem ser estimados, pois dependem do parâmetro populacional e a escolha natural é $\hat{\theta}_{inf} = -0,20 \bar{y}_R$ e $\hat{\theta}_{sup} = 0,20 \bar{y}_R$ onde \bar{y}_R é a média amostral da formulação de referência (R). Assim, o intervalo de bioequivalência é:

$$-0,20 \bar{y}_R < \mu_T - \mu_R < 0,20 \bar{y}_R \quad (3.3)$$

Razão das médias

O intervalo de bioequivalência é definido por $\delta_{inf} < \mu_T / \mu_R < \delta_{sup}$. Como visto acima, o intervalo de bioequivalência para a diferença entre as médias aritméticas das duas formulações é $-0,20 \mu_R < \mu_T - \mu_R < 0,20 \mu_R$. Dividindo-se por μ_R , obtém-se $-0,20 < (\mu_T - \mu_R) / \mu_R < 0,20$ ou $-0,20 < \mu_T / \mu_R - 1 < 0,20$, ou ainda $0,80 < \mu_T / \mu_R < 1,20$. Assim, pela regra de $\pm 20\%$, os limites são e o intervalo de bioequivalência é: $\delta_{inf} = 0,80$ e $\delta_{sup} = 1,20$

$$0,80 < \frac{\mu_T}{\mu_R} < 1,20 \tag{3.4}$$

3.2.2. Medidas farmacocinéticas com transformação logarítmica

Denotando por $\tilde{\mu}$ a média geométrica da medida farmacocinética na escala original X e μ a média aritmética da medida transformada de X na escala logarítmica ($Y = \ln X$), pode-se facilmente mostrar (ver Apêndice) que $\mu = \ln \tilde{\mu}$. Portanto, na escala original a média geométrica é $\tilde{\mu} = \exp(\mu)$. Resumindo, a notação utilizada é:

Escala	Média	Relação entre $\tilde{\mu}$ e μ
Original: X	geométrica : $\tilde{\mu}$	$\tilde{\mu} = \exp(\mu)$
Logarítmica: Y = ln (X)	aritmética : μ	$\mu = \ln (\tilde{\mu})$

Razão das médias

O intervalo de bioequivalência definido é $\delta_{inf} < \tilde{\mu}_T / \tilde{\mu}_R < \delta_{sup}$, sendo que os limites são $\delta_{inf} = 0,80$ e $\delta_{sup} = 1,25$, ou seja, o intervalo de bioequivalência é dado por

$$0,80 < \frac{\tilde{\mu}_T}{\tilde{\mu}_R} < 1,25 \tag{3.5}$$

O uso dos limites 0,80 e 1,25 para o intervalo de bioequivalência da razão das médias na escala original é justificado pelo fato de haver uma correspondência a um intervalo de bioequivalência simétrico para as diferenças na escala transformada, como mostrado a seguir.

Diferença das médias

O intervalo de bioequivalência é expresso por $\theta_{inf} < \mu_T - \mu_R < \theta_{sup}$. Como visto acima, o intervalo de bioequivalência para a razão das médias geométricas na escala original é $0,80 < \tilde{\mu}_T / \tilde{\mu}_R < 1,25$. Utilizando a transformação logarítmica, tem-se que $\log 0,80 < \log(\tilde{\mu}_T / \tilde{\mu}_R) < \log(1,25)$ ou ainda $-0,2231 < \log \tilde{\mu}_T - \log \tilde{\mu}_R < 0,2231$. Finalmente, $-0,2231 < \tilde{\mu}_T - \tilde{\mu}_R < 0,2231$, isto é, o intervalo de bioequivalência das diferenças das médias aritméticas na escala transformada. Assim, os limites são dados por $\theta_{inf} = -0,2231$ e $\theta_{sup} = 0,2231$ e o intervalo de bioequivalência é:

$$-0,2231 < \mu_T - \mu_R < 0,2231 \quad (3.6)$$

A Tabela 3.1 apresenta um resumo dos limites de bioequivalência para as quatro situações consideradas.

Tabela 3.1. Intervalos de bioequivalência baseados na média aritmética ou média geométrica para a medida farmacocinética original ou na escala logarítmica

Escala	Diferença $\theta_{inf} < \mu_T - \mu_R < \theta_{sup}$	Razão $\delta_{inf} < \mu_T / \mu_R < \delta_{sup}$
Original	$-0,2 \bar{y}_R < \mu_T - \mu_R < 0,2 \bar{y}_R$	$0,80 < \mu_T / \mu_R < 1,20$
Logarítmica	$-0,2231 < \mu_T - \mu_R < 0,2231$	$0,80 < \tilde{\mu}_T / \tilde{\mu}_R < 1,25$

Note que o caso da diferença na escala original é o único em que os limites de bioequivalência dependem dos dados.

3.3. Avaliação da bioequivalência média

A comparação de médias (diferença ou razão) pode ser realizada através de métodos paramétricos ou não-paramétricos. Para a utilização de métodos paramétricos, supõe-se que a variável de interesse tenha um determinado tipo de distribuição. Em estudos de bioequivalência, geralmente a medida farmacocinética com ou sem transformação pode ser descrita pela distribuição normal. Para a utilização de métodos não-paramétricos, não há exigências sobre a distribuição da variável estudada e por esta razão, são também chamados de métodos de distribuição livre. Portanto, são boas opções para situações em que não se conhece a distribuição ou quando a variável não segue a distribuição normal.

A avaliação da bioequivalência pode ser feita através de intervalos de confiança (IC) ou de teste de hipóteses. Existem vários métodos paramétricos e não-paramétricos para a construção de intervalos de confiança e de teste de hipóteses. A seguir, apresentamos somente os métodos paramétrico e não-paramétrico padrões para cada tipo de inferência estatística.

3.3.1. Intervalo de confiança

Para a decisão de bioequivalência através do intervalo de confiança, a seguinte ação será tomada:

Se um intervalo de $100(1-2\alpha)\%$ de confiança para a diferença $(\mu_T - \mu_R)$ ou para a razão (μ_T / μ_R) está dentro dos limites aceitáveis recomendados pela agência reguladora, isto é, nos intervalos $[\theta_{\text{inf}}; \theta_{\text{sup}}]$ ou $[\delta_{\text{inf}}; \delta_{\text{sup}}]$, respectivamente, então a conclusão é que há bioequivalência; caso contrário, conclui-se pela não existência de bioequivalência

Se a regra de $\pm 20\%$ é adotada para medidas farmacocinéticas sem transformação, o nível de significância é usualmente escolhido como 5% ($\alpha=0,05$) e o coeficiente de 90% de confiança é utilizado para $\mu_T - \mu_R$ ou para μ_T / μ_R . Para medida farmacocinética com transformação logarítmica, usando a regra 80/125, o nível de significância a ser escolhido também é usualmente de 5%, resultando um intervalo de 90% de confiança para $\mu_T - \mu_R$ ou para $\tilde{\mu}_T / \tilde{\mu}_R$.

O intervalo de confiança $100(1-2\alpha)\%$, (L_1, U_1) para $\mu_R - \mu_T$ significa que se o estudo for repetido por exemplo, B vezes, então $100(1-2\alpha)\%$ vezes, B intervalos aleatórios irão cobrir $\mu_R - \mu_T$, isto é, irá conter $\mu_R - \mu_T$. Ou em termos de probabilidades, $\Pr(\mu_R - \mu_T \in (L_1, U_1)) = 1-2\alpha$.

Para decisão de bioequivalência média, a regra usualmente adotada é que o intervalo de confiança esteja contido no intervalo de bioequivalência. A chance que intervalo com confiança de $100(1-2\alpha)\%$ esteja dentro dos limites de equivalência não é necessariamente maior ou igual a $1-2\alpha$. Se o coeficiente de variação (CV) for grande, o método de intervalo de confiança para decisão de bioequivalência média pode não ter o nível desejado requerido pela agência reguladora.

Apresentamos a seguir, o método paramétrico seguido do não-paramétrico padrões, para a construção do intervalo de confiança para a diferença e a razão de médias. Consideramos o método do intervalo com menor amplitude.

(A) Método paramétrico de intervalo com menor amplitude (*shortest*)

A1: Medida farmacocinética sem transformação

Diferença de médias:

Supondo normalidade da distribuição da medida farmacocinética a ser analisada, o intervalo de confiança para a diferença das médias $\mu_T - \mu_R$ com nível de confiança de $100(1-2\alpha)\%$ é $[LD_{inf}; LD_{sup}]$ sendo os limites calculados como:

$$\left[(\bar{y}_T - \bar{y}_R) - t(\alpha, n_1 + n_2 - 2) \hat{\sigma}_d \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}; (\bar{y}_T - \bar{y}_R) + t(\alpha, n_1 + n_2 - 2) \hat{\sigma}_d \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}} \right] \quad (3.7)$$

onde

\bar{y}_T : média dos mínimos quadrados da formulação teste, definida por (2.10);

\bar{y}_R : média dos mínimos quadrados da formulação de referência, definida por (2.10);

$t(\alpha, n_1+n_2-2)$: percentil de ordem $(1-\alpha)$ da distribuição t de Student com n_1+n_2-2 graus de liberdade ;

$\hat{\sigma}_d = (QM_{intra}/2)^{1/2}$: é o desvio-padrão ponderado da diferença de período de ambas as seqüências definida por (2.14), e QM_{intra} é o desvio-padrão intra-individual ($QM_{intra} = SQ_{intra} / (n_1+n_2-2)$), onde SQ_{intra} é dado pela expressão (2.26);

n_1 : tamanho de amostra da primeira seqüência do experimento cruzado 2x2 e n_2 : tamanho de amostra da segunda seqüência do experimento cruzado 2x2.

Razão entre as médias:

O intervalo de confiança para razão das médias (μ_T / μ_R) com nível de confiança de $100(1-2\alpha)\%$ é calculado a partir dos limites do intervalo de confiança para a diferença das médias $[LD_{inf}; LD_{sup}]$ pelo fato de que $(\mu_T / \mu_R) / \mu_R = (\mu_T / \mu_R) + 1$. Assumindo que m_R possa ser substituído por \bar{y}_R , o intervalo de confiança expresso em percentuais $[LR_{inf}; LR_{sup}]$ é dado por:

$$\left[\left(\frac{LD_{inf}}{\bar{y}_R} + 1 \right) 100\%; \left(\frac{LD_{sup}}{\bar{y}_R} + 1 \right) 100\% \right] \quad (3.8)$$

A2: Medidas farmacocinéticas com transformação logarítmica

Diferença de médias:

Supondo que na escala logarítmica a medida farmacocinética siga a distribuição normal, o intervalo de $100(1-2\alpha)\%$ de confiança para a diferença das médias aritméticas dos log das medidas farmacocinéticas de T e R, $\mu_T - \mu_R$ é obtido da mesma forma que o caso sem transformação. Basta

substituir em (3.7) os valores das estatísticas calculadas na escala logarítmica. O intervalo será denotado por:

$$\left[L\tilde{D}_{inf}; L\tilde{D}_{sup} \right] \quad (3.9)$$

Razão entre as médias:

O intervalo de 100(1-2α)% de confiança para razão das médias (μ_T / μ_R) é calculado a partir dos limites do intervalo de confiança para a diferença das médias $[Ldif_{inf}, Ldif_{sup}]$ dado por (3.8) e seus limites $[L\tilde{R}_{inf}; L\tilde{R}_{sup}]$ são expressos por:

$$[\exp \{LD_{inf}\}; \exp \{LD_{sup}\}] \quad (3.10)$$

Regra de decisão sobre bioequivalência com Intervalos de Confiança paramétricos

Conclui-se por bioequivalência se:

$$(LD_{inf}; LD_{sup}) \text{ ou } (L\tilde{D}_{inf}; L\tilde{D}_{sup}) \text{ está contido no intervalo } (\theta_{inf}; \theta_{sup})$$

ou

$$(LR_{inf}; LR_{sup}) \text{ ou } (L\tilde{R}_{inf}; L\tilde{R}_{sup}) \text{ está contido em } (\delta_{inf}; \delta_{sup})$$

onde $(\theta_{inf}; \theta_{sup})$ e $(\delta_{inf}; \delta_{sup})$ são fornecidos na Tabela 3.1

A decisão de bioequivalência é verificada nas condições apresentadas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Condições de bioequivalência para a diferença e razão das médias com medida farmacocinética com e sem transformação

Transformação	Diferença	Razão
Sem	$(LR_{inf}; LR_{sup}) \subset (-0,2 \bar{y}_R; 0,2 \bar{y}_R)$	$(LR_{inf}; LR_{sup}) \subset (80\%; 120\%)$
Com	$(L\tilde{D}_{inf}; L\tilde{D}_{sup}) \subset (-0,2231; 0,2231)$	$(L\tilde{R}_{inf}; L\tilde{R}_{sup}) \subset (80\%; 125\%)$

A chance que intervalo com confiança de 100 (1-2α)% esteja dentro do limite de equivalência não é necessariamente maior ou igual a 1-2α. Se o coeficiente de variação (CV) for grande, o método de intervalo de confiança de bioequivalência media pode não ter o nível desejado requerido pela agência reguladora.

(B) Método não paramétrico baseado no estimador de Hodges-Lehmann

O método não-paramétrico para construção do intervalo de $100(1-2\alpha)\%$ de confiança para a diferença $\theta = \mu_T - \mu_R$ baseado no estimador de Hodges-Lehmann, segue os seguintes passos:

1. Calcular todos os possíveis pares de diferenças das diferenças de períodos entre as seqüências 1 e 2, isto é, para os índices $i = 1, 2, \dots, n_1$ e $j = 1, 2, \dots, n_2$, calcular $D_{ij} = d_{i1} - d_{j2}$, que são estimativas de $\theta = \mu_T - \mu_R$ para todos os pares das diferenças;
2. Ordenar as $n_1 n_2$ diferenças: $D(1) < D(2) < \dots < D(n_1 n_2)$;
3. Calcular a mediana de $\{D(i), i = 1, 2, \dots, n_1 n_2\}$ que é o estimador pontual de $\theta = \mu_T - \mu_R$, conhecido como estimador de Hodges-Lehmann.
4. Identificar os valores de $\{D(i), i = 1, 2, \dots, n_1 n_2\}$ correspondentes aos percentis de ordem α e $1-\alpha$, denotadas por $D(w(\alpha))$ e $D(w(1-\alpha))$, que serão os limites inferior e superior do intervalo de confiança deste método.

O intervalo de confiança para este método é definido pelo seguinte intervalo:

$$[LD_{inf} = D(w(\alpha)); LD_{sup} = D(w(1-\alpha)+1)] \quad (3.11)$$

Regra de decisão sobre bioequivalência

A decisão de bioequivalência é verificada se $D(w(\alpha)) > \theta_{INF}$ e $D(w(1-\alpha)+1) < \theta_{SUP}$

3.3.2. Teste de hipóteses

Para a verificação da bioequivalência, quando comparamos duas formulações R e T, necessitamos formular as hipóteses nula H_0 e alternativa H_a , com o intuito de rejeitar a hipótese H_0 e conseqüentemente estabelecer H_a . Ainda, é necessário fixar o erro do Tipo I, isto é, o erro de concluir bioequivalência entre R e T quando de fato a formulação T não é bioequivalente à formulação R. As hipóteses nula H_0 e alternativa H_a são, portanto:

$$H_0 : \text{não bioequivalência} \quad \text{versus} \quad H_a : \text{bioequivalência.}$$

Estas hipóteses que estabelecem a bioequivalência média entre duas formulações R e T são formuladas em termos de intervalos.

Schuirman (1981) introduziu o uso de hipóteses de intervalo para avaliação de bioequivalência média, que pode ser formulado como dois conjuntos de hipóteses unilaterais:

(A) Dois testes unilaterais t (teste t Schuirmann) - método paramétrico

Sob suposições de normalidade, os dois conjuntos de hipóteses unilaterais (3.12) podem ser testados através de testes *t* unilaterais. Concluímos que T e R são bioequivalentes se:

$$T_{inf} = \frac{(\bar{y}_T - \bar{y}_R) - \theta_{inf}}{\hat{\sigma}_d \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} > t(\alpha, n_1 + n_2 - 2)$$

$$T_{sup} = \frac{(\bar{y}_T - \bar{y}_R) + \theta_{sup}}{\hat{\sigma}_d \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} < -t(\alpha, n_1 + n_2 - 2)$$

(3.14)

onde $t(\alpha, n_1+n_2 - 2)$ é o valor da distribuição t de student com $n_1+n_2 - 2$ graus de liberdade e nível de significância α .

O procedimento dos dois testes *t* unilaterais é operacionalmente equivalente ao intervalo de confiança clássico, isto é, se o intervalo de confiança clássico de $100(1-2\alpha)\%$ para $\mu_T - \mu_R$ está dentro $(\theta_{inf}, \theta_{sup})$, então, ambas as hipóteses H_{01} e H_{02} são também rejeitadas ao nível de significância α pelo procedimento dos dois testes *t* unilaterais.

(B) Dois testes unilaterais de Wilcoxon (teste Wilcoxon-Mann-Whitney (W-M-W)) – método não paramétrico

As hipóteses formuladas em (3.12) para a diferença de médias de T e R são utilizadas no teste não-paramétrico de W-M-W cujos cálculos seguem os seguintes passos:

- 1 - Calcular as diferenças de períodos $d_{ik}, i = 1, 2, \dots, n_k, k = \text{seqüência} = 1, 2;$
- 2 - Obter os estimadores de $\theta_h^* = (\mu_T - \mu_R) - \theta_h$ como funções lineares de $d_{ik}, i = 1, 2, \dots, n_k, k = 1, 2$: $b_{hik} = d_{ik} - \theta_h$ para indivíduos da seqüência 1 (RT) ou $b_{hik} = d_{ik}$ para indivíduos da seqüência 2 (TR). O quadro abaixo mostra os valores de b_{hik} , para $h = \text{inf, sup}$ para o indivíduo i , na seqüência k :

RT	d_{i1}	$b_{inf, i, 1} = d_{i1} - \theta_{inf}$	$b_{sup, i, 1} = d_{i1} - \theta_{sup}$
TR	d_{i2}	$b_{inf, i, 2} = d_{i2}$	$b_{sup, i, 2} = d_{i2}$

- 3 - Ordenar $b_{inf, i, 1}, i = 1, 2, \dots, n_1$ e $b_{inf, i, 2}, i = 1, 2, \dots, n_2$ numa amostra combinada e assinalar postos $R(b_{inf, ik})$ aos valores ordenados.
- 4 - Ordenar de $b_{sup, i, 1}, i = 1, 2, \dots, n_1$ e $b_{sup, i, 2}, i = 1, 2, \dots, n_2$ numa amostra combinada e assinalar postos $R(b_{sup, ik})$ aos valores ordenados. Somar os postos $R(b_{inf, ik})$ dos sujeitos da seqüência 1, obtendo R_{inf} e somar os postos $R(b_{sup, ik})$ dos sujeitos da seqüência 1, obtendo R_{sup} .

O teste de W-M-W para as hipóteses de intervalo dado em (3.12) acima é baseado em R_{inf} e R_{sup} . Conclui-se pela bioequivalência média quando:

$$\begin{aligned} W_{\text{inf}} = R_{\text{inf}} - n_1 (n_1 + 1)/2 > w(1-\alpha) \\ \text{e} \\ W_{\text{sup}} = R_{\text{sup}} - n_1 (n_1 + 1)/2 < w(\alpha), \end{aligned} \quad (3.15)$$

onde $w(1-\alpha) = n_1 n_2 - w(\alpha)$ e $w(\alpha)$ são os percentis das distribuições da estatística de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Quando $n_1 + n_2$ é grande e a razão de $n_1/n_2 \cong 0,5$, a aproximação normal pode ser utilizada. Neste caso, a bioequivalência média é verificada quando:

$$\begin{aligned} Z_{\text{inf}} = [R_{\text{inf}} - 0,5 \times n_1 (n_1 + n_2 + 1)] / [0,0833 \times n_1 \times n_2 (n_1 + n_2 + 1)]^{1/2} > z_\alpha \\ \text{e} \\ Z_{\text{sup}} = [R_{\text{sup}} - 0,5 \times n_1 (n_1 + n_2 + 1)] / [0,0833 \times n_1 \times n_2 (n_1 + n_2 + 1)]^{1/2} > -z_\alpha \end{aligned} \quad (3.16)$$

onde z_α é o valor da normal padronizada, ao nível de significância α .

3.4. Poder dos dois testes unilaterais

O poder de um teste estatístico para verificar a bioequivalência entre duas formulações R e T é definido como a probabilidade de rejeitar a não bioequivalência entre R e T quando a formulação R e T são bioequivalentes.

O poder de um teste está ligado a duas importantes considerações: a primeira, para a fase de planejamento do estudo de bioequivalência, que é cálculo do tamanho de amostra, e a segunda, para comparação entre dois testes de hipóteses, por exemplo, entre teste paramétrico e não-paramétrico. Para o cálculo do poder, em estudos de bioequivalência, necessitam-se dos valores de $\theta = \mu_T - \mu_R$, $\Delta = -\theta_L = \theta_U$ e σ_d^2 ou coeficiente de variação (CV).

- O poder empírico dos dois testes unilaterais t pode ser obtido através do seguinte procedimento:
 - Etapa 1: Gerar amostras de tamanho $n_1 + n_2$ de acordo com o modelo *crossover* reduzido (2.29) com valores pré-estabelecidos de μ_R, μ_T, σ_d^2 e σ_s^2 .
 - Etapa 2: Para um dado Δ , calcular T_{inf} e T_{sup} de (3.14).
 - Etapa 3: Repetir etapas 1 e 2 B vezes.
 - Etapa 4: O poder empírico é a proporção entre as b amostras, tais que $T_{inf} > t$ e $T_{sup} < -t$, onde t é t de student com $n_1 + n_2 - 2$ graus de liberdade.
- O poder empírico dos dois testes unilaterais de Wilcoxon pode ser obtido através do seguinte procedimento:
 - Etapa 1: Gerar amostras de tamanho $n_1 + n_2$ de acordo com o modelo *crossover* reduzido de (2.29) com valores pré-estabelecidos de μ_R, μ_T, σ_d^2 e σ_s^2 .
 - Etapa 2: Para um dado Δ , calcular R_{inf} e R_{sup} e W_{inf} e W_{sup} de (3.15) ou de (3.16).
 - Etapa 3: Repetir etapas 1 e 2 B vezes.
 - Etapa 4: O poder empírico é a proporção entre as b amostras, tais que $W_{inf} > z_\alpha$ e $W_{sup} < -z_\alpha$, onde z é valor normal do padrão com nível de significância α .

Iremos considerar sucintamente o poder dos testes considerados da Seção 3.3.2, A e B. Schuirmann (1987) apresentou a função poder dos testes unilaterais t (Chow e Liu, pág.134, 2ª.edição). O cálculo da função poder pode ser realizado por integração numérica ou através de simulação (poder empírico). Os autores também realizam um pequeno estudo de simulação para comparar os testes unilaterais t e de W-M-W utilizando os poderes empíricos dos dois testes para vários valores de $\theta = \Delta = 20\%$ e do coeficiente de variação (CV). O poder do teste paramétrico é maior que o poder do teste não-paramétrico, embora as diferenças sejam inferiores a 20% em todos os casos considerados. O procedimento para o cálculo do poder empírico dos dois testes é apresentado a seguir.

3.5.Exemplo

Nesta seção ilustramos os conceitos e inferência estatística para avaliação da bioequivalência através dos dados de $ASCt_k$ do exemplo do Capítulo 1. Consideramos para ilustração dos métodos apresentados acima a análise de $ASCt_k$ com e sem transformação, isto é, na escala original e na escala logarítmica. Na prática é necessário apresentar a análise de bioequivalência em apenas uma das escalas, de acordo com o resultado das análises descritiva e de adequabilidade do modelo *crossover*.

Intervalos de bioequivalência:

Como $\bar{y}_R = 430,27$, os limites do intervalo de bioequivalência são $\theta_{inf} = -0,2 \times \bar{y}_R = -0,2 \times 430,27 = -86,05$ e $\theta_{sup} = 0,2 \times \bar{y}_R = 0,2 \times 430,27 = 86,05$. Assim, os intervalos de bioequivalência são:

Escala	Diferença	Razão
<i>Original</i>	$-86,05 < \mu_T - \mu_R < 86,05$ (1)	$0,80 < \mu_T / \mu_R < 1,20$ (2)
<i>Logarítmica</i>	$-0,2231 < \mu_T - \mu_R < 0,2231$ (3)	$0,80 < \tilde{\mu}_T / \tilde{\mu}_R < 1,25$ (4)

(1) e (2) μ_T e μ_R são as médias aritméticas na escala original

(3) μ_T e μ_R são as médias aritméticas na escala logarítmica

(4) $\tilde{\mu}_T$ e $\tilde{\mu}_R$ são as médias geométricas na escala original

Intervalo de bioequivalência: método paramétrico

Os cálculos necessários para se aplicar os métodos paramétricos baseados no intervalo de confiança para as médias e razões das formulações T e R de $ASCt_k$ são:

Transformação	\bar{y}_T	\bar{y}_R	t_c	$\hat{\sigma}_d$	$n_1 = n_2$
<i>Sem</i>	457,01	430,27	1,55	42,23	12
<i>Com</i>	5,99	6,06	-1,61	0,12	12

Os intervalos de confiança e os intervalos de bioequivalência são sumarizados abaixo:

Transformação	Diferença	Razão
<i>Sem</i>	$(-2,87; 56,35) \subset (-86,05; 86,05)$	$(99,33; 113,10) \subset (80%; 120\%)$
<i>Com</i>	$(-0,0046; 0,15) \subset (-0,2231; 0,2231)$	$(99,5%; 116,15\%) \subset (80%; 125\%)$

Portanto, segundo os critérios utilizados para definir os intervalos de bioequivalência, pode-se concluir pela bioequivalência média das formulações T e R, sob a análise da medida farmacocinética $ASCt_k$.

Intervalo de bioequivalência: método não-paramétrico

O intervalo de 90% de confiança não-paramétrico baseado no estimador de Hodges-Lehmann é construído utilizando as $12 \times 12 = 144$ diferenças das diferenças de períodos entre as seqüências 1 e 2 ordenadas. Os limites inferior e superior do intervalo de confiança de 90% são as diferenças correspondentes aos percentis de ordem 5% e 95% da estatística de Wilcoxon-Mann-Whitney para os tamanhos das seqüências n_1 e n_2 (ver Anexo 2).

Os limites do intervalo de 90% de confiança para $\theta = \mu_T - \mu_R$ foram encontrados por $LD_{inf} = D(43) = -8,675$ e por $LD_{sup} = D(w(95\%)+1) = D(102) = 58,84$. Portanto, como temos que $(-8,675;58,84) \subset (-86,05;86,05)$, a bioequivalência entre R e T, considerando análise de $ASCt_k$ é verificada.

Dois testes unilaterais de Schuirmann:

Para testar as hipóteses de diferença e razão (3.12) e (3.13), são necessários os seguintes cálculos sumarizados a seguir.

Transformação	Hipóteses de intervalo das diferenças das médias de T e R	t	Valor-p
Sem	$H_{01}: \mu_T - \mu_R \leq -86,05$ e $H_{02}: \mu_T - \mu_R \geq 86,05$ $H_{a1}: -86,05 < \mu_T - \mu_R < 86,05$ ou $H_{01}: \mu_T / \mu_R \leq 80\%$ e $H_{02}: \mu_T - \mu_R \geq 120\%$ $H_{a1}: 80\% < \mu_T / \mu_R < 120\%$	6,54	<0,0001
	$H_{01}: \mu_T - \mu_R \leq -0,2231$ e $H_{02}: \mu_T - \mu_R \geq 0,2231$ $H_{a1}: -0,2231 < \mu_T - \mu_R < 0,2231$ ou $H_{01}: \mu_T / \mu_R \leq 80\%$ e $H_{02}: \mu_T - \mu_R \geq 125\%$ $H_{a1}: 80\% < \mu_T / \mu_R < 125\%$	28,28	<0,0001
Com	$H_{01}: \mu_T - \mu_R \leq -0,2231$ e $H_{02}: \mu_T - \mu_R \geq 0,2231$ $H_{a1}: -0,2231 < \mu_T - \mu_R < 0,2231$ ou $H_{01}: \mu_T / \mu_R \leq 80\%$ e $H_{02}: \mu_T - \mu_R \geq 125\%$ $H_{a1}: 80\% < \mu_T / \mu_R < 125\%$	-25,05	<0,0001

Portanto, através dos resultados dos testes de Schuirmann, conclui-se pela bioequivalência média de T e R.

O poder empírico dos testes unilaterais t, obtido através de simulação de 1000 amostras, resultou em 0,9520.

Dois testes unilaterais de Wilcoxon-Mann-Whitney (W-M-W)

<i>Hipóteses de intervalo das diferenças das médias de T e R</i>	W_{inf}	$w(0,95)$	W_{sup}	$w(0,05)$
$H_{01}: \mu_T - \mu_R \leq -86,05$ e $H_{02}: \mu_T - \mu_R \geq 86,05$ $H_{a1}: -86,05 < \mu_T - \mu_R < 86,05$	142	101	25	43

Como $W_{sup} < w(0,05)$ e $W_{inf} > w(0,95)$, concluímos pela bioequivalência média entre R e T.

4. ROTEIRO DA ETAPA ESTATÍSTICA EM ENSAIOS DE BIOEQUIVALÊNCIA

4.1. Roteiro da etapa estatística

Sugerimos a apresentação de um relatório de estudo de bioequivalência média contendo as seguintes etapas:

Sugestão do roteiro da etapa estatística

- (A) Apresentação dos dados de concentração plasmática e das medidas farmacocinéticas para as formulações;
- (B) Análise descritiva dos dados acima;
- (C) Avaliação preliminar dos efeitos residuais e dos efeitos fixos;
- (D) Construção de ANOVA de acordo com o resultado obtido no item c);
- (E) Avaliação da bioequivalência através dos intervalos de confiança e testes de hipóteses apropriados;
- (F) Conclusões do estudo;
- (G) Apresentação das referências bibliográficas e computacionais e anexos quando pertinente.

4.2. Ilustração das etapas de análise estatística

A. Apresentação dos dados

As concentrações plasmáticas apresentadas na Introdução nas Tabelas 1.1 e 1.2 serão utilizadas para ilustrar o roteiro de análise estatística. A medida farmacocinética C_{max} das Tabelas 1.3 e 1.4 será utilizada para análise de bioequivalência média entre R e T.

B. Análise descritiva

A avaliação estatística da bioequivalência deve ser iniciada por uma análise descritiva de dados, tanto para as observações originais (medidas de concentração tomadas ao longo do tempo) como para as medidas farmacocinéticas. Além da familiarização com os dados, esta análise preliminar auxilia na verificação de suposições necessárias para a aplicação dos testes estatísticos apresentados neste manual. Portanto, tal análise é importante pela possibilidade de melhor tomada de decisão nas análises subsequentes para determinar se há bioequivalência entre as formulações comparadas (R e T).

A análise preliminar consiste na avaliação quantitativa e gráfica. Na primeira são utilizadas estatísticas sumárias (média aritmética, denominada simplesmente por média, desvio-padrão, erro-padrão, coeficiente de variação (CV), mediana, valores máximo e mínimo, etc.) enquanto que os gráficos mais usuais são: gráfico de linhas ou de perfil, histograma, diagrama de caixas (*boxplot*), gráfico de probabilidade normal, entre outros. No Anexo 1 são apresentados os conceitos básicos de algumas estatísticas descritivas.

B1. Análise descritiva das concentrações plasmáticas

A análise descritiva das concentrações permite visualizar as diferenças entre as formulações R e T utilizando os dados originais obtidos através do ensaio *crossover* 2x2, isto é, as concentrações dos voluntários em intervalos de tempo previamente fixados no planejamento.

Para a visualização do comportamento das concentrações ao longo do tempo, que refletem a absorção, distribuição e eliminação dos medicamentos R e T, recomenda-se utilizar o gráfico das médias das concentrações em função do tempo. Uma forma interessante consiste em adicionar a este gráfico a variação de ± 2 erros-padrão, o que reflete a variabilidade das médias.

Os dados hipotéticos das tabelas 1.1 e 1.2 serão utilizados para ilustrar as estatísticas sumárias e os gráficos citados acima (ver tabelas 4.1 e 4.2 e figuras 4.1 e 4.2).

Tabela 4.1. Estatísticas das concentrações plasmáticas (ng/ml) ao longo do tempo (horas) do medicamento de referência (R) em 24 voluntários

Tempo	Média	Mediana	Desvio-Padrão	Erro-Padrão	CV(%)	Mínimo	Máximo
0	0,00	0,00	0,00	0,00	-	0,00	0,00
0,5	6,99	0,00	10,85	2,22	155,33	0,00	32,50
1,0	75,45	43,25	95,16	19,42	126,12	0,00	357,10
1,5	148,15	115,20	116,04	24,20	78,32	0,00	515,50
2	149,86	146,30	75,61	15,43	50,45	23,50	317,20
2,5	128,12	117,95	75,42	15,39	58,86	25,10	297,40
3	91,08	65,90	56,46	11,52	61,99	14,20	217,90
3,5	69,93	56,90	47,28	9,65	67,60	11,50	177,90
4	35,24	29,30	24,62	5,03	69,88	0,00	81,30
6	15,04	13,70	13,26	2,71	88,14	0,00	37,20
8	7,34	0,00	8,79	1,79	119,70	0,00	22,80
10	2,87	0,00	5,86	1,20	204,56	0,00	17,50
12	0,69	0,00	3,37	0,69	489,90	0,00	16,50

Tabela 4.2. Estatísticas das concentrações plasmáticas (ng/ml) ao longo do tempo (horas) do medicamento teste (T) em 24 voluntários

Tempo	Média	Mediana	Desvio-Padrão	Erro-Padrão	CV(%)	Mínimo	Máximo
0	0,00	0,00	0,00	0,00	-	0,00	0,00
0,5	17,24	0,00	29,76	6,07	172,59	0,00	129,70
1,0	85,81	56,30	87,92	17,95	102,46	0,00	291,40
1,5	180,17	188,40	118,08	24,10	65,54	12,40	586,20
2	187,76	200,25	87,47	17,85	46,59	38,90	335,50
2,5	118,49	93,40	67,03	13,68	56,57	22,50	297,70
3	87,66	63,90	68,87	14,06	78,57	23,70	324,50
3,5	49,29	43,40	27,46	5,61	55,71	11,30	116,90
4	33,42	27,80	19,61	4,00	58,67	10,70	88,20
6	15,26	15,35	11,58	2,36	75,87	0,00	39,20
8	8,39	8,95	8,70	1,77	103,67	0,00	23,20
10	2,36	0,00	5,47	1,12	231,37	0,00	17,10
12	0,00	0,00	0,00	0,00	-	0,00	0,00

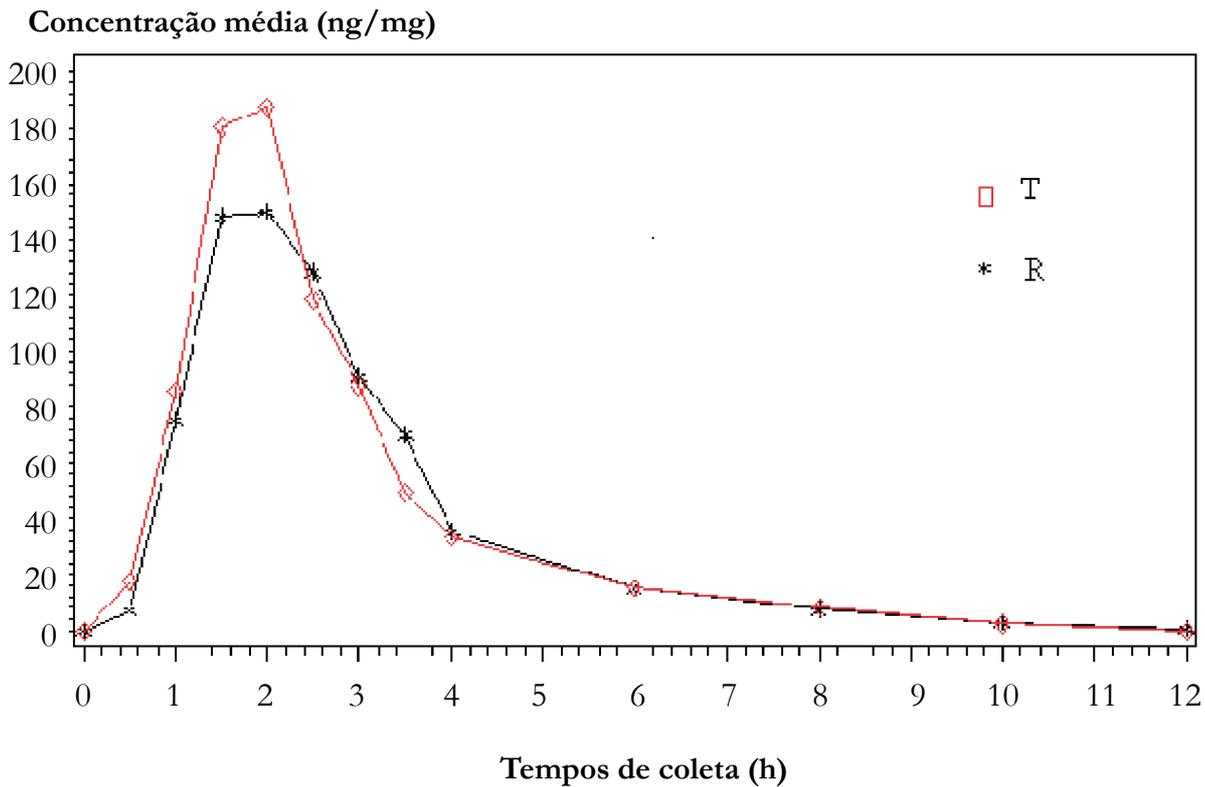


Figura 4.1. Curva de concentração plasmática média de dois medicamentos (R=Referência e T=Teste) baseada em 24 voluntários

Concentração média (ng/mg)

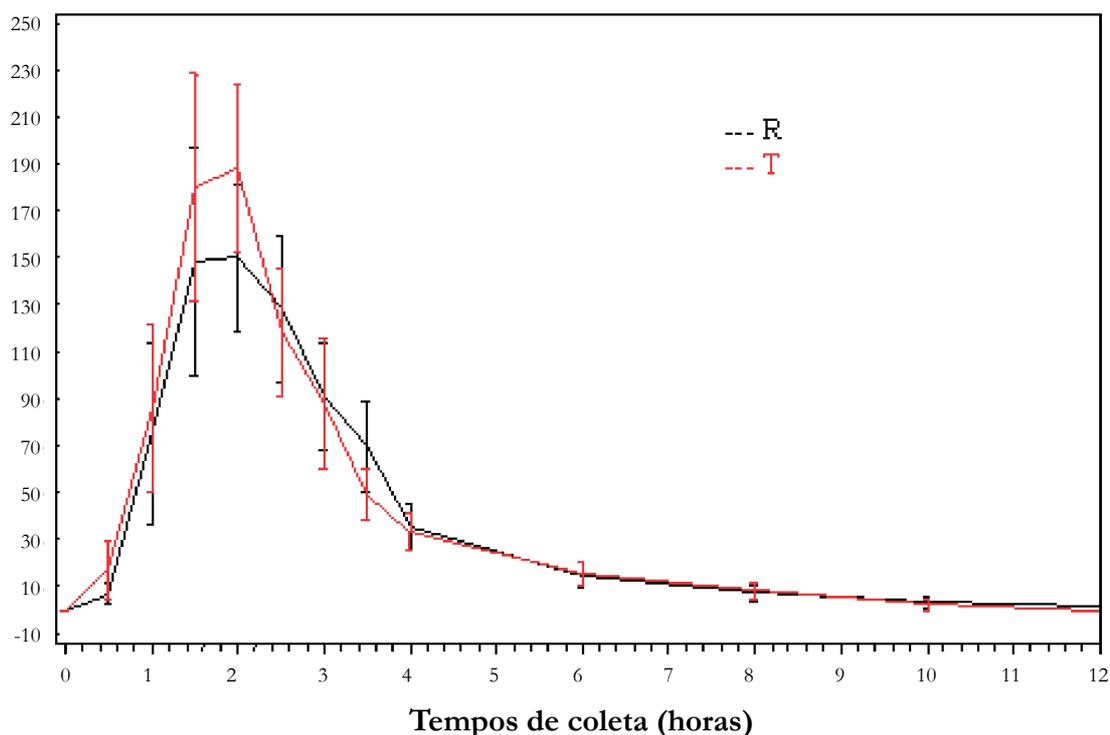


Figura 4.2. Curvas de concentração plasmática (média \pm 2 erros-padrão) de dois medicamentos (R=Referência e T=Teste) baseada em 24 voluntários

Pode-se observar que as médias, medianas e desvios-padrão crescem e depois decrescem ao longo do tempo, refletindo o comportamento natural do fármaco no organismo referentes às fases de absorção até eliminação.

Nota-se grande variabilidade das medidas de concentração, especialmente na vizinhança de C_{max} , ou seja, nos tempos correspondentes às maiores concentrações. Também pode-se perceber valores altos para os coeficientes de variação (CV), o que significa uma grande heterogeneidade dos indivíduos quanto às concentrações plasmáticas.

B2. Análise descritiva das medidas farmacocinéticas

A análise descritiva prossegue para as medidas farmacocinéticas correspondentes às concentrações plasmáticas individuais e às concentrações médias dos voluntários. Essas medidas resumem os dados multivariados (concentrações plasmáticas repetidas ao longo do tempo) em observações univariadas, as quais refletem o comportamento de absorção e eliminação dos fármacos R e T.

As estatísticas para as concentrações individuais estão apresentadas nas tabelas 4.3 e 4.4 e para as médias das concentrações na Tabela 4.5.

Tabela 4.3. Estatísticas das medidas farmacocinéticas do medicamento referência (R)

Medida Farmacocinética	Média	Mediana	Erro-Padrão	CV(%)	Mínimo	Máximo
Tmax	1,92	2,00	0,12	31,41	1,00	3,50
Cmax	229,73	207,55	17,78	37,91	117,60	515,50
K_e	0,57	0,45	0,07	63,90	0,08	1,21
$t_{1/2}$	2,01	1,56	0,36	88,24	0,57	8,66
ASC _{t_k}	430,27	397,78	33,36	37,98	175,25	765,05
ASC _∞	466,18	416,14	37,68	39,59	182,85	798,33

Tabela 4.4. Estatísticas das medidas farmacocinéticas do medicamento teste (T)

Medida Farmacocinética	Média	Mediana	Erro-Padrão	CV(%)	Mínimo	Máximo
Tmax	1,75	2,00	0,10	27,94	1,00	3,00
Cmax	247,72	238,55	19,68	38,92	117,00	586,20
K_e	0,44	0,38	0,06	68,00	0,07	1,19
$t_{1/2}$	2,53	1,84	0,41	80,13	0,58	9,55
ASC _{t_k}	457,01	449,14	33,23	35,62	225,38	844,33
ASC _∞	495,21	518,33	36,01	35,62	233,71	926,39

Tabela 4. Medidas farmacocinéticas das médias das concentrações plasmáticas dos medicamentos de referência (R) e teste (T)

Medicamento	Tmax	Cmax	K_e	$T_{1/2}$	ASC _{t_k}	ASC _∞
R	2,0	149,85	0,4766	1,4545	430,02	431,46
T	2,0	187,76	0,4274	1,6220	457,00	457,01

Observa-se um mesmo padrão das medidas farmacocinéticas para os dois medicamentos (R e T) que também é parecido com o da média. Os valores dos coeficientes de variação diminuíram sensivelmente comparados com os CVs das concentrações plasmáticas.

As estatísticas sumárias foram calculadas para todas as medidas farmacocinéticas, embora a análise deva prosseguir somente utilizando as medidas farmacocinéticas Cmax, ASC_{t_k} e Tmax. Este último pode ser dispensado, caso não apresente relevância clínica para o fármaco em estudo.

B3: Análise descritiva de Cmax

A análise descritiva de Cmax foi apresentada nas tabelas 4.3 e 4.4. A Figura 4.3 mostra a tendência das médias de Cmax dos 24 voluntários do exemplo hipotético das tabelas 1.1 e 1.2.

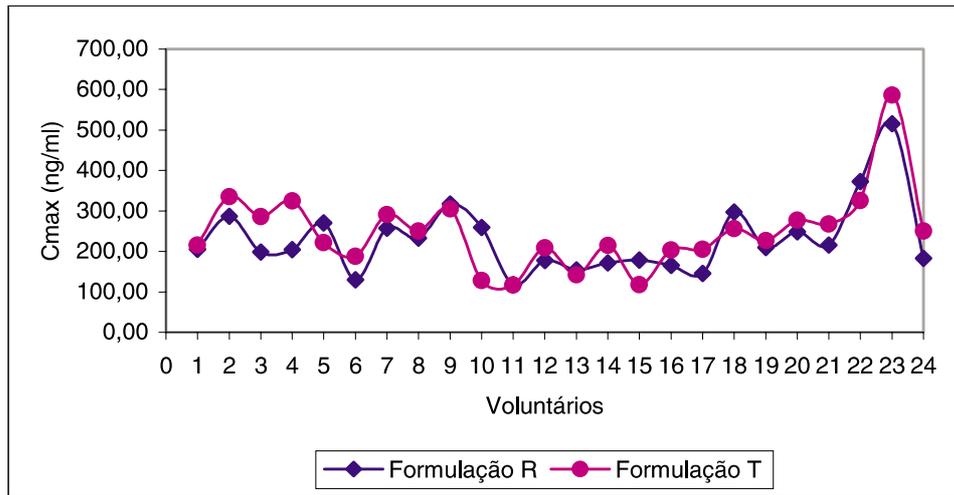


Figura 4.3. Cmax por voluntários nas formulações R e T

Para a verificação do pressuposto de normalidade de Cmax, necessário para o uso de modelos estatísticos do *crossover* e do teste de bioequivalência média (capítulos 2 e 3), ou para a indicação da necessidade de transformação (usualmente a logarítmica), os gráficos usuais são: histograma (Figuras 4.4), *boxplot* (Figura 4.5) e gráfico de probabilidade normal (Figura 4.6) e ainda, os resultados do teste de Shapiro-Wilks para avaliar a suposição de normalidade. Nesta avaliação serão considerados os dados tanto na escala original quanto para a escala logarítmica (base natural).

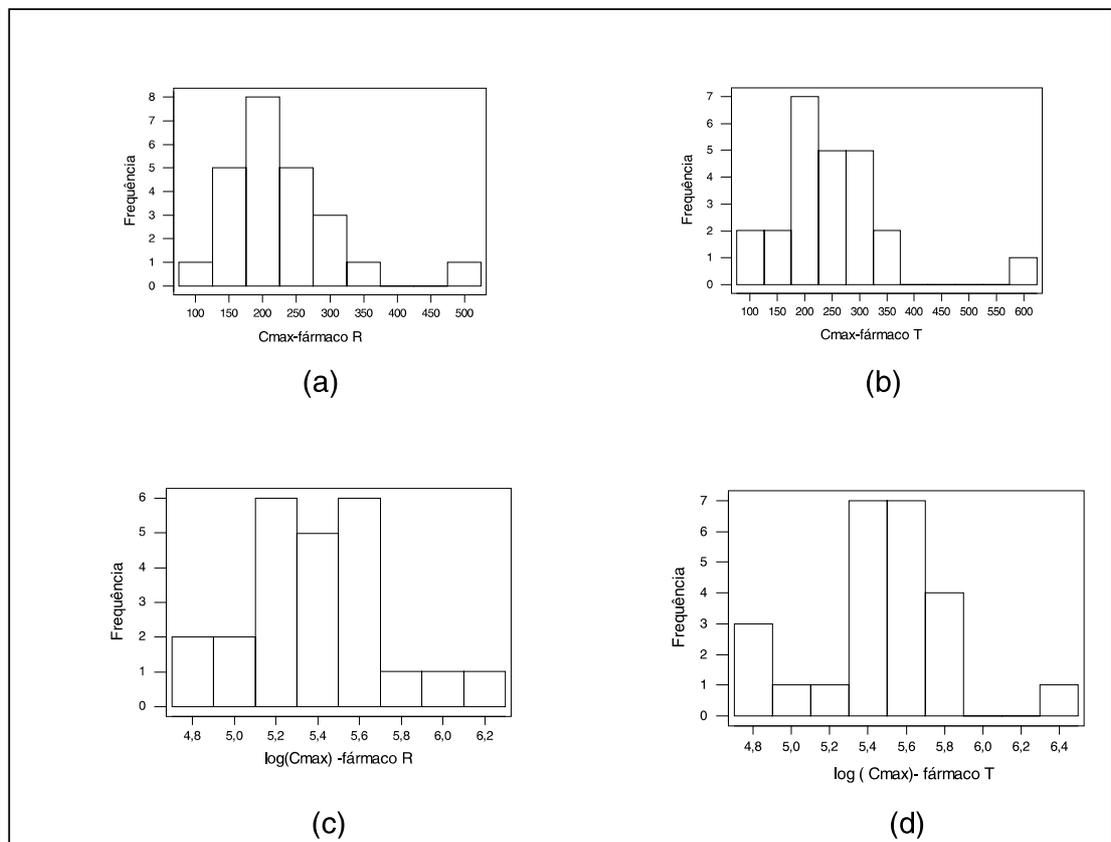


Figura 4.4. Histogramas de Cmax para os dois medicamentos nas escalas original, (a) e (b) e logarítmica, (c) e (d)

Os histogramas não discriminam diferenças entre a distribuição das observações com ou sem transformação, com relação à simetria, devido ao tamanho da amostra ser muito pequeno.

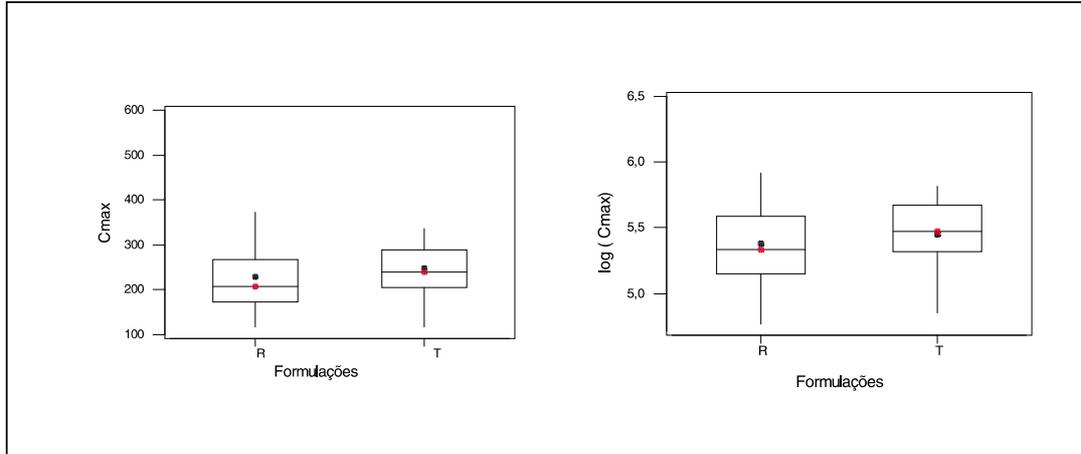


Figura 4.5. *Boxplots* para Cmax e log(Cmax)

Os diagramas de caixas dos fármacos R e T não revelam diferenças em relação às medidas centrais como a média e a mediana, e nem com relação à variabilidade, parecendo haver simetria, tanto em R como em T. Observa-se ainda, a ausência de valores discrepantes nas observações de Cmax.

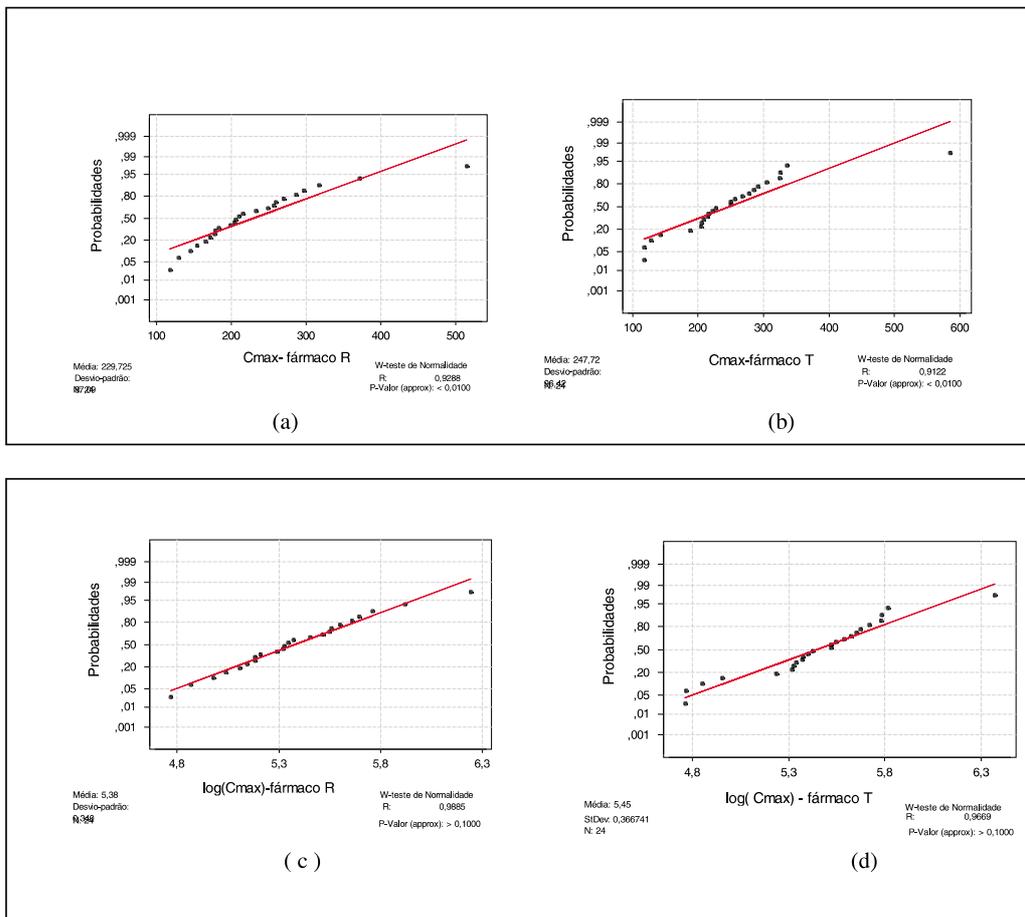


Figura 4.6. Gráfico de probabilidade normal para Cmax (a-b) e log(Cmax) (c-d)

Pode-se verificar melhor ajuste de normalidade na medida C_{max} com transformação logarítmica. Testes de Shapiro-Wilks resultaram não-significantes ao nível de $\alpha = 0,05$, para C_{max} com transformação (valor-p > 0,10), isto é, não rejeita-se as hipóteses de normalidade de $\log(C_{max})$ nos fármacos R e T.

C. Análise preliminar dos efeitos

Para a análise preliminar da medida farmacocinética C_{max} obtemos as médias para as formulações R e T nas seqüências 1 e 2, seguindo o quadro do exemplo 2.3, no Capítulo 2.

Tabela 4.6. Médias das formulações R e T nas seqüências 1 e 2 (desvios-padrões)

Seqüência	Período 1	Período 2	Média
1 (RT)	232,45	240,58	236,52 (107,89)
2 (TR)	254,86	227,00	240,93 (73,48)
Média	243,65 (82,11)	233,79 (101,27)	238,72

Estas médias podem ser visualizadas na Figura 4.7 abaixo:

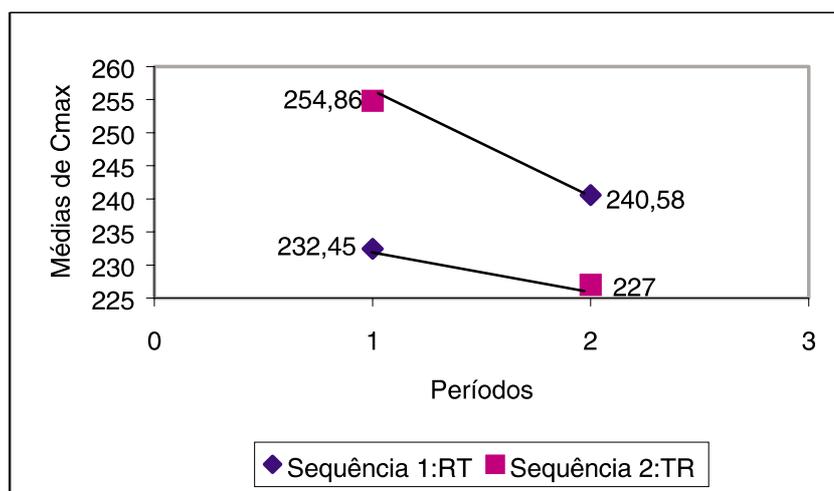


Figura 4.7. Médias de C_{max} por períodos e seqüências

Observe que as diferenças entre as média de R e T dentro de cada período não são iguais, e as médias de T são superiores às médias de R nos dois períodos. As retas que unem as médias de T e R não sendo paralelas podem indicar interação entre período e droga ou existência de efeitos residuais.

A interação representa o efeito da droga, em ensaios crossover 2 x 2, na ausência de efeitos residuais. Portanto, é necessário um teste preliminar para verificar a presença ou não dos efeitos residuais; para este teste é aconselhável considerar $\alpha = 0,10$. O teste preliminar dos efeitos residuais é um teste t para duas amostras independentes (secção 2.2.1) e resultou $t = 0,12$ (valor-p=0,9050), indicando a não existência de efeitos residuais ($\alpha = 0,10$). Em conseqüência, as medidas C_{max} dos dois períodos podem ser consideradas para análise de bioequivalência.

Os testes preliminares dos efeitos fixos (teste t para dados pareados), conforme Seção 2.2, indicaram que os efeitos de período e de formulação foram não-significantes ao nível de significância de $\alpha = 0,05$, como mostra a Tabela 4.7.

Tabela 4.7. Resultados preliminares dos efeitos fixos

Efeito	Teste estatístico	Valor-p
Período	0,87	0,3944
Formulação	1,59	0,1272

A tabela 4.8 apresenta a média de Cmax das formulações R e T e os desvios-padrões de Cmax.

Tabela 4.8. Médias de Cmax das formulações R e T

Formulação	Média	Desvio-padrão
R	229,73	87,09
T	247,72	96,42

Como os efeitos residuais não são significantes ao nível de significância 10%, podemos prosseguir a análise utilizando dados dos dois períodos, com o modelo de análise de variância para ensaios *crossover* 2x2, utilizando Cmax com transformação logarítmica, como foi sugerido pela análise descritiva.

D. ANOVA para log(Cmax)

O modelo multiplicativo (2.1) foi ajustado para Cmax, produzindo os resultados da Tabela 4.9.

Tabela 4.9. ANOVA para log(Cmax)

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	Valor-p
Inter-individual					
<i>Residual</i> <i>(Seqüência)</i>	1	0,02	0,02	0,09	0,76
<i>Resíduos (inter)</i>	22	4,94	0,22	6,66	<0,0001
Intra-individual					
<i>Droga</i>	1	0,06	0,06	1,70	0,21
<i>Período</i>	1	0,06	0,06	1,70	0,21
<i>Resíduos (intra)</i>	22	0,74	0,03		
Total	47	5,82			

Conclui-se que o efeito da seqüência não é significativo (valor-p = 0,76), ao nível de significância de $\alpha = 0,10$. Note-se também, que o teste de variabilidade inter-indivíduos resultou significativo (valor-p < 0,0001), indicando presença de variabilidade entre indivíduos.

O modelo do qual resultou a Tabela 4.9 pode ser reescrito, eliminando o efeito de seqüência, contendo somente os efeitos fixos. O modelo reduzido produz a ANOVA da Tabela 4.10.

Tabela 4.10. Modelo multiplicativo reduzido- log(Cmax)

<i>Fonte</i>	<i>g.l.</i>	<i>SS</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>Valor-p</i>
<i>Inter-individual</i>	23	4,96	0,22	6,39	<0,0001
<i>Intra-individual</i>					
<i>Droga</i>	1	0,06	0,06	1,70	0,21
<i>Período</i>	1	0,06	0,06	1,70	0,21
<i>Resíduos (intra)</i>	22	0,74	0,03		
<i>Total</i>	47	5,82			

Nota-se que o efeito de período é não-significante (valor-p = 0,21); embora o quadro de ANOVA acima mostre efeito não-significante da droga (valor-p = 0,21), indicando igualdade nas médias de biodisponibilidade entre as duas formulações, este resultado não implica na bioequivalência média entre as duas formulações.

O ajuste e a verificação das pressuposições do modelo *crossover* são realizados através da análise de resíduos. Os resíduos intra e extra-indivíduos são obtidos do modelo *crossover* reduzido, (2.29), bem com os valores preditos do modelo. Os gráficos probabilísticos normais são utilizados para verificar a normalidade dos resíduos enquanto que o gráfico dos resíduos intra-indivíduos versus valores preditos é utilizado para verificar a adequabilidade do modelo. Os testes de normalidade de Shapiro-Wilks (S-W) ou Anderson-Darling (A-D) podem complementar a verificação da normalidade, e o coeficiente de correlação de Pearson, a verificação da pressuposição de independência entre os resíduos intra e inter indivíduos.

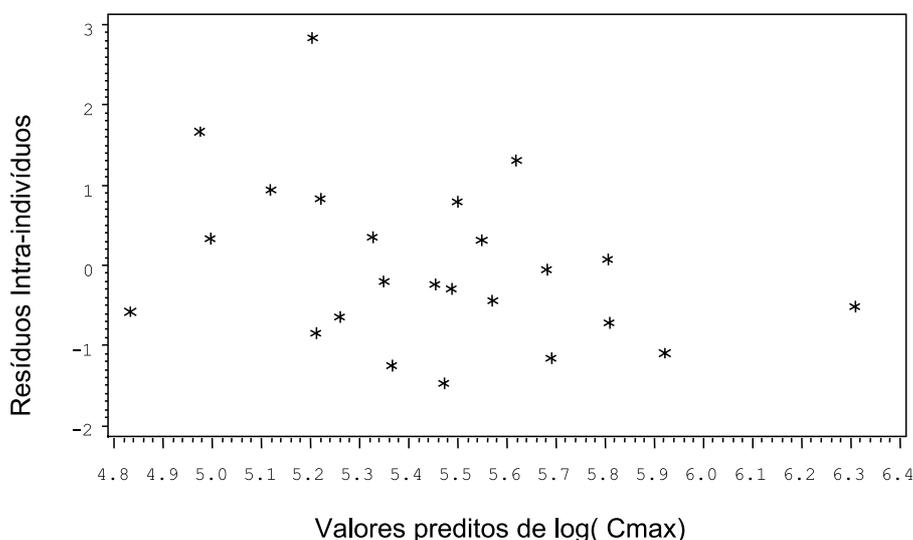


Figura 4.8. Resíduos intra-indivíduos versus valores preditos para log(Cmax)

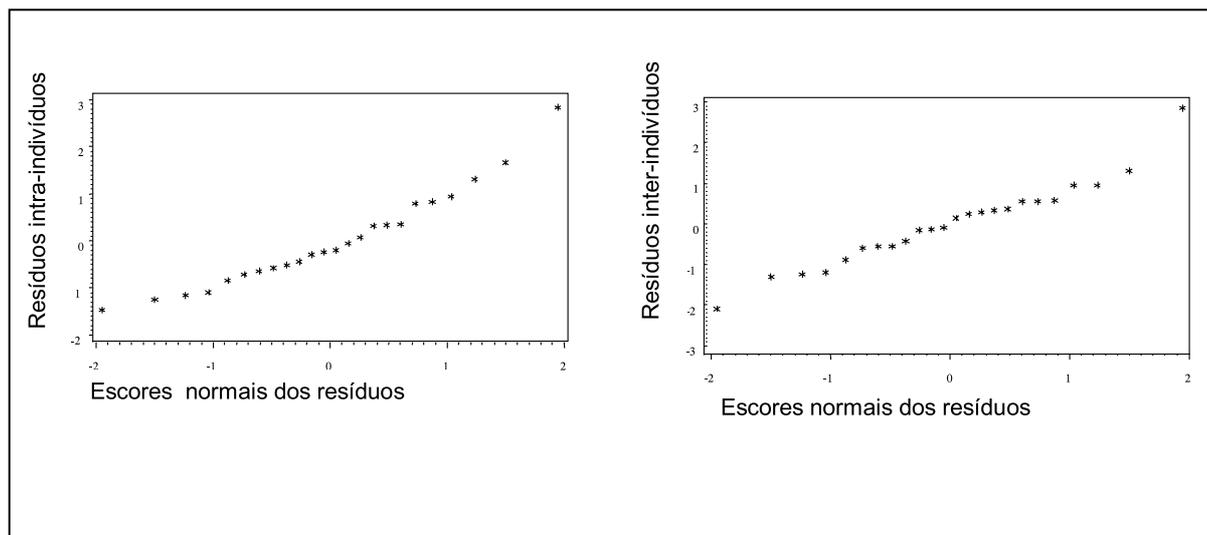


Figura 4.9. Gráficos das probabilidades normais dos resíduos versus escores normais

Os resíduos intra-indivíduos versus valores preditos de $\log(C_{max})$ da Figura 4.8 revelam constância das variâncias dos resíduos, observada pela dispersão constante dos pontos em torno do eixo horizontal em zero, indicando adequabilidade do modelo.

Os gráficos de probabilidade normais dos resíduos da Figura 4.9 revelam tendências lineares, que podem indicar normalidades dos resíduos; os testes de normalidade dos resíduos resultaram não-significantes (K-S: valor-p = 0,15 e A-D: valor-p = 0,25).

Os resíduos intra e inter-indivíduos não apresentam evidências de que não sejam independentes, desde que o teste de coeficiente de correlação de Pearson nulo resultou não-significante (valor-p = 0,106). O coeficiente de correlação foi estimado em $-0,35$.

Portanto, as pressuposições do modelo multiplicativo para C_{max} foram integralmente atendidas; investigado o modelo aditivo para C_{max} , os resíduos inter-indivíduos indicaram não-normalidade, não atendendo por consequência todas as pressuposições do modelo.

E. Intervalos de confiança e testes de hipóteses utilizando $\log(C_{max})$

A avaliação da bioequivalência entre as duas formulações, pode ser realizada utilizando métodos paramétricos de intervalos de confiança para as diferenças ou razão das médias dos fármacos R e T (método *shortest*, (3.7)), e de testes de hipóteses por intervalos (método proposto por Shuirmann, (3.14)). A análise paramétrica pode ser complementada pela análise não-paramétrica (para IC, método de Estimador de H-L, (3.11), e para Testes de hipóteses, método de Wilcoxon-Mann-Whitney, (3.15)), embora não seja necessária se houver indicações claras de ajuste do modelo *crossover*.

Os resultados dos intervalos de confiança são apresentados na Tabela 4.11 e testes de hipóteses são apresentados na Tabela 4.12.

Tabela 4.11. Intervalos de confiança paramétricos para a diferença e razão das médias e não-paramétrico das formulações R e T utilizando log(Cmax).

<i>Parâmetro</i>	<i>Método</i>	<i>Estimativa</i>	<i>IC 90% (Inf; Sup)</i>	<i>Limites de Equivalência (θ_{inf}; θ_{sup})</i>	<i>Conclusão (***)</i>
$\mu_T - \mu_R$ (*)	Paramétrico (multiplicativo)	0,069	(-0,022;0,16)	(- 0,2231;0,2231)	BE
$\mu_T - \mu_R$ (*)	Não-paramétrico	23,06	(-1,1;38,27)	(-45,95;45,95)	BE
μ_T / μ_R (**)	Paramétrico (multiplicativo)	101,29	(97,83;117,37)	(80%;125%)	BE

(*) médias na escala logarítmica

(**) médias geométricas na escala original

(***) BE= Bioequivalência

Os intervalos de confiança paramétricos estão dentro dos limites de equivalência para a diferença e para a razão. Portanto, podemos concluir que existe bioequivalência média entre as formulações R e T, quando Cmax é analisada.

Os testes estatísticos realizados para verificar a bioequivalência média foram os testes estatístico de intervalos, paramétrico para a razão e não-paramétrico para a diferença. As hipóteses para o teste da razão são as seguintes:

$$H_{01}: \mu_T / \mu_R \leq 80 \text{ e } H_{02}: \mu_T / \mu_R \geq 125$$

versus

$$H_{0a}: \mu_T / \mu_R > 80 \text{ e } H_{0a}: \mu_T / \mu_R < 125.$$

As médias de log(Cmax) para as formulações R e T são dadas por $\bar{y}_R = 5,38$ e $\bar{y}_T = 5,45$ e o estimador do desvio-padrão das diferenças dos períodos $\hat{\sigma}_d = 0,13$. Os resultados do teste por intervalo, apresentado no Capítulo 3, são mostrados na Tabela 4.12. As hipóteses para a diferença das médias são:

$$H_{01}: \mu_T - \mu_R \leq 45,95 \text{ e } H_{02}: \mu_T - \mu_R \geq 45,95$$

versus

$$H_{0a}: \mu_T - \mu_R > 45,95 \text{ e } H_{0a}: \mu_T - \mu_R < 45,95.$$

As médias de Cmax para as formulações R e T são dadas na Tabela 4.8 ($\bar{y}_R = 229,73$ e $\bar{y}_T = 247,72$); ainda, as estatísticas de Wilcoxon para as duas funções lineares da diferença de Cmax entre períodos são $R_{inf} = 213$ e $R_{sup} = 108$. Os valores do teste de W-M-W produzem resultados mostrados na Tabela 4.12; a decisão também pode ser realizada porque $W_{inf} > 101$ e $W_{sup} < 43$, sendo 43 e 101 os valores do quinto e nonagésimo quinto percentis da tabela de W-M-W (Apêndice A-5 de Chow e Liu, 2001), quando $n_1 = n_2 = 12$. Portanto, conclui-se que ambas as hipóteses H_{01} e H_{02} são rejeitadas ao nível significativo de 5%.

Tabela 4.12. Testes de hipóteses paramétrico para a razão das médias e não-paramétrico para a diferença das médias

Medida Farmacocinética	Hipóteses	Teste (Valor-p)		Conclusão (*)
		Paramétrico	Não Paramétrico	
log(Cmax)	Ho1: $\mu_T/\mu_R \leq 0,80$	2,59 (<0,001)	---	BE
	Ho2: $\mu_T/\mu_R \geq 1,25$	-18,99 (<0,001)	---	BE
Cmax	Ho1: $\mu_T - \mu_R \leq -0,784$	---	135(<0,0001)	BE
	Ho2: $\mu_T - \mu_R \geq 0,784$	---	30 (< 0,0001)	BE

- (1) Testes unilaterais de Schuirmann
- (2) Testes unilaterais de Wilcoxon-Mann-Whitney.
- (*) BE=Bioequivalência

F. CONCLUSÕES

A análise paramétrica de Cmax foi realizada utilizando modelo multiplicativo (com transformação) para o delineamento *crossover*, desde que a análise descritiva sugeriu o uso da transformação logarítmica para Cmax. A verificação das pressuposições do modelo (normalidade dos resíduos intra e inter-indivíduos e independência entre eles) foram satisfeitas para o modelo multiplicativo. Verificou-se efeitos de formulação (R e T) e de período não significantes, e ainda a não existência de efeito *carryover*.

Os intervalos de confiança de 90% para a diferença e razão das médias do modelos paramétricos satisfazem a condição de bioequivalência para Cmax. O intervalo de confiança de 90% para diferença das médias pelo método não-paramétrico também dá suporte à conclusão da bioequivalência média entre R e T.

Testes de hipóteses de intervalos para a razão das médias utilizando log(Cmax) e para a diferença das médias utilizando Cmax resultam significantes ao nível de significância de 5%, indicando a bioequivalência entre R e T.

A bioequivalência média entre as formulações R e T pode ser concluída quando Cmax é analisado, segundo os critérios definidos pela RDC N° 84 de 19/03/2002, com regra de 80/125 % utilizando o modelo paramétrico e o não-paramétrico, utilizando a regra de $\pm 20\%$.

5. OUTRAS CONSIDERAÇÕES SOBRE BIOEQUIVALÊNCIA

Resumimos neste capítulo algumas considerações essenciais e práticas para um estudo de Bioequivalência. Destacamos o problema de dimensionamento de amostra, detecção e tratamento de *outliers*, além de comentários sobre observações faltantes.

5.1. Dimensionamento da amostra

5.1.1. Introdução

Em estudos de bioequivalência, as seguintes questões são de importância fundamental:

1. Quantos indivíduos são necessários a fim de se obter um poder desejado (digamos 80% ou 90%) estabelecendo bioequivalência entre as duas formulações dentro de limites considerados aceitáveis (por exemplo, 20% da média da formulação de referência)?
2. O que se deve fazer se somente um pequeno número de indivíduos estiverem disponíveis para o estudo devido a limitações do orçamento e/ou de algumas considerações médicas?

Para responder a estas perguntas, devemos utilizar uma avaliação da determinação do tamanho da amostra, sendo que o procedimento mais comum consiste em se realizar um pré-estudo do poder baseado na estimativa da variabilidade intra-indivíduos a partir de estudos anteriores. O tamanho de amostra apropriado é escolhido de forma a se garantir um poder desejado para a avaliação da bioequivalência dentro de limites considerados clinicamente importantes.

Teoricamente o tamanho de amostra necessário para realizar um estudo de bioequivalência necessita de algumas informações relativas ao fármaco em estudo, tais como a variabilidade do fármaco nos indivíduos, medida pelo coeficiente de variação CV (%) e o tamanho mínimo do efeito que se quer detectar (por exemplo, magnitude da diferença entre as médias das duas formulações). Estas informações definiriam o desenho a ser utilizado, e em consequência, o cálculo do tamanho de amostra requerido. Entretanto, a obtenção destas informações a priori teoricamente é bastante difícil; na prática, a obtenção pode ser realizada através de um estudo piloto.

A Resolução RE nº 478 de 19 de março de 2002 sugere $n=24$ como o tamanho mínimo da amostra para estudos *crossover* 2 x 2 de bioequivalência média; utilizando a fórmula aproximada de cálculo de tamanho de amostra de Chow e Liu (1992), nota-se (Tabela 5.4.1, de Chow e Liu, 2000), que o tamanho de amostra 24 estaria dentro de uma faixa de percentual de CV de 14% a 22% para $\Delta = 0\%$ ou 5% e poder=80% ou 90%.

A representatividade da população na amostra, ou validade, é assegurada pelo planejamento científico da pesquisa. O processo de amostragem começa com a determinação do tamanho e com a coleta adequada.

5.1.2. Conceitos básicos

Os elementos essenciais para o dimensionamento de amostras são: fixar um nível de confiança α , o tamanho mínimo do efeito que se quer detectar Δ e dentro do contexto de testes de hipóteses, acrescenta-se o poder estatístico do teste β . As fontes desses dados são estudos anteriores realizados em populações e em condições semelhantes.

Em procedimentos mais simples, determina-se o tamanho de amostra adequado baseando-se apenas uma variável de destaque no estudo, o que não garante que seja suficiente para as outras variáveis também de interesse. Como estudos de bioequivalência são baseados em várias medidas farmacocinéticas idealmente, os cálculos devem ser feitos para cada uma delas.

5.1.3. Tamanho de amostra através de hipóteses de intervalo (modificado)

Liu & Chow fornecem uma fórmula aproximada para calcular o tamanho da amostra baseado na função de poder do teste por hipótese de intervalo de Schuirmann. Como o poder para o método de Schuirmann é simétrico em relação a zero, vamos considerar apenas o caso em que $\theta > 0$. Para um nível de confiança de $1-2\alpha$, um poder de $1-\beta$, estimativa $\hat{\sigma}_d$ e limite de bioequivalência pré-fixado Δ quando $0 < \theta = \theta_0 < \Delta$, o tamanho da amostra é dado por:

$$n_l(\theta_0) \geq 2 \left[t_{\alpha, 2n-2} + t_{\beta, 2n-2} \right]^2 \left(\frac{\hat{\sigma}_d}{\Delta - \theta_0} \right)^2 \quad (5.1)$$

onde :

n : tamanho de amostra;

$\Delta = -\theta_{\text{inf}} = \theta_{\text{sup}}$: limites de bioequivalência;

α e β : probabilidades do erro do tipo I e tipo II, respectivamente;

$t_{1-\alpha/2, v}$ e $t_{1-\alpha, v}$: percentis da distribuição t de Student com v graus de liberdade correspondente ao nível de confiança $1-\alpha$, respectivamente para hipóteses bilateral e unilateral;

$t_{1-\beta, v}$: designa o percentil da distribuição t de Student com v graus de liberdade correspondente a um poder $1-\beta$;

$\hat{\sigma}_d = \text{QM}_{\text{intra}} / \sqrt{2}$: estimativa do desvio-padrão ponderado da diferença de período de ambas as seqüências.

Se a regra de $\pm 20\%$ for usada com $\Delta = 0,2 \mu_R$, (5.1) torna-se:

$$n_I(\theta_0) \geq [t_{\alpha, 2n-2} + t_{\beta, 2n-2}]^2 \left(\frac{CV}{20 - \theta'_0} \right)^2 \quad (5.2)$$

onde $\theta'_0 = 100 \times \theta_0 / \mu_R$.

5.2. Observações atípicas em estudos de bioequivalência (*outliers*)

Um dos problemas geralmente encontrados nos estudos de biodisponibilidade e bioequivalência, é o fato do conjunto de dados poder conter valores extremamente altos ou extremamente baixos. Essas observações atípicas (*outliers*) podem representar um grande impacto na avaliação da bioequivalência. Existem basicamente três possíveis tipos de *outliers* nos estudos de bioequivalência:

1. Valores inesperados na curva de concentração plasmática *versus* tempo, para determinados tempos de coleta;
2. Valores extremamente altos ou baixos para determinada formulação (teste ou referência);
3. Indivíduos incomuns que exibem biodisponibilidade muito inferior ou muito superior com relação ao medicamento referência, ou seja, uma diferença muito grande para o comportamento da curva entre as duas formulações, implicando em valores diferenciados para todas as medidas farmacocinéticas avaliadas.

Para o primeiro tipo de *outlier*, Rodda (1986) indicou que as observações inesperadas da curva de concentração plasmática *versus* tempo, normalmente têm um efeito pequeno sobre o cálculo de ASC, e conseqüentemente tem um pequeno efeito na comparação da biodisponibilidade.

O segundo tipo de *outlier* caracteriza-se pela presença de valores muito altos ou muito baixos para a medida avaliada em determinada formulação, em outras palavras, significa que a distância entre os valores da medida farmacocinética para o medicamento teste e o medicamento referência de um determinado indivíduo é muito grande. Esse tipo de *outlier* tem certamente um grande impacto na avaliação comparativa, considerando o critério da bioequivalência média, pelo fato da média ser um estimador muito sensível à presença de valores extremos.

Para o terceiro tipo de *outlier*, similarmente ao segundo caso, como indicado por Chow e Tse (1990), a presença de um indivíduo atípico pode vir a anular a conclusão de bioequivalência do estudo. A constatação de biodisponibilidades extremamente baixas, ou extremamente altas entre os voluntários, pode vir a indicar que a variabilidade da resposta a alguma das formulações não é homogênea.

Portanto, uma análise comparativa de biodisponibilidade, sob a presença de indivíduos potencialmente atípicos, possivelmente pode ter que lidar com a rejeição da bioequivalência entre as formulações testadas, quando na realidade, elas são bioequivalentes. Nesse sentido, a seleção e os critérios para inclusão de voluntários nos estudos podem atuar como fatores determinantes no intuito de evitar a presença de voluntários atípicos nos ensaios de bioequivalência.

Para um determinado conjunto de dados, um indivíduo *outlier* potencial pode ser detectado através da plotagem dos valores da medida farmacocinética avaliada para os diversos voluntários, da formulação teste versus referência (Ex: $C_{max,T} = C_{max,R}$). O indivíduo é detectado em função do seu respectivo ponto apresentar um grande desvio em relação à reta $y = x$. Dessa forma, a construção dos gráficos apresentados nas figuras 5.1 e 5.2 servem como uma análise preliminar para a detecção de potenciais *outliers*.

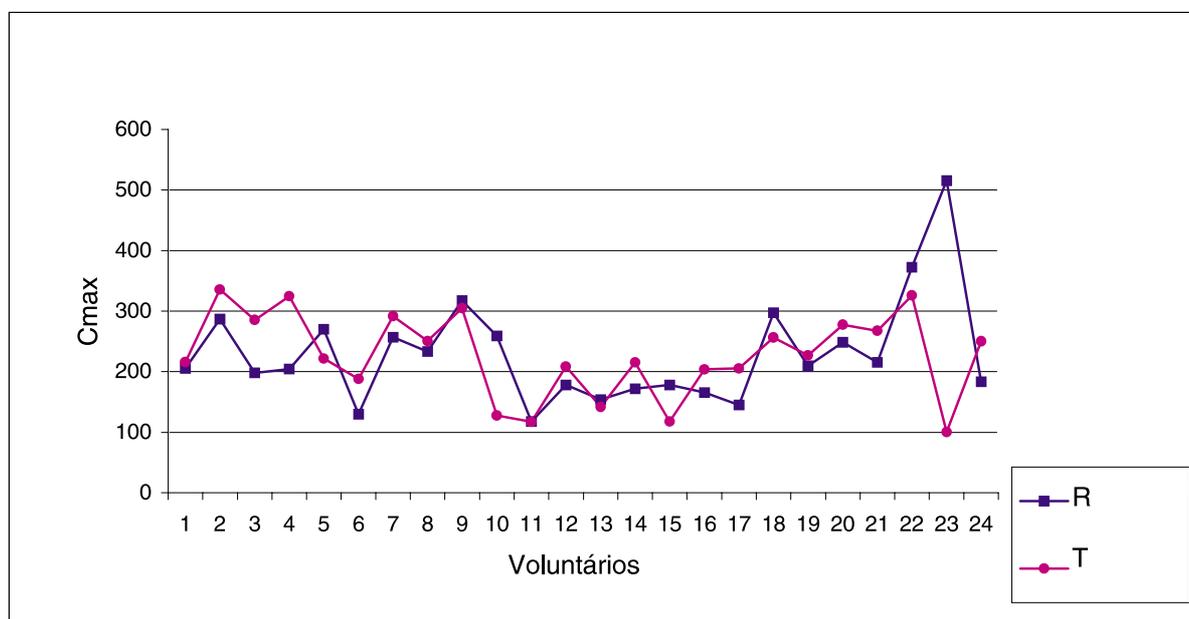


Figura 5.1. Concentração máxima dos 24 voluntários para cada uma das formulações

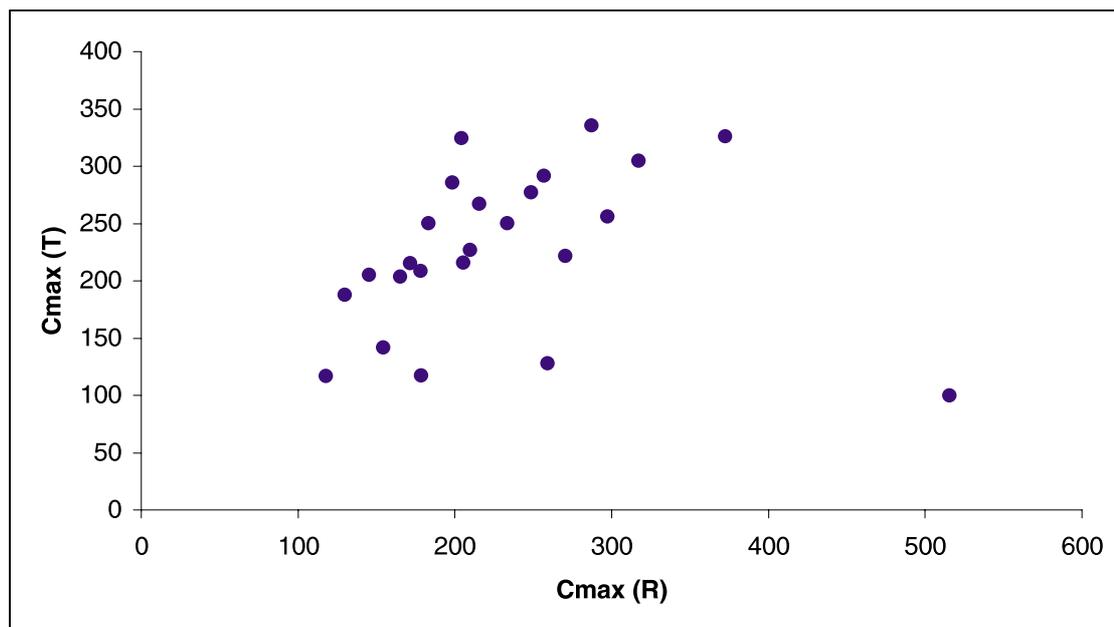


Figura 5.2. Cmax referência versus teste para 24 voluntários

No exemplo ilustrado pela Figura 5.1, observa-se que o voluntário número 23 exibe biodisponibilidades distintas para os medicamentos teste e referência. A Figura 5.2, ilustra o mesmo caso, evidenciando de uma maneira diferente a presença de um possível *outlier*. Esse ponto representa um desvio bastante grande em relação à reta $y=x$.

Uma outra ferramenta visual bastante útil para a identificação de possíveis *outliers* é o diagrama de caixas ou gráfico do tipo *box-plot* (ver Apêndice), pois o mesmo é construído de forma a fornecer informações sobre a simetria e variabilidade dos dados.

Os estudos para detecção de valores potencialmente atípicos têm recebido bastante atenção nas últimas décadas, em particular, o desenvolvimento de métodos para o tratamento de *outliers* em modelos de regressão linear. Como normalmente os estudos de biodisponibilidade não se aplicam à utilização de modelos de regressão linear, torna-se necessário o desenvolvimento de novos métodos que venham a proporcionar maneiras de identificar observações atípicas nesse caso. Uma vez detectada uma observação atípica, a questão de interesse, portanto, é saber qual o peso daquele valor em relação à avaliação da bioequivalência. Com base nas indicações dos órgãos reguladores e nas legislações vigentes, a retirada de voluntários de um estudo em função de seus dados não se apresentarem de maneira similar aos dos outros voluntários sem justificativa convincente pode afetar a validação do estudo. Em muitos casos, não há como precisar se essa aparente não similaridade, é um resultado de erros laboratoriais, erros de transcrição, ou outras causas não relacionadas a bioequivalência. Portanto, a retirada de voluntários do estudo não é recomendada, especialmente para experimentos não replicados. A legislação brasileira preconiza que no caso de retirada de voluntários que apresentarem comportamento discrepante nas medidas de absorção, em relação aos demais voluntários, sua exclusão do estudo deverá ser justificada. Nesse caso, deverão ser apresentados os resultados do estudo com e sem a inclusão de seus dados, no sentido de avaliar o impacto da retirada dessa observação.

5.3. Ocorrência de observações faltantes

Como já foi citado anteriormente, as medidas farmacocinéticas avaliadas na bioequivalência derivam diretamente da curva de concentração do medicamento ao longo do tempo, que é caracterizada pela quantificação de um determinado número de amostras biológicas, relativas a tempos de coleta previamente estabelecidos. Em algumas situações, pode ocorrer a perda de amostras, impossibilitando a quantificação de fármaco em determinado horário de coleta. Essa perda pode ocorrer por motivos diversos, exemplificados a seguir:

- Perda da veia do voluntário durante a coleta;
- Atraso excessivo na coleta para determinado tempo;
- Quebra de tubos durante a centrifugação;
- Quebra de tubos nas fases seguintes.

Nesses casos, recomenda-se que a curva de concentração sanguínea seja obtida sem a interpolação do ponto faltante, o que não compromete a obtenção das medidas farmacocinéticas como área sob a curva de zero ao último tempo de coleta, e a área sob a curva de zero a infinito. Por outro lado, a presença de uma amostra faltante próxima ao valor de concentração máxima pode vir a comprometer a realidade desse parâmetro. De qualquer forma, devem sempre ser considerados os valores que foram quantificados de fato, não devendo existir nenhum tipo de procedimento para a estimação dos valores faltantes. É importante ressaltar que o excesso de valores faltantes pode vir a comprometer a validade do estudo.

5.4. Bioequivalência individual e populacional

O manual abordou toda a análise estatística baseada no critério da bioequivalência média, mas é importante ressaltar a existência dos conceitos relativos a bioequivalências individual e populacional. Esses novos critérios para a avaliação da bioequivalência podem ser bastante úteis em alguns casos.

De acordo com a definição apresentada nos capítulos anteriores, a bioequivalência média focaliza somente a comparação das médias populacionais referentes às medidas farmacocinéticas de interesse. Em contrapartida, os critérios da bioequivalências individual e populacional englobam além das médias, as respectivas variâncias associadas às medidas farmacocinéticas avaliadas.

O critério da bioequivalência populacional leva em consideração a variabilidade total associada à medida de interesse. Já o critério da bioequivalência individual agrega a variabilidade intra-individual nas formulações teste e referência, além do componente de variação associado à interação entre indivíduos e formulação, que equivale a variação entre as médias das formulações T e R devido às diferenças existentes entre os indivíduos.

Hauck & Anderson (1992) apresentam considerações e comparações dos três tipos de bioequivalência, bem como as indicações para a construção dos intervalos de confiança. O Volume I9, do periódico *Statistics in Medicine* de 2000, é dedicado a artigos relacionados à bioequivalência individual.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altman, D. G. (1991) *Practical Statistics for Medical Research*. London: Chapman & Hall.
- Bailar III, J. C., Mosteller, F. (1992) *Medical Uses of Statistics*. 2. ed. Boston-MA: NEJM Books.
- Chow, S.-C., Liu, J.-P (2000) *Design and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies*. New York: Marcel Dekker.
- Chow, S.-C., Tse, S.-K (1990). Outlier Detection in Bioavailability/Bioequivalence Studies. *Statistics in Medicine*, 9, 549-558.
- Jones, B., Kenward, M. G. (1989) *Design and Analysis of Cross Over Trials*. London: Chapman & Hall.
- Grizzle, J.E. (1965). The two-period changeover design and its use in clinical trials. *Biometrics*, 25, 357-381.
- Guidance for Industry – Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products – General Considerations. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administrations. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), October 2000.
- Hauck, W. W., Anderson, S. (1992). Types for Bioequivalence and Related Statistical Considerations. *Internacional Journal of Clinical Pharmacology, Therapy and Toxicology*, 30, 5, 181-187.
- Pagano, M., Gauvreau, K. (2000) *Principles of Biostatistics*. Pacific Grove-CA: Duxbury.
- Resolução – RDC nº 10 de 2 de janeiro de 2001 /ANVISA/Ministério da Saúde.
- Resolução – RDC nº 84 de 19 de março de 2002 /ANVISA/Ministério da Saúde.
- Resolução – RE nº 478 de 19 de março de 2002 /ANVISA/Ministério da Saúde.
- SAS- Statistical Analysis System, versão 8. SAS Institute, Cary,NC.
- Schuirman, D. J. (1981) On hypothesis testing to determine if mean of a normal distribution is continued in a known interval. *Biometrics*, 37, 617 [abstract].
- Soares, J. F., Siqueira, A. L. (1999) *Introdução à Estatística Médica*. Belo Horizonte: DEST-UFMG.
- Storpits, S, Consiglieri V. O. (2000) Bioequivalência de Medicamentos: Objetivos, Parâmetros Farmacocinéticos, Delineamento Experimental e Critério de Avaliação. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 36,1.
- Williams, E. J. (1949). Experimental designs balanced for the residual effects of treatment. *Australian Journal of Scientific Research*, 2, 149-168.

APÊNDICE - CONCEITOS ESTATÍSTICOS BÁSICOS

Apresentamos neste apêndice um resumo de conceitos estatísticos básicos envolvidos neste manual. Destacamos estatísticas descritivas, representação gráfica, noções de inferência estatística e de duas técnicas estatísticas: regressão linear simples e análise de variância.

Notação

X: variável de interesse, por exemplo: Cmax, ASC, Tmax

n : tamanho da amostra

x_1, x_2, \dots, x_n valores observados

I – Estatísticas descritivas

• Média aritmética

A média aritmética \bar{x} é dada por:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

• Média geométrica

A média geométrica \tilde{x} é dada por:

$$\tilde{x} = \sqrt[n]{x_1 \cdot x_2 \cdot \dots \cdot x_n} = \sqrt[n]{\prod_{i=1}^n x_i} = \left(\prod_{i=1}^n x_i\right)^{1/n}$$

Quando se toma a variável X na escala logarítmica, isto é, $Y = \ln X$, tem-se que:

$$\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n} = \frac{\sum_{i=1}^n \ln x_i}{n} = \ln \left(\prod_{i=1}^n x_i\right)^{1/n} = \ln \tilde{x}$$

ou ainda

$$\tilde{x} = \exp\{\bar{y}\}$$

Em palavras, a média aritmética na escala logarítmica é igual ao log da média geométrica na escala original, ou ainda, a média geométrica na escala original é igual ao exponencial da média aritmética na escala logarítmica.

• **Mediana**

Por definição, a mediana é o valor que divide a distribuição ao meio. Em outras palavras, 50% das observações ficam acima da mediana e 50% abaixo.

• **Variância**

A variância s^2 é uma medida da variabilidade dos dados em torno da média e é definida como:

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

• **Desvio-padrão**

Como a unidade da variância é a unidade de medida de X ao quadrado, é usual trabalhar a raiz quadrada da variância, estatística conhecida como desvio-padrão (s), definida como:

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

• **Erro-padrão da média**

O erro-padrão da média $s(\bar{x})$ é dado por

$$s(\bar{x}) = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

e representa o desvio-padrão da distribuição das médias.

• **Coefficiente de variação**

O *coeficiente de variação* (CV), uma medida de variabilidade padronizada pela média, é definido como a razão entre o desvio padrão e a média, isto é:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}}$$

• Percentil

Indica o valor acima ou abaixo do qual se encontra uma determinada porcentagem dos dados. De forma geral, o percentil de ordem x , representado por P_x , é o valor que é precedido (maior ou igual) por $(xn)/100$ dos valores e seguido (menor ou igual) por $(100-x)n/100$. Por exemplo, a mediana é o percentil de ordem 50; o percentil de ordem 90 é precedido por 90% dos valores da distribuição.

Os percentis de ordem 25, 50 e 75 são chamados, respectivamente primeiro, segundo e terceiro quartis porque dividem a distribuição em $1/4$, $2/4 = 1/2$ e $3/4$. São representados por Q_1 , Q_2 e Q_3 e, evidentemente, Q_2 é outra notação para a mediana.

II – Representação gráfica

Apesar de existirem inúmeras formas gráficas interessantes, limitaremos aos tipos de gráficos mais simples, mas bastante úteis para a identificação da forma de um conjunto de dados e de sua descrição: histograma, gráfico de linhas (ou perfis), gráfico de probabilidade, também conhecido como *Q-Q plot* e *boxplot*.

• Histograma

Histograma é um gráfico de barras justapostas em que no eixo horizontal está a variável de interesse, dividida em classes geralmente de mesmo tamanho. No eixo vertical, constrói-se uma barra para cada classe com altura igual à frequência absoluta ou relativa correspondente. A barra é centrada no ponto médio da classe.

• Gráfico de linhas ou de perfis

O gráfico de linhas é uma representação apropriada para dados coletados ao longo do tempo. Consiste em colocar no eixo horizontal do gráfico a escala temporal (hora por exemplo) e no eixo vertical a variável a ser estudada (frequência, taxa ou medida tomada). É usual unir os pontos através de segmentos de reta, daí o nome recebido.

Através desses gráficos é possível constatar algum tipo de tendência e identificar alguns dados atípicos (picos por exemplo).

• Gráfico de probabilidade (Q-Q plot)

O gráfico de probabilidade, também denominado Q-Q plot, disponível em muitos programas de computador é construído de tal forma que se há uma boa aderência dos dados a uma determinada distribuição, por exemplo a normal, as observações estarão alinhadas em torno de uma reta destacada no gráfico. A avaliação pode ser visual ou mais formalmente através de um teste de significância. Neste caso, uma boa aderência fornece um valor-p grande.

• Boxplot

Um tipo de gráfico muito útil para a descrição de dados, visualização de sua variabilidade, comparação entre diferentes grupos é o gráfico em caixas, *boxplot*, em inglês. Foi introduzido pelo estatístico americano John Tukey em 1977.

Para a construção do *boxplot* obtêm-se primeiro as seguintes estatísticas: primeiro quartil (Q_1), mediana (Q_2), terceiro quartil (Q_3) e a distância interquartílica (DQ), definida como $DQ=Q_3 - Q_1$. O *boxplot* é obtido seguindo os seguintes passos:

1. Numa reta são marcados o primeiro quartil (Q_1), a mediana (Q_2) e o terceiro quartil (Q_3).
2. Acima dessa reta constrói-se um retângulo com limites iguais às posições do primeiro e terceiro quartis, cortado por um segmento de reta na posição relativa à mediana.
3. A partir dos limites do retângulo, traçam-se linhas até:
 - (a) encontrar um extremo (valor máximo ou mínimo) ou
 - (b) um valor correspondente a 1,5 DQ, se o extremo correspondente estiver a mais de 1,5 DQ do quartil respectivo.

Os pontos que estão a mais de 1,5 DQ do quartil correspondente até 3,0 DQ são chamados pontos externos e os que estão a mais de 3,0 DQ, pontos soltos.

O *boxplot* também fornece informações importantes sobre o comportamento do conjunto de dados, como simetria e variabilidade. Se a amplitude for muito maior que a distância interquartílica e a mediana estiver mais próxima do primeiro quartil do que do terceiro quartil, há fortes indicações de assimetria positiva e de grande dispersão das observações, além da presença de *outliers*.

III – Inferência estatística

A inferência estatística pode ser avaliada através de estimação (pontual ou por intervalo) e testes de hipóteses, conceitos apresentados a seguir.

• Estimação pontual

O primeiro passo para se ter uma idéia de um parâmetro de uma distribuição (por exemplo, média, desvio-padrão) é obter a estimativa baseada nas observações da amostra. Por exemplo, se X segue uma distribuição $N(\mu, \sigma^2)$, a média amostral \bar{x} estima a média populacional μ , e o desvio padrão amostral s estima σ .

• Intervalo de confiança

Com a construção de intervalos de confiança agregamos ao estimador pontual informação sobre sua variabilidade. Isto é feito escolhendo-se um limite inferior e outro superior para a estimativa. De uma maneira bem geral, a forma do intervalo de confiança para um parâmetro é: estimativa pontual \pm fator \times erro-padrão do estimador. Esse fator é um percentil de uma distribuição de probabilidade.

• Teste de hipóteses

Geralmente podemos formular os problemas através de duas hipóteses: H_0 (hipótese nula) e H_a (hipótese alternativa). Na comparação de dois tratamentos é usual fixar como hipótese nula a inexistência de diferença entre os dois tratamentos comparados. A hipótese nula deve ser comparada com uma hipótese alternativa. Para cada situação existem muitas hipóteses alternativas adequadas, mas a mais usual é a inexistência de igualdade entre os tratamentos. As formulações das hipóteses nula e alternativa para estudos de bioequivalência estão apresentadas no Capítulo 3.

O critério de decisão é baseado na estatística de teste. De uma forma bem genérica e intuitiva podemos dizer que a estatística do teste mede a discrepância entre o que foi observado na amostra e o que seria esperado se a hipótese nula fosse verdadeira. Uma grande distância medida pela distribuição de probabilidade é indicação de que H_0 não é verdadeira, devendo, portanto, ser rejeitada.

• Erros do tipo I e II, nível de significância e poder do teste

Em termos técnicos, a decisão de rejeitar H_0 quando de fato H_0 é verdadeira é chamada de **erro do tipo I**. Para evitá-lo, escolhemos um critério de decisão (que corresponde a um percentil de uma distribuição de probabilidade) que torna este erro pouco provável. Na literatura, a probabilidade de cometer este erro recebe o nome de nível de significância do teste, sendo usualmente representado pela letra grega α (lê-se alfa).

Há, no entanto, um segundo tipo de erro: não rejeitar a hipótese nula quando ela é falsa. A probabilidade do **erro do tipo II** é usualmente representado pela letra grega β (lê-se beta).

A capacidade de um teste identificar diferenças que realmente existem, ou seja, de rejeitar H_0 quando é realmente falsa, é denominada **poder do teste** e é definida como $1-\beta$.

• Probabilidade de significância (valor-p)

Existem duas opções para expressar a conclusão final de um teste de hipóteses. A primeira consiste em comparar o valor da estatística de teste com o valor obtido a partir da distribuição teórica, específica para o teste, para um valor pré-fixado do nível de significância (por exemplo 5% ou 1%).

Na segunda abordagem, o interesse é quantificar a chance do que foi observado ou resultados mais extremos, sob a hipótese de igualdade dos grupos. Assim, essa opção baseia-se na probabilidade de ocorrência de valores iguais ou superiores ao assumido pela estatística de teste, sob a hipótese de que H_0 seja verdadeira. Este número é chamado de probabilidade de significância ou valor-p e freqüentemente é indicado apenas por p.

Portanto, quanto menor o valor-p maior a evidência para se rejeitar H_0 . De um modo geral, considera-se que valor-p menor ou igual a 0,05 indica que há diferenças significativas entre os grupos. Também pode ser pensado como o menor nível de significância para o qual se rejeita H_0 .

A decisão final sobre a hipótese nula é tomada comparando-se o valor-p com um valor pré-fixado, usualmente 0,05. Quando o valor-p é menor que este ponto de corte, o resultado é chamado estatisticamente significativo e, altamente significativo, quando ele é menor que um ponto de corte ainda menor (digamos 0,01). Nas outras situações o teste é dito não significativo. Por esta razão, os testes são denominados testes de significância.

• **Regressão linear simples**

Em um estudo sobre a relação entre duas variáveis (Y e X), seja Y a variável resposta (também conhecida como dependente) e X a variável explicativa (também conhecida como variável independente ou regressor). O modelo de regressão linear simples é dado por $y = \beta_0 + \beta_1 x + \varepsilon$, onde β_0 é a constante ou intercepto, β_1 é o coeficiente da regressão ou inclinação da reta e ε é o erro aleatório, supõe-se que segue uma distribuição normal com média zero e variância desconhecida, mas que pode ser estimada a partir dos dados.

Pelo método de mínimos quadrados, as estimativas de β_1 e β_0 são:

$$\hat{\beta}_1 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{e} \quad \hat{\beta}_0 = \bar{y} - \hat{\beta}_1 \bar{x}$$

Uma aplicação de regressão linear simples em estudo de bioequivalência foi citada no Capítulo 1.

• **ANOVA**

A ANOVA é a abreviação de Analysis Of Variance e consiste na decomposição da soma de quadrados total em parcelas de somas de quadrados devido a várias fontes de variação. Através das somas de quadrados e os graus de liberdade associados a cada fonte de variação, obtém-se os quadrados médios, definidos como a razão entre a soma de quadrado e o grau de liberdade. Comparando-se os valores de quadrados médios de forma apropriada, é possível testar hipóteses sobre efeitos envolvidos no contexto do problema.

Vários exemplos de ANOVA foram apresentados no Capítulo 2, sobre o planejamento *crossover*.

