



**Agência Nacional  
de Vigilância Sanitária**

**ESCLARECIMENTOS SOBRE A APLICAÇÃO DA  
RE Nº 899/2003 – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS**

---

**Gerência Geral de Medicamentos – GGMed**

**UNIDADE DE AVALIAÇÃO DE ESTUDOS DE  
BIODISPONIBILIDADE/BIOEQUIVALÊNCIA DE MEDICAMENTOS - UABBE**

[www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)

Brasília, junho de 2008.



**Agência Nacional  
de Vigilância Sanitária**

Diretor-Presidente  
**Dirceu Raposo de Mello**

Diretores  
**Cláudio Maierovitch P. Henriques**  
**Maria Cecília Martins Brito**  
**José Agenor Álvares**  
**Agnelo Santos Queiroz Filho**

Gerência Geral de Medicamentos  
**Antônio Carlos da Costa Bezerra**

Unidade de Avaliação de Estudos de BD/BE de Medicamentos  
**Tatiana Cambraia de Sá Lowande**

Equipe Técnica:  
**Ariadna Cristina Gomes Barra**  
**Arthur Leonardo Lopes da Silva**  
**Bárbara de Barros Vaz**  
**Camila Fracalossi Redigueri**  
**Carolina Pingret de Sousa**  
**Diana de Souza Garcia Nunes**  
**Dulcyane Neiva Mendes**  
**Fábio Almeida de Santana**  
**José Bernardino da Silva Filho**  
**João Tavares Neto**  
**Marcelle de Oliveira Koeppe**  
**Rodrigo Cristofolletti**  
**Rogério Coutinho Pereira**  
**Raquel Lima e Silva**  
**Tainá Mendes Nunes**  
**Viviane Sayuri Suzuki**

Apoio Administrativo:  
**Felipe de Oliveira Macedo**  
**Mônica Sacramento Costa**  
**Peterson Maximiano de Souza**

E-mail: [uabbe@anvisa.gov.br](mailto:uabbe@anvisa.gov.br)  
Copyright © ANVISA, 2003

## INTRODUÇÃO

Este Guia foi desenvolvido para atender a demanda proveniente do I Encontro Nacional dos Centros de Equivalência Farmacêutica e Bioequivalência realizado entre os dias 12 e 14 de novembro de 2007 em Brasília/DF.

Tem como objetivo primordial auxiliar os pesquisadores dos centros analíticos na validação e no desenvolvimento de metodologias bioanalíticas.

São recomendações gerais que representam o pensamento da ANVISA sobre alguns testes utilizados na validação dos métodos.

As recomendações poderão ser ajustadas de acordo com a especificidade do método utilizado.

A participação dos Centros por meio da Associação Brasileira de Centros de Biodisponibilidade e Bioequivalência – ACBio - Br, foi de extrema importância para a conclusão deste trabalho.

## ESCLARECIMENTOS SOBRE A APLICAÇÃO DA RE 899/03 NA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS.

### 1. Especificidade

Os resultados do teste de especificidade devem ser comparados com aqueles obtidos com solução aquosa do analito em concentração próxima ao LIQ.

Considerando que a comparação com matriz biológica adicionada de padrão e submetido ao procedimento de extração foi considerado como um teste até mais crítico, do ponto de vista comparativo, os resultados apresentados desta forma também serão aceitos, embora a RE 899/03 estabeleça apenas a comparação com solução aquosa do analito.

É necessário que o teste seja conduzido com amostras de matriz biológicas de seis fontes distintas, sendo quatro amostras normais, uma lipêmica e uma hemolisada.

Todos os cromatogramas do teste devem constar no relatório de validação do método.

Não é necessária a extração em duplicata das amostras para o teste.

No momento da revisão da RE 899/03 será considerada a possibilidade de alteração do nome do teste para *seletividade*.

### 2. Curva de calibração/ Linearidade

Deve ser utilizada uma curva de calibração para cada corrida com no mínimo 06 concentrações.

Considerando a alta variabilidade de determinados fármacos, o fato de que os dados reportados na literatura são valores médios e nem sempre é reportada a amplitude dos resultados experimentais que os geraram e que o procedimento de diluição de amostras gera a possibilidade de incorporação de novos erros de processamento, a curva de calibração não deveria ser limitada a 120% da concentração mais alta que se pretende analisar. Dessa forma será aceita uma curva de calibração que contemple do LIQ até uma variação de 120% da concentração mais alta que se pretende analisar, ou seja, se a concentração mais alta que se pretende analisar for  $x$ , a curva poderá contemplar do LIQ até  $2,2x$ .

Deve ser adotado preferencialmente o modelo mais simples, geralmente o linear. Em caso de heterocedasticidade, a ponderação mais adequada é a que apresentar o menor valor para soma dos erros relativos dos valores nominais dos padrões de calibração *versus* seus valores obtidos pela curva.

Caso seja proposto um modelo não linear, em sua justificativa, a empresa deve comprovar que o número de pontos da curva é suficiente para estabelecer tal modelo. Para tanto, sugere-se a inclusão de mais pontos dentro da curva de calibração (mínimo de 8 pontos), especialmente na parte onde estão as concentrações mais altas.

A exclusão de pontos deve ser realizada conforme procedimento padrão pré-estabelecido pelo centro (previsto em POP) desde que atendido o item 3.2.4. da RE 899/03.

Quando utilizadas replicatas das concentrações, no mínimo 67% de todas as réplicas devem apresentar desvio menor ou igual a  $\pm 15\%$  em relação à concentração nominal ( $\pm 20\%$  para réplicas do LIQ). Não devem ser excluídas todas as réplicas de 2 níveis de concentração consecutivos.

### 3. Precisão e Exatidão

No mínimo cinco valores de cada concentração devem ser apresentados. Quando o teste utilizar mais de 5 réplicas de cada concentração, o critério de 67% (2 de 6) poderá ser utilizado para excluir réplicas que apresentarem desvio maior do que  $\pm 15\%$  do valor nominal e, tanto a média quanto o coeficiente de variação (CV%) devem ser calculados com os valores restantes.

Na precisão inter-dia o coeficiente de variação (CV%) poderá ser calculado entre as médias.

Não é necessário demonstrar precisão e exatidão inter-dias para o LIQ.

### 4. Recuperação

Para este teste serão consideradas as amostras de comparação (não extraídas) preparadas tanto em solução quanto aquelas adicionadas ao extrato da matriz biológica.

O Cálculo deve ser feito em função das áreas obtidas no teste.

Não está estabelecido um valor mínimo para a recuperação. Recomenda-se que o teste apresente precisão (CV%) de até 20% entre as replicatas de cada conjunto.

### 5. Estabilidades em matriz biológica

A estabilidade deve ser demonstrada nas condições do estudo corrente (temperatura de armazenamento, matriz biológica, anti-coagulante).

As amostras recém preparadas devem ser fortificadas e extraídas em seqüência.

O teste de estabilidade deve ser concluído antes do estudo, com exceção da estabilidade de longa duração que poderá ser concluída ao final das corridas analíticas. O resultado da estabilidade de longa duração deverá ser incorporado no relatório final do estudo antes de seu protocolo na ANVISA.

Para a estabilidade de longa duração é recomendado o uso de duas curvas de calibração, ou seja, que os resultados sejam reportados como a variação observada numa mesma amostra antes e depois do período em teste.

Quando utilizada apenas uma curva de calibração a comparação deverá ser feita com controles recém preparados.

Para a estabilidade de ciclos de congelamento e descongelamento, caso as amostras não sejam estáveis nos três ciclos, avaliação diferente poderá ser aceita uma vez garantido que as amostras do estudo não sofreram mais do que os ciclos testados na validação. Caso as amostras sejam submetidas a mais do que três ciclos de congelamento e descongelamento a validação deverá contemplar o mesmo número de ciclos.

## **6. Validação de Diluição**

É recomendado que o centro valide o procedimento de diluição sempre que este for empregado no estudo, e que na corrida onde as amostras diluídas forem analisadas se inclua um controle de qualidade de diluição.

No momento da revisão da RE 899/03 será considerada a inclusão deste teste.