



NOVAS NORMAS PARA REGISTRO DE
MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS E
NOTIFICAÇÃO DE DROGAS VEGETAIS

CONTROLE DE QUALIDADE



Sumário

- ◆ Dificuldades associadas ao CQ de fitoterápicos – Paradigma centrado em marcadores.
- ◆ Principais alterações introduzidas na RDC 14/2010 e implicações para o CQ físico-químico de fitoterápicos.
- ◆ Pontos críticos na validação de métodos para CQ físico-químico.
- ◆ Perspectivas futuras.



DIFICULDADES ASSOCIADAS AO CQ DE FITOTERÁPICOS



Introdução

◆ Momento atual:

- Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (GM 971, de 3/05/2006).
- Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (Decr. 5813 de 22/06/2006).
- Valorização da cadeia produtiva de fitoterápicos na política.
- Política como valorização, preservação e soberania sobre a biodiversidade.
- Necessidade de pesquisas nos aspectos fitoquímicos, **ensaios clínicos** e metodologias de controle de qualidade, especialmente das espécies nativas.

Medicamentos Fitoterápicos X Medicamentos Sintéticos

	Fitoterápico	Convencional (Síntese ou fitofármaco)
Composição	Complexa	Simples
Ação farmacológica	Frequentemente Atribuída a mais de um componente/grupo	Atribuída a um único constituinte ou associação de compos. definida.
Biodisponibilidade	Prevista/Assumida frente à eficácia (Farmacol. Clínica)	Comprovada
Controle de Qualidade	Quantifica marcadores/Seletividade é crítica	Quantifica princípio ativo/Seletividade simples
Efeitos de sazonalidade	Presentes	Ausentes
Perfil de impurezas	Nem sempre conhecido (matriz vegetal complexa)	Quase sempre conhecido
Reprodutibilidade de ação	Não é garantida necessariamente pela concentração de marcadores	Depende da concentração do princípio ativo/perfil de impurezas



Paradigma do Marcador Fitoquímico:

◆ Marcador: Decorre do reconhecimento:

- Da natureza complexa do derivado vegetal
- Do desconhecimento dos princípios ativos de um fitocomplexo
- Da dificuldade associada ao Controle de Qualidade

◆ Marcador (RDC 14):

- “composto ou classe de compostos químicos (ex: alcalóides, flavonóides, ácidos graxos, etc.) presentes na matéria-prima vegetal, preferencialmente tendo correlação com o efeito terapêutico, que é utilizado como referência no controle da qualidade da matéria-prima vegetal e do medicamento fitoterápico”

Eficácia e Reprodutibilidade de Ação



Eficácia e Reprodutibilidade de Ação: Paradigma baseado na Fitoequivalência





Paradigma Baseado em Tecnologias Ômicas:

- ◆ Tentativa de superar o paradigma de marcadores: foco é na correlação perfil fitoquímico (metabolômica) X alterações fenotípicas (proteômica e genômica).
- ◆ An integrated metabolomics and pharmacokinetics strategy for multi-component drugs evaluation. Lan K, Jia W. *Curr Drug Metab.* 2010 Jan;11(1):105-14.
- ◆ Metabolomics in the context of systems biology: bridging traditional Chinese medicine and molecular pharmacology. Wang M, Lamers RJ, et al. *J. Phytother Res.* 2005 Mar;19(3):173-82.
- ◆ Comparative metabolomics approach coupled with cell- and gene-based assays for species classification and anti-inflammatory bioactivity validation of Echinacea plants. Hou CC, Chen CH, et al. *J Nutr Biochem.* 2009

Eficácia Através do Controle Biológico

- ◆ Se o ensaio biológico é preditivo da ação terapêutica, bastante útil.
- ◆ Pode ser utilizado no controle de qualidade do derivado vegetal.
- ◆ Técnicas *in vitro* podem não contemplar a influência dos excipientes e a influência da formulação final.
- ◆ Controle biológico pode ser visto como um passo intermediário entre o CQ baseado em marcadores e a validação completa de um extrato padronizado (fitoequivalência).



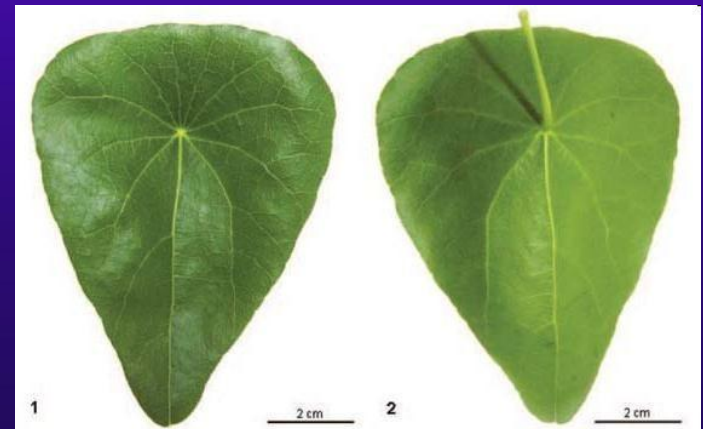


Nossas Dificuldades

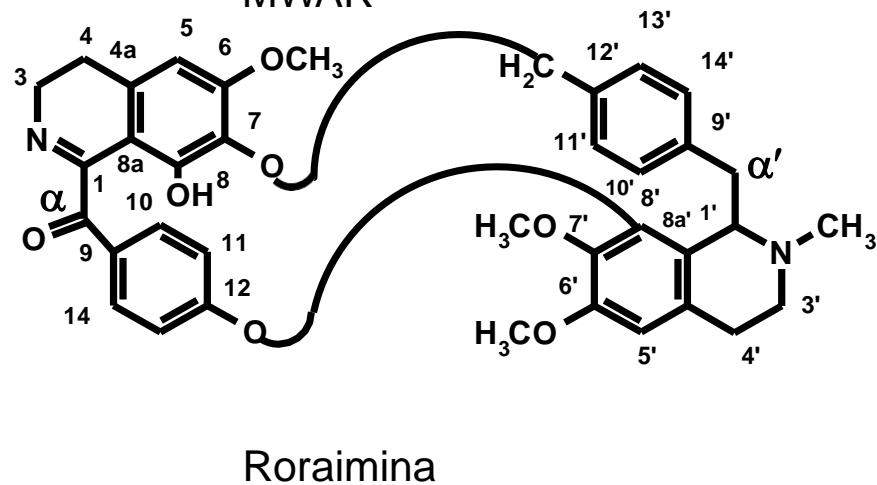
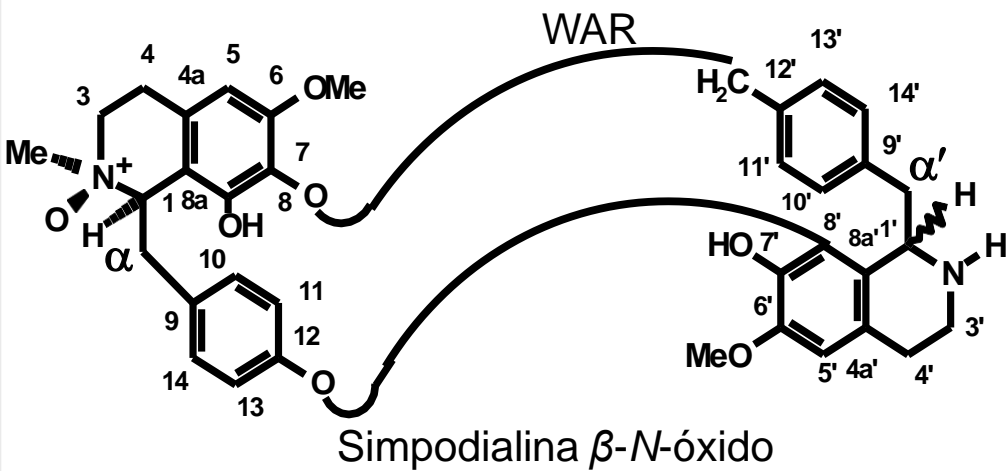
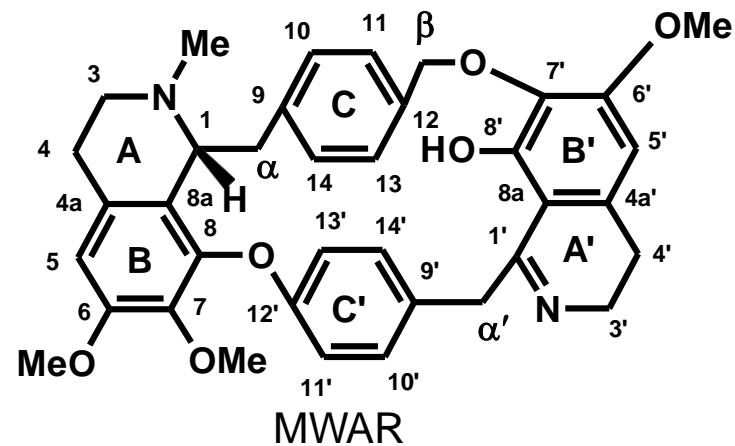
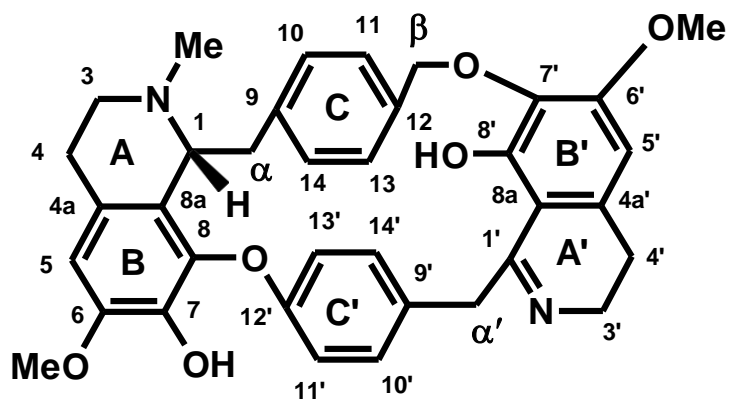
- ◆ Falta de maior integração entre Universidades/Institutos de Pesquisa e Iniciativa privada.
- ◆ Paradigma centrado no marcador e não no efeito terapêutico.
- ◆ Falta de ensaios clínicos bem controlados para demonstração de eficácia e segurança, especialmente para plantas nativas e endêmicas.

Exemplo de caso: *Cissampelos sympodialis*

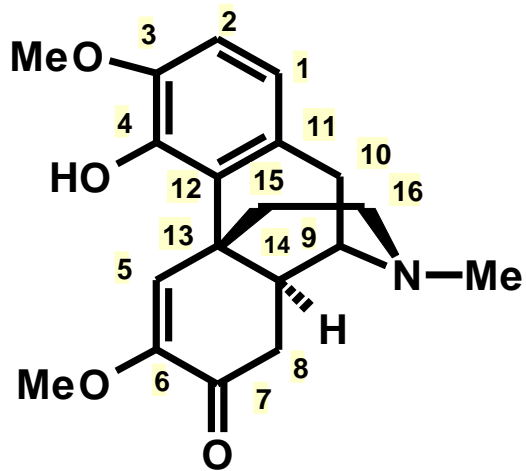
- ◆ Planta da família Menispermaceae.
- ◆ Usada popularmente para reumatismo, artrite e doenças do aparelho respiratório.
- ◆ Encontrada desde o Ceará até o Norte de Minas gerais.



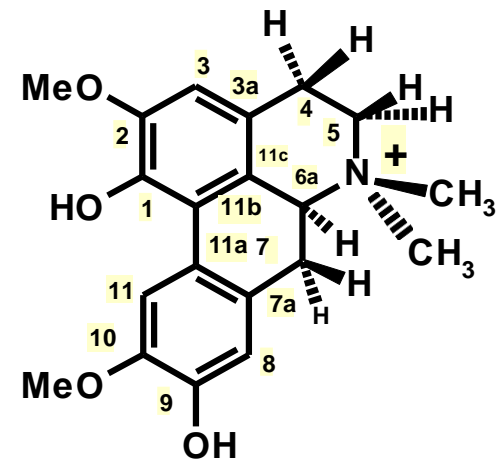
Alcalóides isolados



Alcalóides Isolados

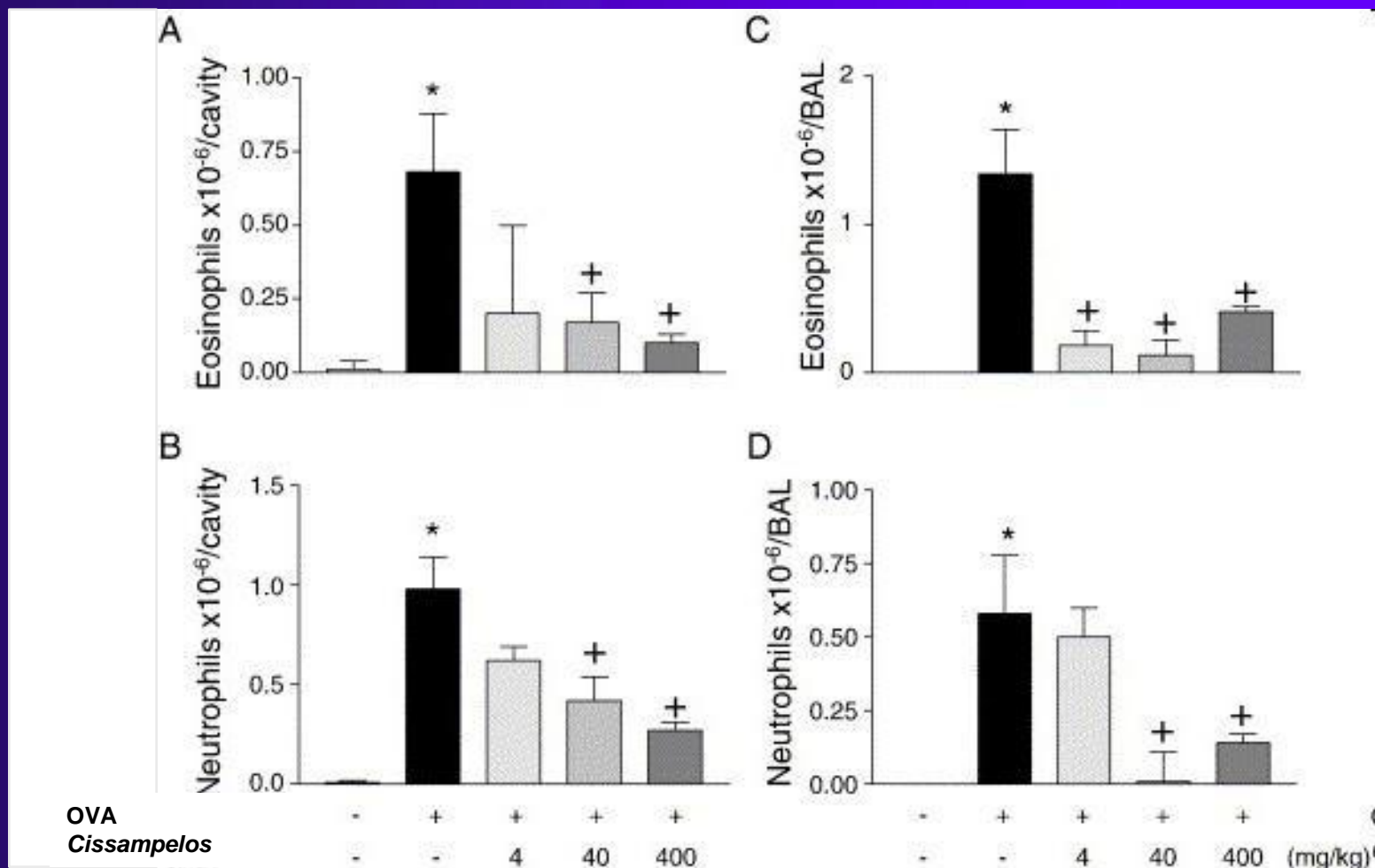


Milonina

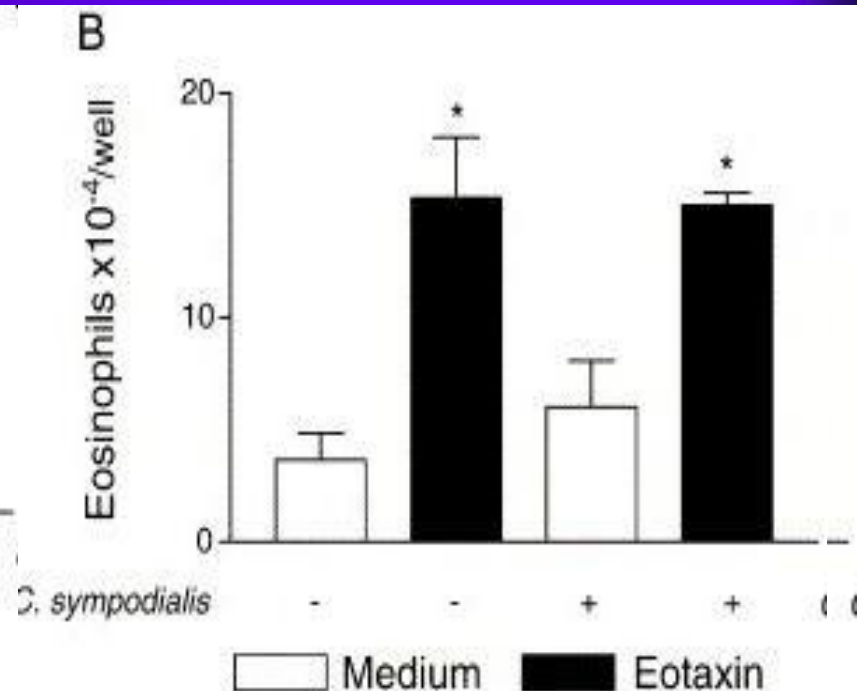
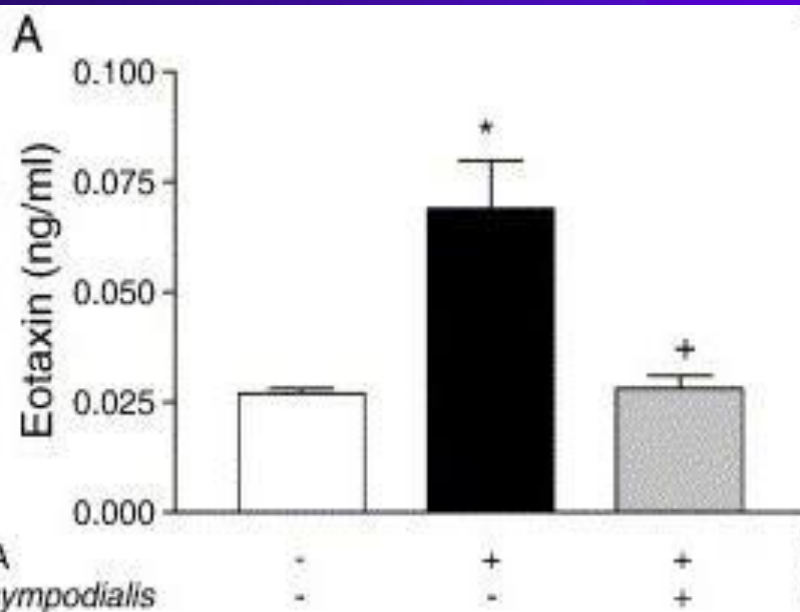


Laurifolina

Efeito sobre Pleurisia Alérgica e Modelo de Asma



Mecanismo Para Inibição Da Migração de Eosinófilos



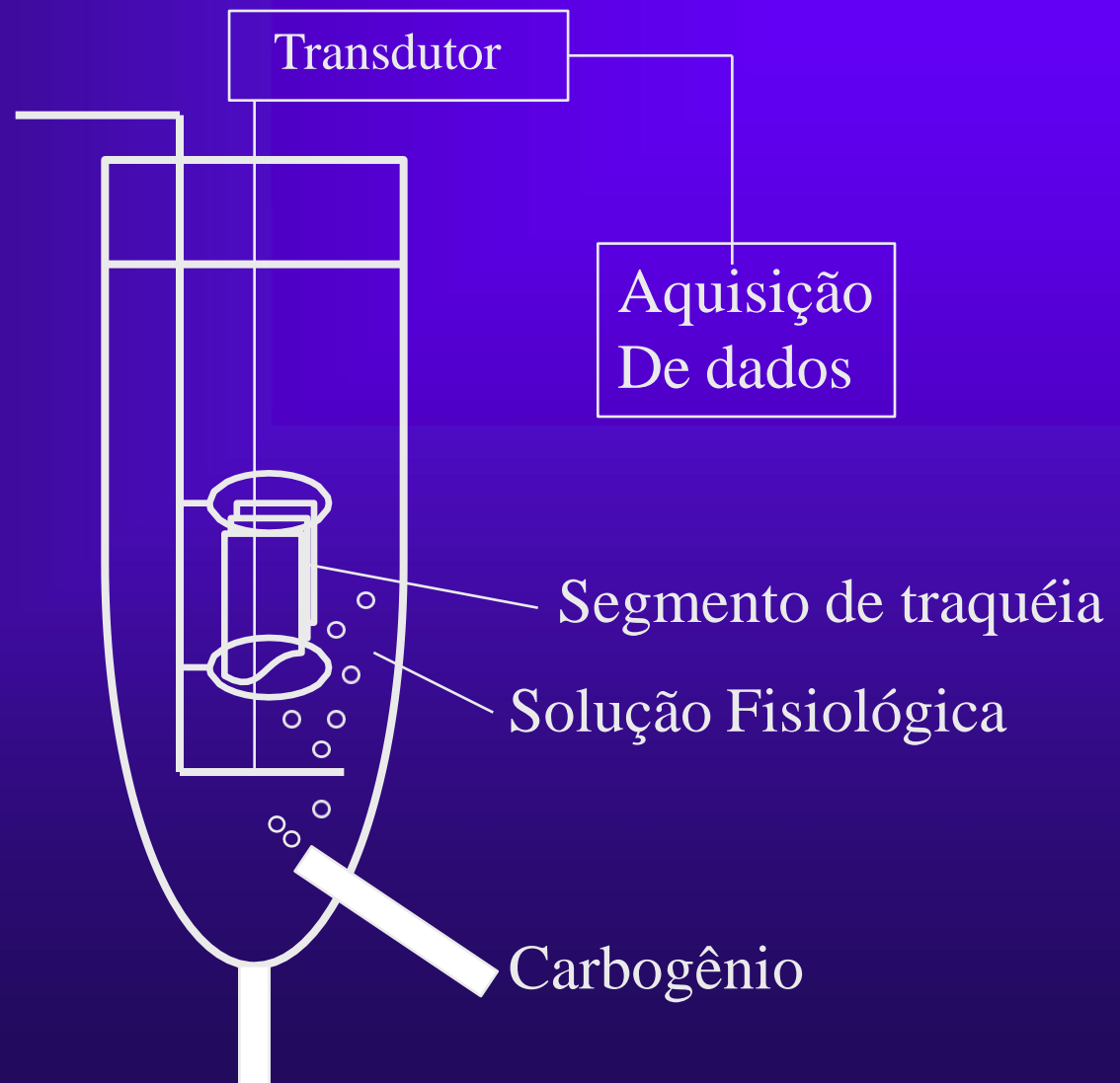
Fonte: Bezerra-Santos *et al.* *International Immunopharmacology*, Volume 6, Issue 7, July 2006, Pages 1152-1160



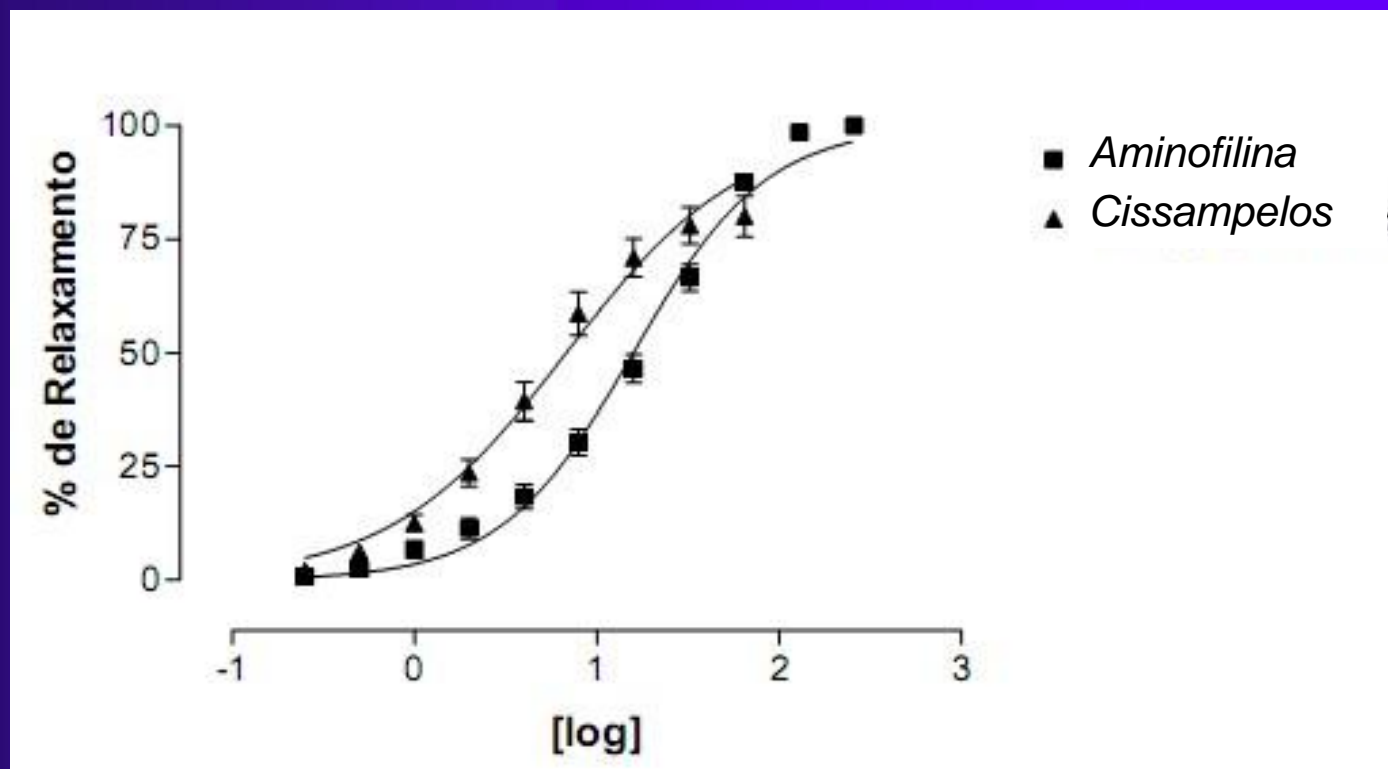
Outros resultados pré-clínicos

- ◆ Warifteína, alcalóide bisbenzilisquinolínico, inibe reações de hipersensibilidade imediata em modelo experimental de alergia. Dissertação de Mestrado, Herman Ferreira Costa, PPNSB, João Pessoa, 2007.
- ◆ *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) inibe reação de choque anafilático, recrutamento e ativação de leucócitos em modelo de pleurisia e inflamação pulmonar alérgica. Tese de Doutorado, Cláudio Roberto Bezerra, PPNSB, João Pessoa, 2007.
- ◆ Efeito do tratamento por nebulização com o extrato hidroalcóolico das folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) em camundongos Balb/c sensibilizados com ovalbumina. Dissertação de mestrado, Giciane Carvalho Vieira, PPNSB, João Pessoa, 2008.

Ensaio Biológico – Traquéia de Cobaia

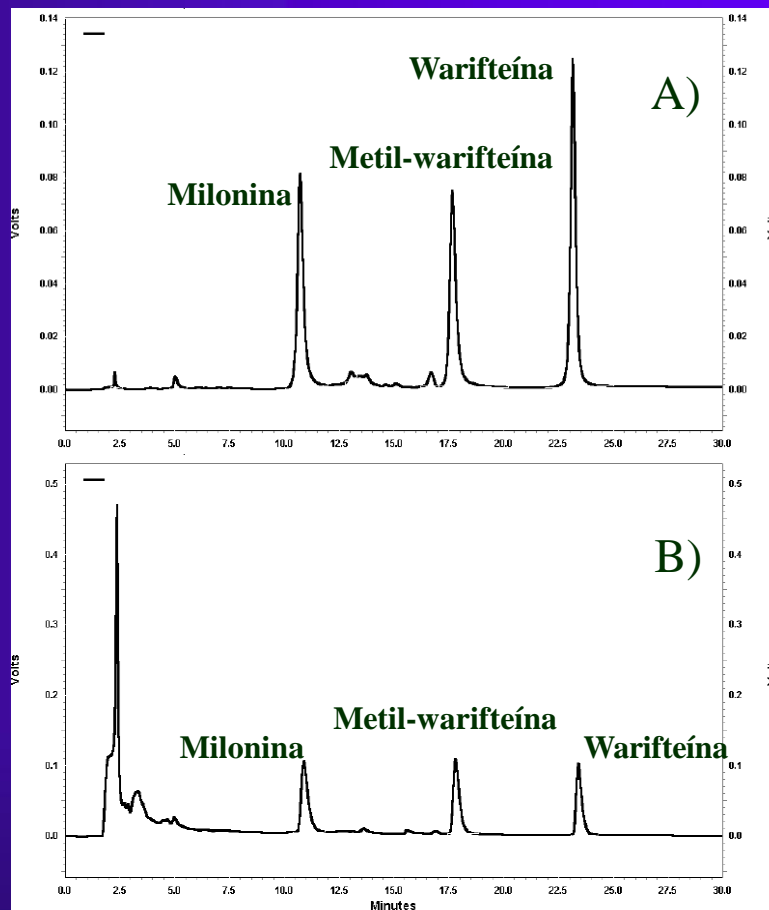


Potência Relativa do extrato Hidroalcoólico de *Cissampelos sp.* e Aminofilina



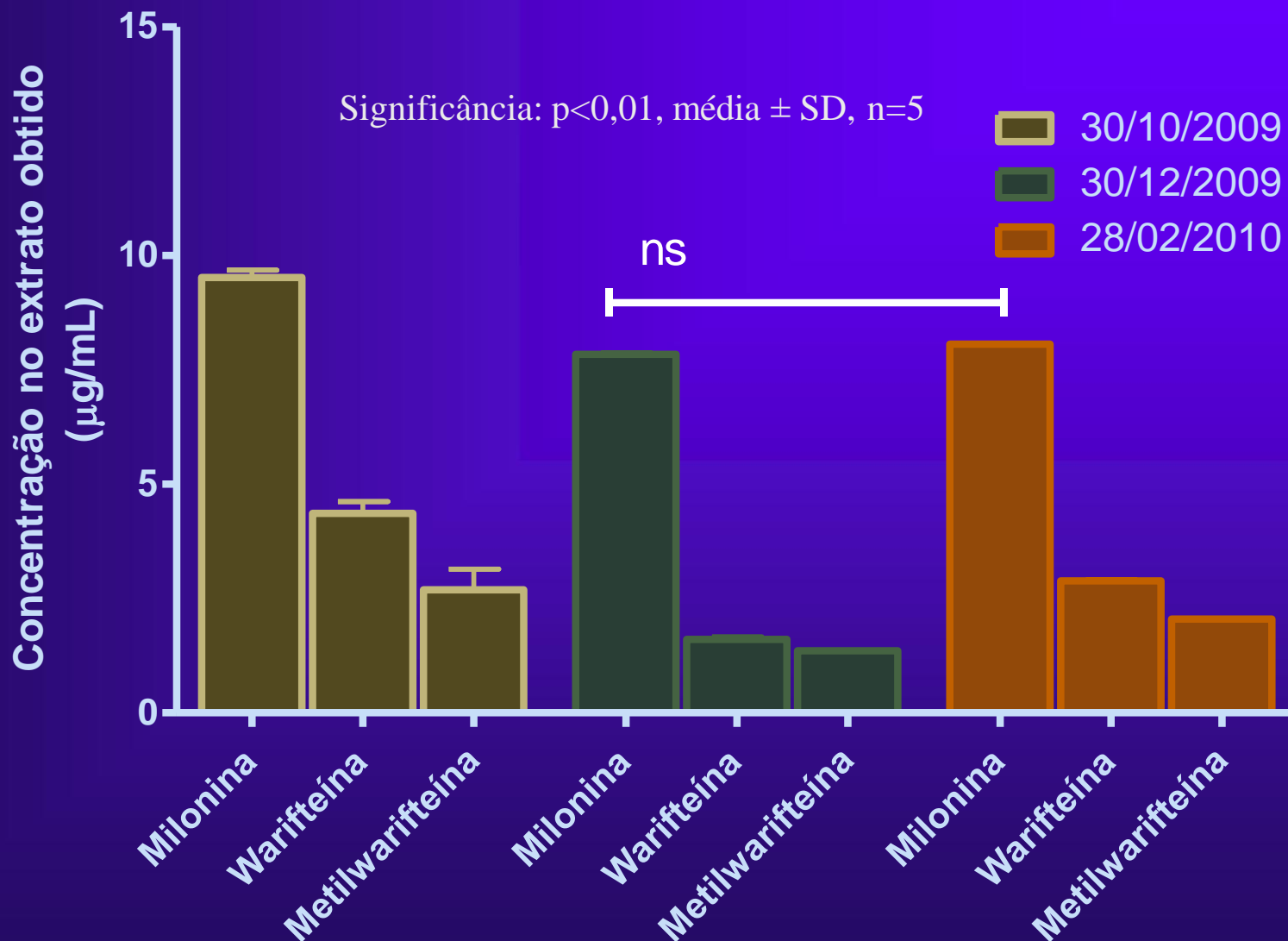
Curvas concentração-resposta de um extrato hidroalcoólico seco por spray-drying de *Cissampelos sp.* e aminofilina. $CE_{50} = 6,8 \mu\text{g/mL}$ para *Cissampelos sp.* e $19,8 \mu\text{g/mL}$ aminofilina ($n=5$). (Dissertação de Mestrado, Júlia Beatriz Pereira de Souza, PPNSB, João Pessoa, 2003)

Controle de Qualidade Físico-Químico



Cromatograma dos padrões (A) de Mil., Me-War e War (30 μ g/mL) e de uma amostra do extrato hidroalcoólico (B) de *C. sympodialis* adicionado dos padrões a 100 μ g/mL.

Estudos de Sazonalidade




Conclusão

- ◆ Necessidade de maior integração entre Universidades, Institutos de Pesquisa e Iniciativa privada para plantas endêmicas.
- ◆ Necessidade de abordagens verdadeiramente multidisciplinares: agronomia, botânica, química, farmacologia, medicina, farmácia.
- ◆ Necessidade de ações induzidas na área de ensaios clínicos.
- ◆ Validação da utilidade do marcador na garantia da reprodutibilidade da ação deve ser a meta.





PRINCIPAIS MODIFICAÇÕES NA RDC14/2010 COM IMPLICAÇÕES NO CQ



Principais Modificações Introduzidas na RDC 14/2010 – Droga Vegetal

- ◆ Cita testes de autenticidade.
- ◆ Testes de pureza e integridade (cinzas, cinzas insolúveis em ácido, umidade e/ou perda por dessecação, pesquisa de matérias estranhas, contaminantes microbiológicos, metais pesados)
- ◆ Teste de avaliação de aflatoxinas, QUANDO necessário.
- ◆ Antes: Relatório dos métodos de secagem, estabilização e conservação + laudo botânico.

Principais Modificações Introduzidas na RDC 14/2010 – Derivado Vegetal

- ◆ Novo item que especifica testes para:
 - Extratos líquidos (resíduo seco, pH, teor alcoólico, densidade, etc)
 - Extratos secos (Umidade, perda por dessecação, solubilidade, densidade aparente)
 - Óleos essenciais (densidade, índice de refração, rotação óptica)
 - Óleos Fixos (índice de acidez, de éster e de iodo)
 - Ausência de aflatoxinas, quando necessário.
 - Controle **Biológico**.





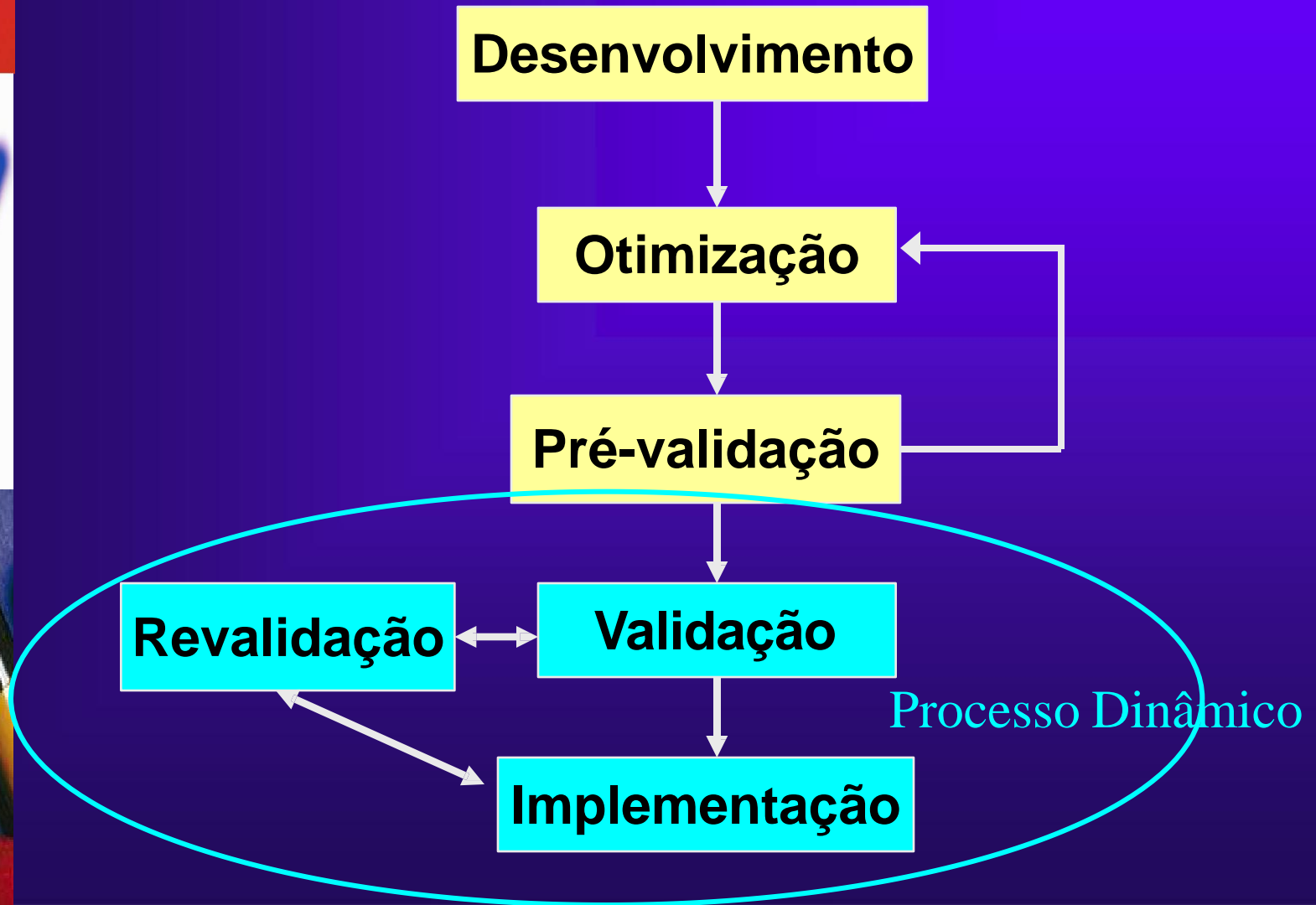
Principais Modificações Introduzidas na RDC 14/2010 – Produto Acabado

- ◆ Controle de Qualidade dos Excipientes.
- ◆ Possibilidade de Controle Biológico.



PONTOS CRÍTICOS NA VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA CQ FÍSICO-QUÍMICO (RE 899/03)

Desenvolvendo e Validando Métodos Analíticos



Padrões Fitoquímicos – Identificação Botânica (Fingerprinting)

- ◆ Dificuldade relacionada a disponibilidade de um extrato ou material vegetal “padrão”.
- ◆ USP: possui alguns padrões (“Dietary supplements”)
- ◆ Alguns fornecedores de reputação reconhecida (Chromadex, Finzelberg) acompanhados de laudos de análise adequados.
- ◆ Farmacopéia Brasileira: Ainda não tem.
- ◆ Possibilidade de utilização de padrões de trabalho secundários está prevista.



I. SELETIVIDADE


- ◆ É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (RE899/03).
- ◆ “ Specificity is the ability to assess unequivocally the analyte in the presence of components **which may be expected to be present**. Typically these might include impurities, degradants, matrix, etc. Lack of specificity of an individual procedure may be compensated by other supporting analytical procedure(s) ” (ICH).
- ◆ Especificidade ou Seletividade: Especificidade é considerado por alguns (IUPAC) como um grau definitivo de seletividade.
- ◆ Seletividade é um conceito relativo: diferentes evidências aumentam o grau de segurança.



Demonstrando Seletividade

- ◆ Diretamente: através de estudos nos quais se demonstre a ausência de interferentes: Mesmo resultado na presença e ausência de interferentes.
- ◆ Indiretamente: avaliando a exatidão do método aplicado frente à amostras reais.





Demonstrando seletividade diretamente:

◆ Detecção seletiva:

- Propriedades espectrais (comprimento de onda no UV seletivo, fluorescência, etc)
- Espectrometria de Massas
- Reações seletivas (sensores)
- Métodos que usam imunoafinidade

Seletividade em Espectrofotometria no UV

- ◆ Com fitoterápicos, a complexidade da matriz deve ser considerada. O emprego de placebo para determinar ausência de absorção significativa no comprimento de onda escolhido é fundamental.
- ◆ Mais importante: varredura espectral de uma solução teste e do padrão (marcador) deve mostrar máximos de absorção similares
- ◆ Geralmente os métodos quantificam uma classe, e resultado é expresso em função de um marcador.

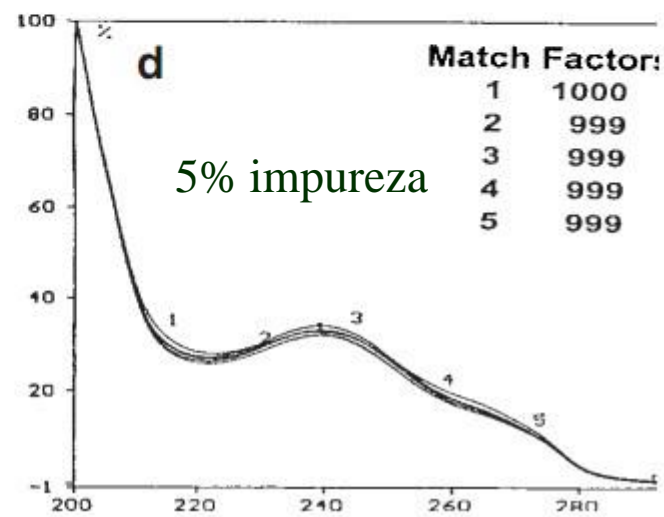
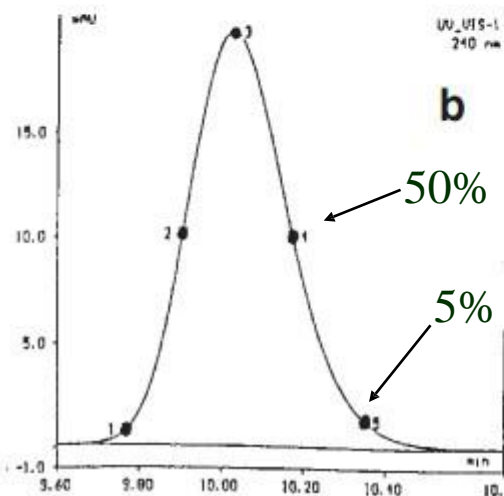
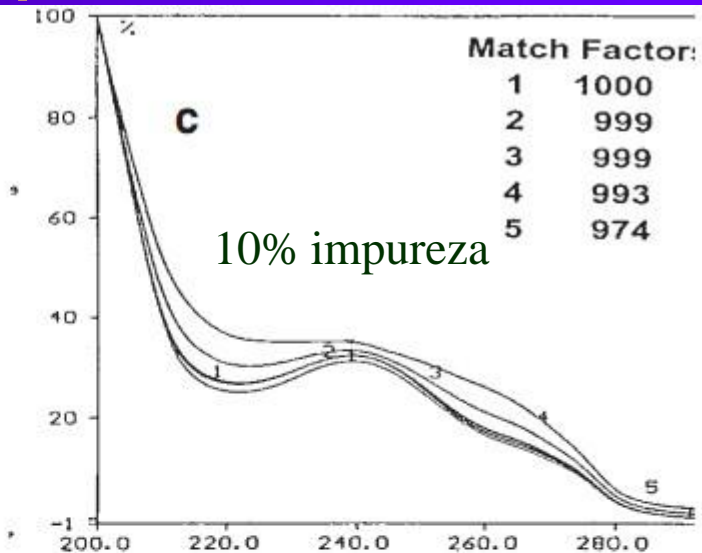
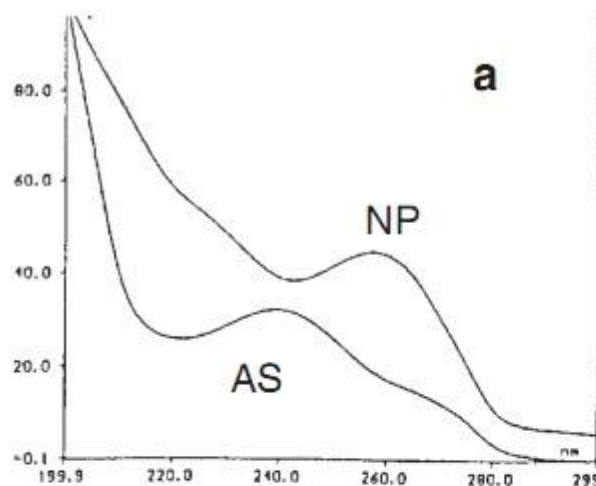


Seletividade em Métodos Cromatográficos

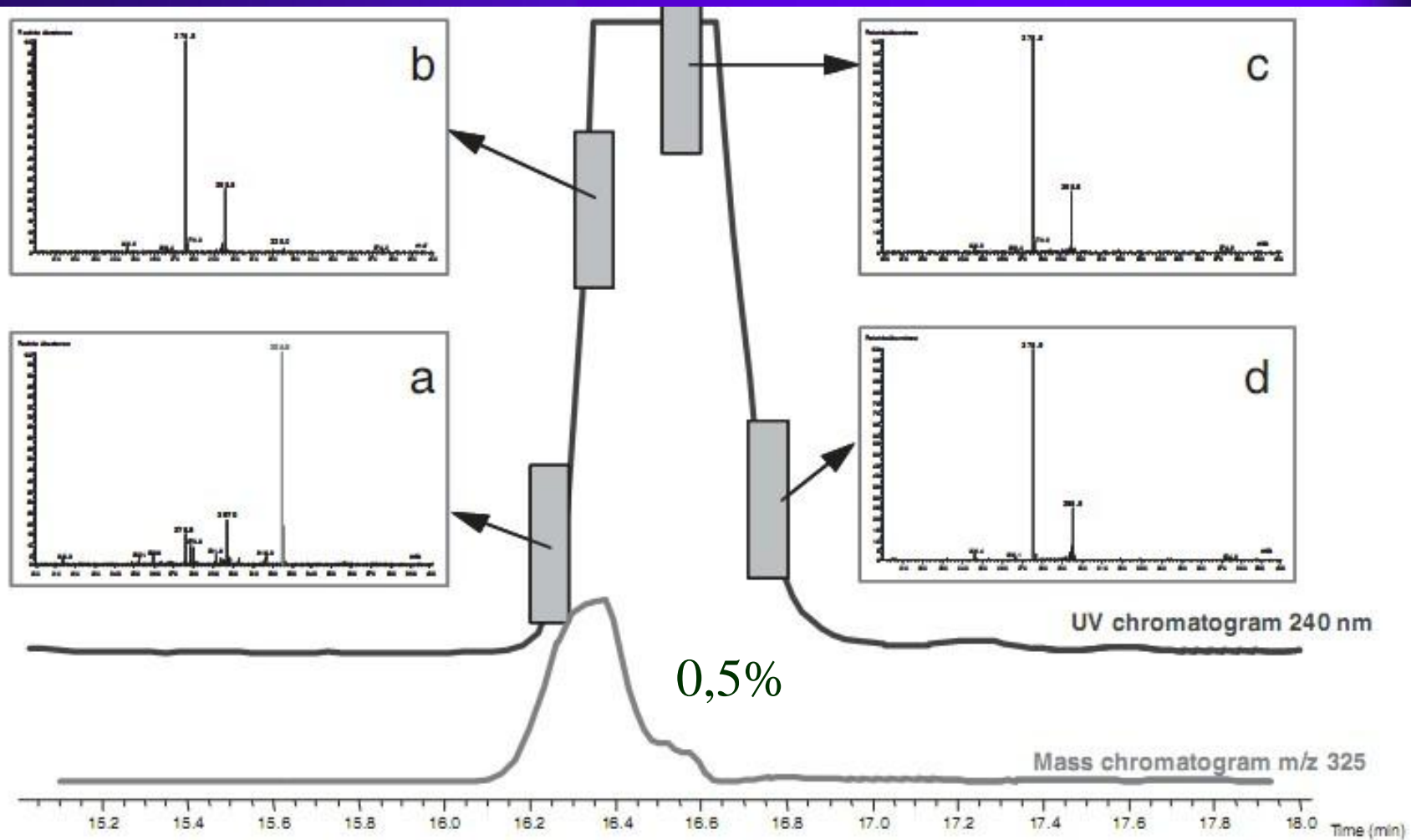
- ◆ Identidade do marcador na amostra pode ser indicada por co-cromatografia.
- ◆ Seletividade normalmente se baseia na ausência de interferentes na janela de retenção dos analitos.
- ◆ Pureza dos picos cromatográficos pode ser investigada (DAD, EM, cromatografia em diferentes condições –colunas, F.M, etc).



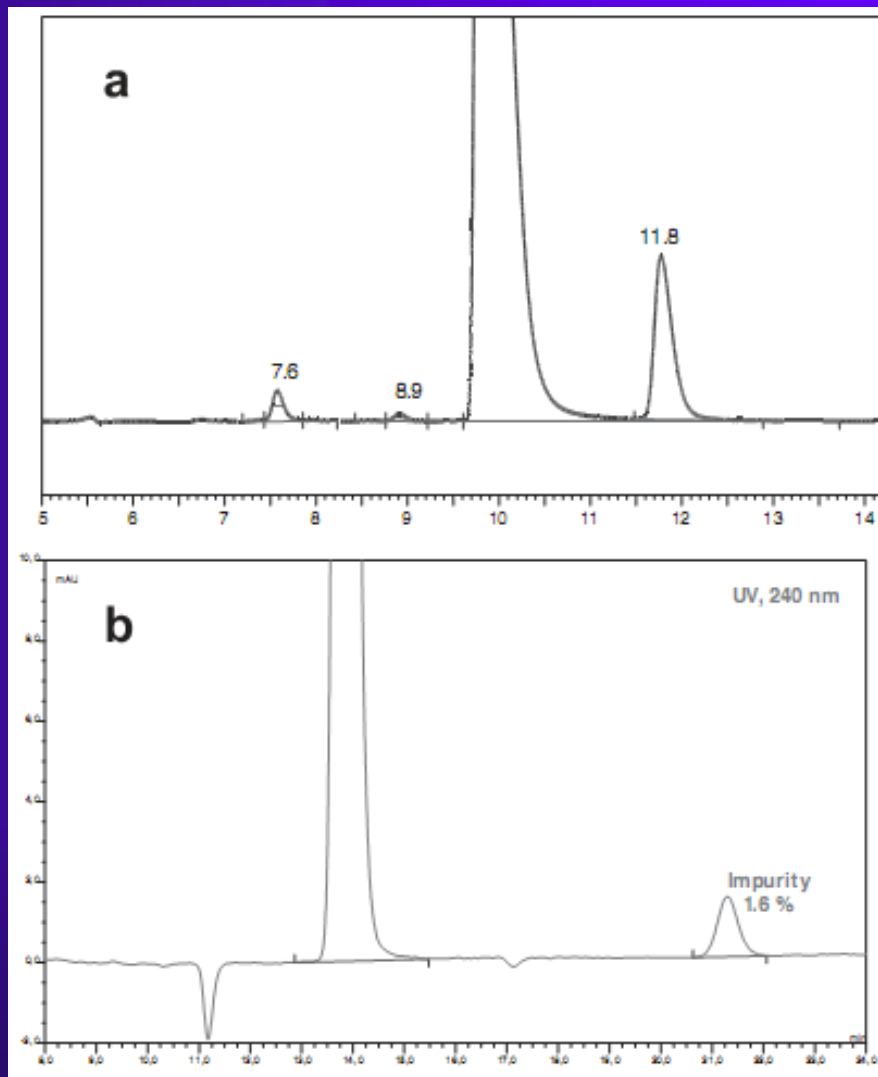
Pureza de Pico por UV-DAD



Pureza de Pico – LC/MS



Recromatografia



(a) Acetonitrila/água/TFA 0.1 %, Coluna C8. (b) Pico coletado entre 9.6 to 11.0 minutos. Acetonitrila / Fosfato de sódio 0,2M pH 4.0, Coluna C8-column. J. Ermer: Validierung in der pharmazeutischen Analytik. In: Handbuch Validierung in der Analytik. Eds. S.Kromidas, Wiley-VCH, Weinheim 2000, 320–359



II. LINEARIDADE

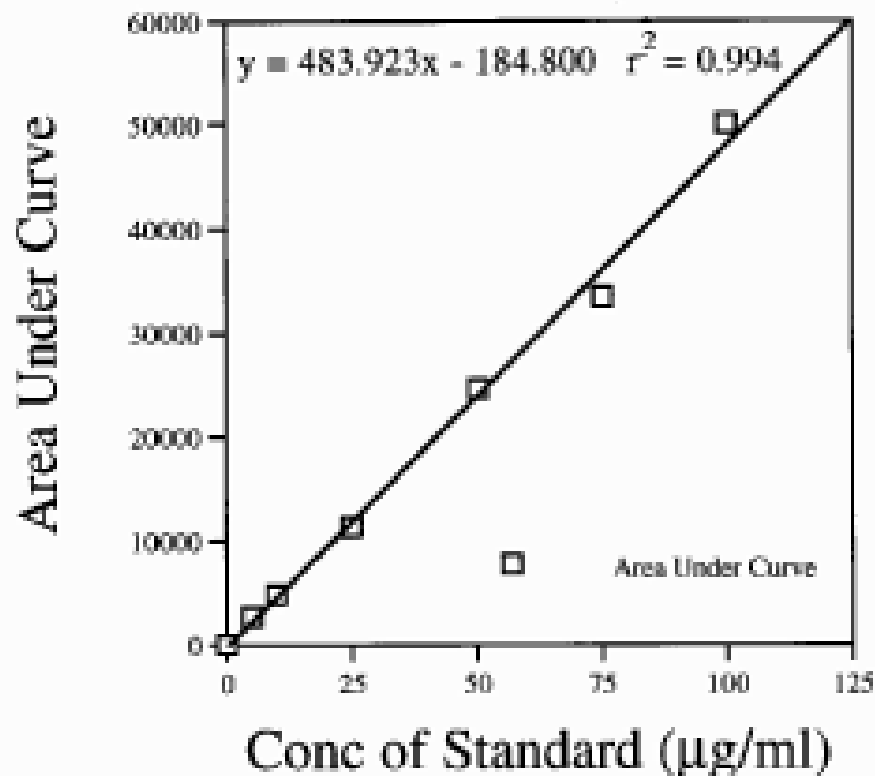
- ◆ Linearidade: É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. (RE899/03)
- ◆ “ The linearity of an analytical procedure is its ability (within a given range) to obtain test results which are directly proportional to the concentration (amount) of analyte in the sample”. (ICH)



Linearidade

- ◆ Inspeção visual, correlação linear (ou não linear justificada), análise de resíduos.
- ◆ Coeficiente de correlação (r^2)=0,99.
Para métodos bioanalíticos: 0,98.
- ◆ Linearidade entre dias diferentes:
análise por ANOVA.

Curvas de Calibração



Pict. 2 Standard calibration graph of data generated by HPLC (data from pict. 1) using Cricket Graph III™ to generate linear curve fit

Curvas de calibração e análise de resíduos

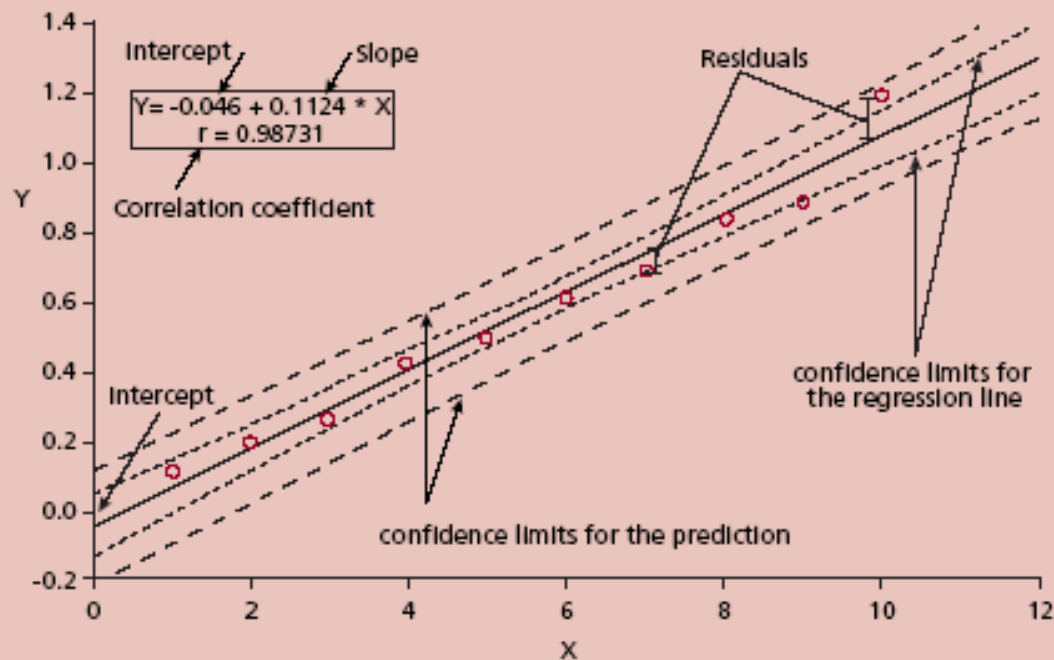
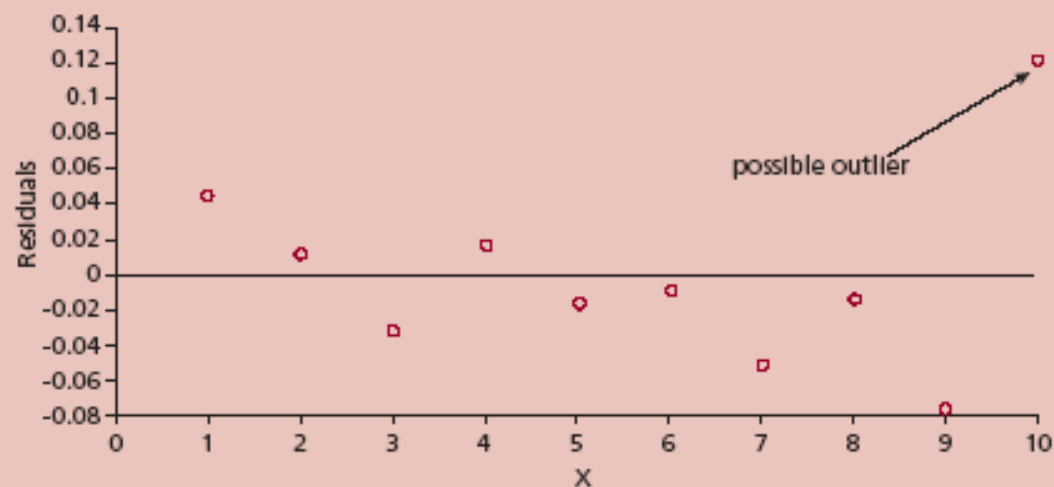


figure 2 Calibration graph.



Linearidade

- ◆ Deve ser determinada em amostras contendo a mesma matriz, na mesma diluição que amostras “reais”.
- ◆ Geralmente realizada através de experimentos onde são adicionadas (spiking) concs conhecidas de analito à amostra branco da matriz.
- ◆ Quando não se possui uma amostra branco, ou quando a resposta varia muito em função da matriz: adição de padrão.





Análise Quantitativa

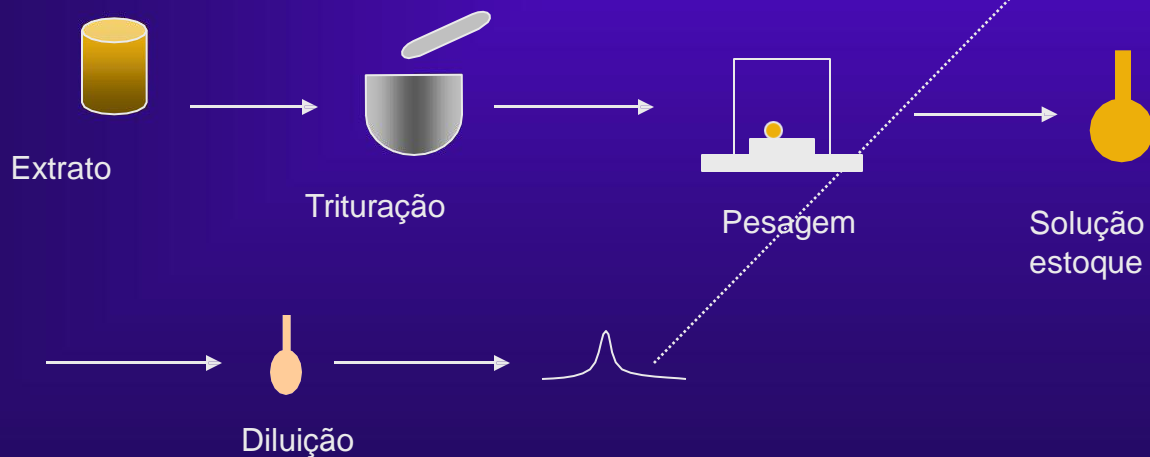
- ◆ Necessidade inalienável de padrões.
- ◆ Calibração externa X uso de padrão interno.
- ◆ Quando a matrix não puder ser obtida sem analito: adição de padrões.

Análises baseadas em calibração com um padrão externo

Preparação do padrão



Preparação da amostra



Necessidade de Padrão Interno

- ◆ Usa-se calibração com padrão interno quando:
 - A metodologia de preparação da amostra envolve muitos passos de extração e/ou transferência (Exs: extração líquido-líquido, SPE)
 - Quando não se pode garantir a precisão de injeção (ex. CG).
 - O sinal analítico varia de forma aleatória: ICP-AES.



Características de um padrão interno

- ◆ Ter características físico-químicas semelhantes (ex.solubilidade). Não necessariamente mesma estrutura química.
- ◆ Ter um tempo de retenção próximo do analito.
- ◆ Ter um fator de resposta semelhante ao analito
- ◆ Não estar presente na amostra.
- ◆ Comercialmente disponível com pureza adequada.
- ◆ estável;.





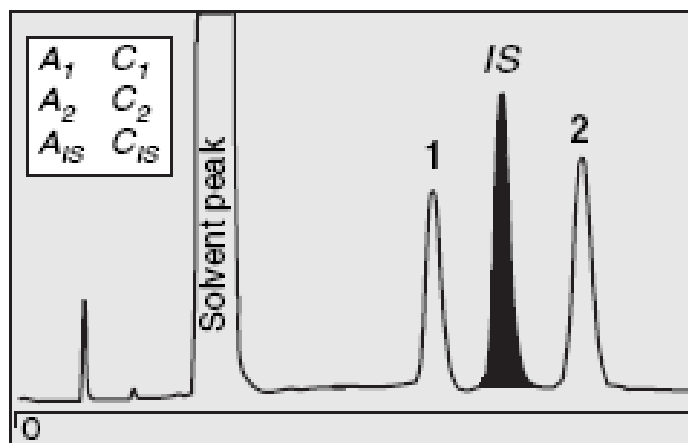
Padrão Interno

- ◆ Respostas medidas envolvem não a área absoluta, mas a razão entre a resposta do analito e do seu padrão interno:

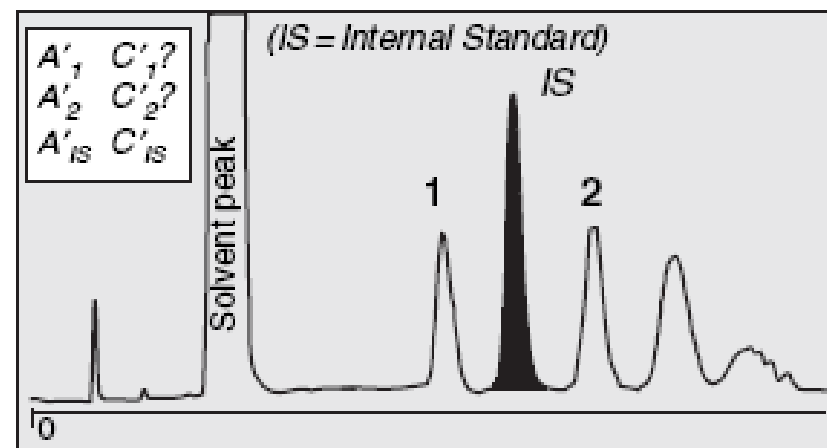
Padrões: série de amostras contendo quantidades crescentes de analito e quantidade fixa de padrão interno.

Amostras: a cada amostra que for preparada, uma quantidade fixa de padrão interno (igual aquela presente em cada amostra da série de calibração) é acrescentada.

Análises baseadas em calibração com um padrão interno



Chromatogram of the standards



Chromatogram of the solution to be measured

1 e 2 : analitos

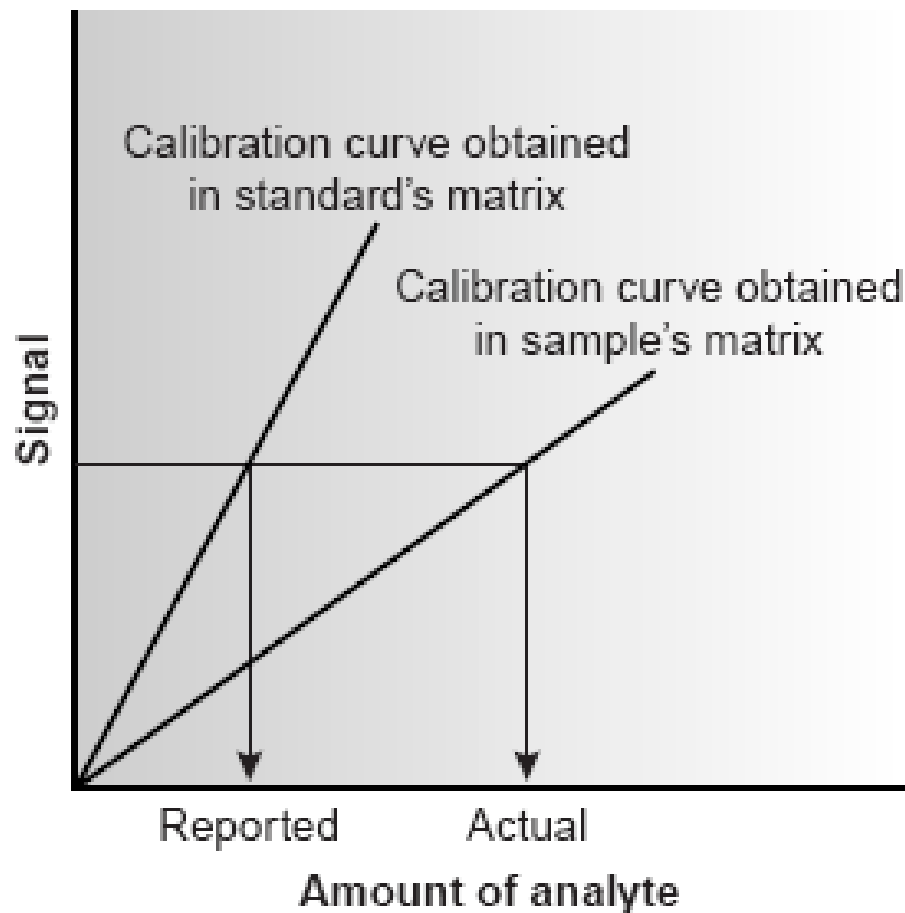
IS: padrão interno

Adição de Padrão (Standard Addition)

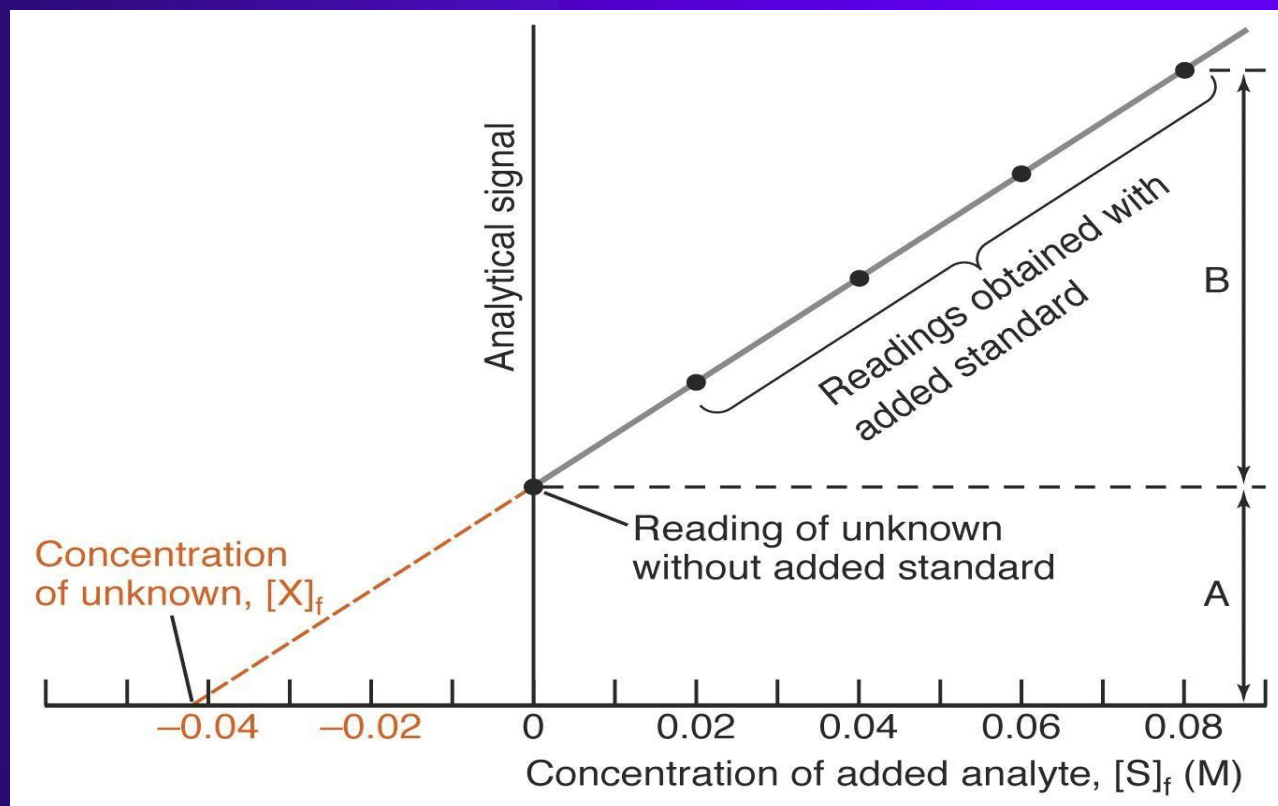
- ◆ Geralmente utilizada quando não se pode obter a matriz livre do analito.
- ◆ Muito utilizada em casos onde a matriz pode interferir com o sinal do analito (Ex: AAS, AES).
- ◆ Bastante conveniente para fitoterápicos.



Adição de Padrão (Standard Addition)



Adição de Padrão (Standard Addition)



III. PRECISÃO

- ◆ A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis.
 - 2.4.1. Repetibilidade (precisão intra-corrida): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada;
 - 2.4.2. Precisão intermediária (precisão inter-corridas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes.
 - Terceiro nível: estudos multilaboratoriais.



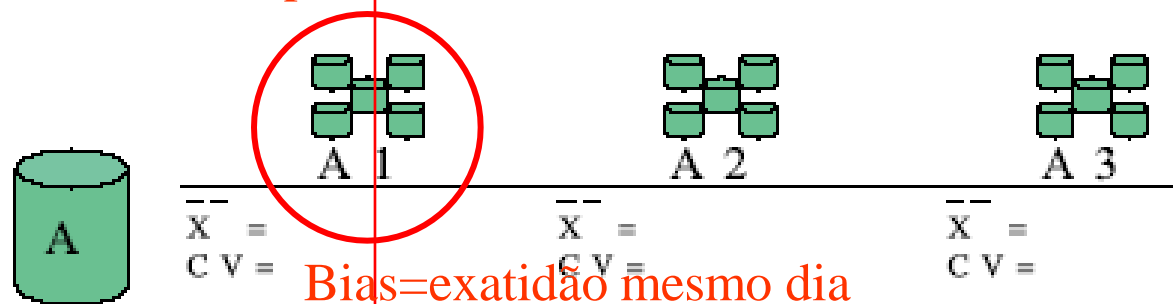
IV. EXATIDÃO

- ◆ Expressa a concordância entre o valor obtido para uma amostra e o valor nominal teórico.
- ◆ $\text{Exatidão (\%)} = (\text{Valor obtido} / \text{valor esperado}) \times 100$
- ◆ Também chamado de “Bias”.



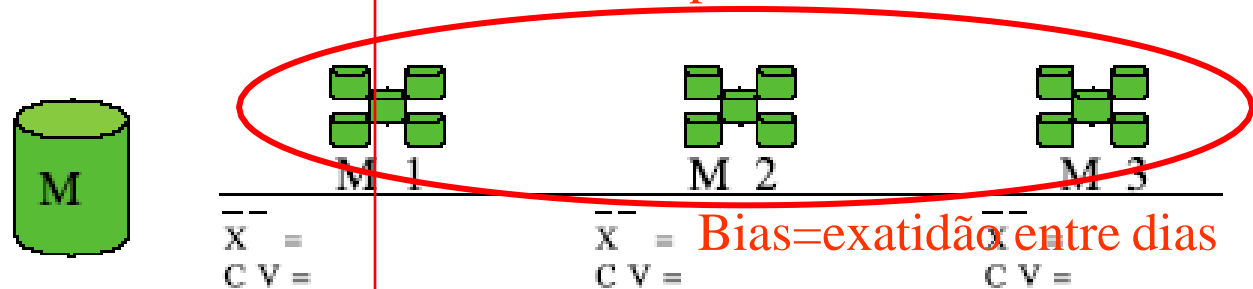
Exatidão e Precisão Podem Ser Avaliados Simultaneamente

SD e RSD=precisão mesmo dia

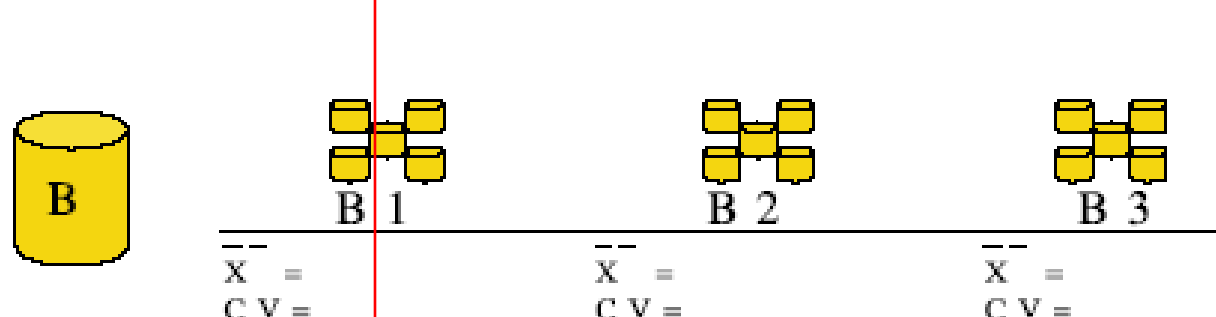


Bias=exatidão mesmo dia

SD e RSD=precisão entre dias



Bias=exatidão entre dias



Mesmo dia

Exatidão e Precisão – Adição de Padrão

- ◆ No método em que a calibração é realizada por adição de padrão: Exatidão e Precisão são avaliadas por meio de estudos de recuperação:
 - Quantidades conhecidas e crescentes do marcador são adicionadas à amostra.
 - Através da curva de calibração, a quantidade de marcador originalmente presente na amostra é determinada.
 - Amostras de CQ são preparadas e quantificadas com base na curva de calibração. Exatidão e Precisão são avaliadas.



V. ROBUSTEZ

- ♦ **A robustez** mede a capacidade do método de permanecer imune (em termos de precisão e exatidão) à pequenas (mas intencionais) variações na metodologia.
- ♦ Parâmetros que se pode variar para testar a robustez do método: pH, fluxo de fase móvel, comprimento de onda, diferentes lotes da coluna, %B, eluente, conc. reagente, etc.



Perspectivas Futuras

- ◆ Ensaios Biológicos: RE 899 contempla as necessidades de validação de metodologias para controle biológico de fitoterápicos?
- ◆ Técnicas analíticas novas ou não usuais: RMN quantitativo (qNMR), técnicas hífenadas como LC/RMN.
- ◆ Técnicas envolvendo análise quimiométrica.



Pirólise GC/MS e Análise Multivariada

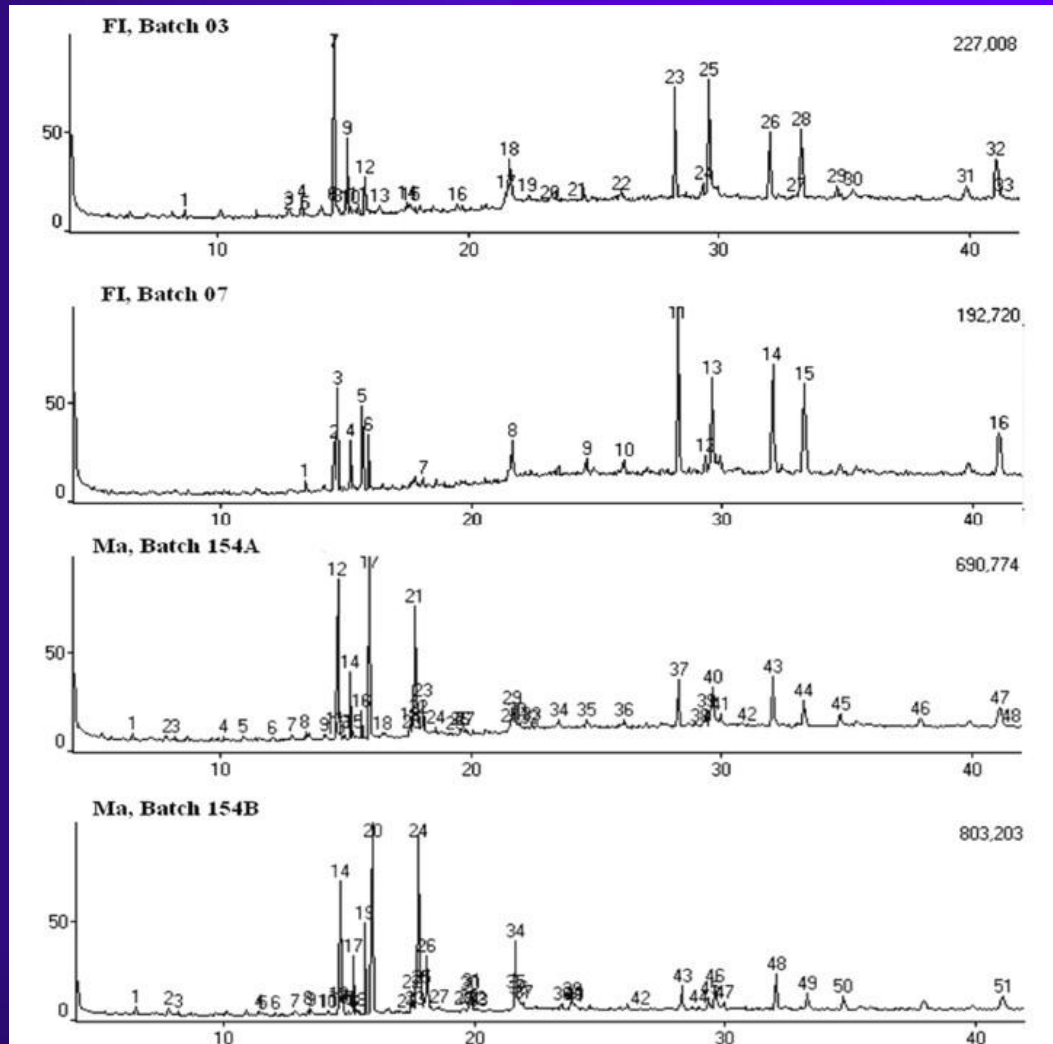


Figure 1. Representative pyrograms (450 °C) of commercial samples of *Cymbopogon citratus* of FI and Ma brands.

Pirólise GC/MS e Análise Multivariada

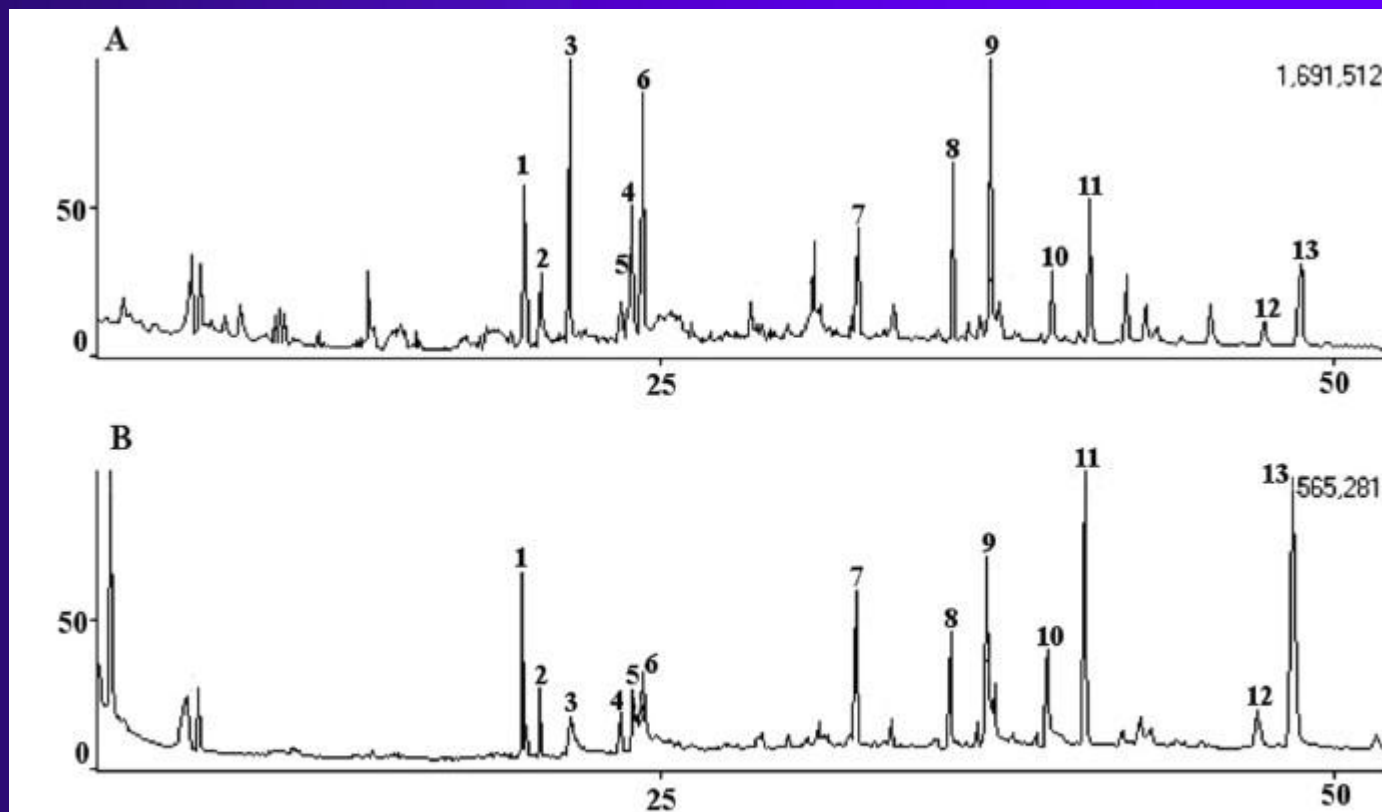


Figure 2. Comparison between the pyrolysis pattern of a hexane extract from a commercial sample (A) and an authentic sample of *C. citratus* (B) pyrolysed both at 450 °C. For tentative peak assignments see Table 1.

Pirólise GC/MS e Análise Multivariada

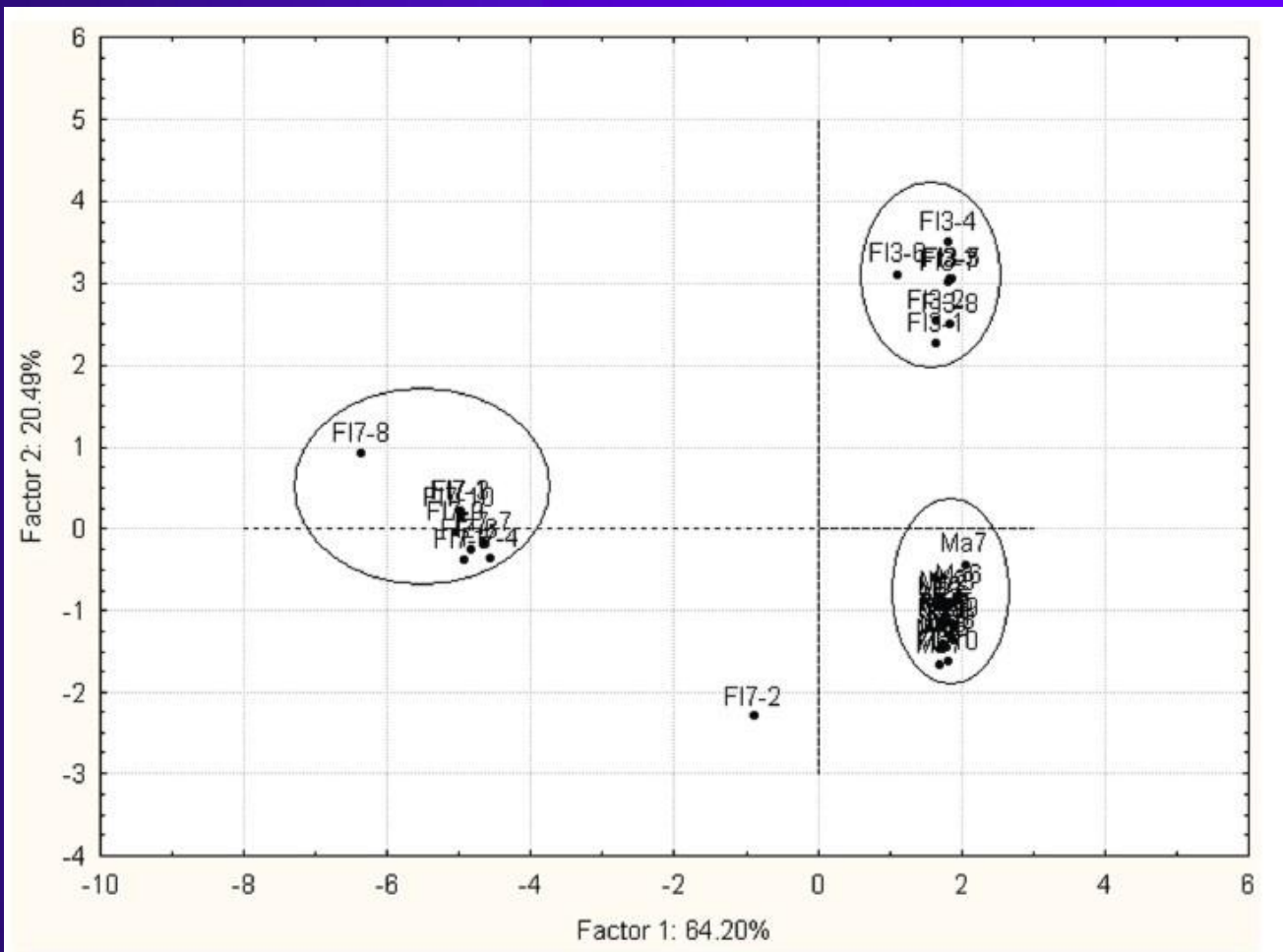


Figure 3. Factor scores in the first two calculated principal components for samples from the brand Ma (batches 154A and 154B, clustered in the lower right ellipse) and FI (batches 3 clustered at upper right ellipse and 7, clustered at middle left ellipse).

Pirólise GC/MS e Análise Multivariada

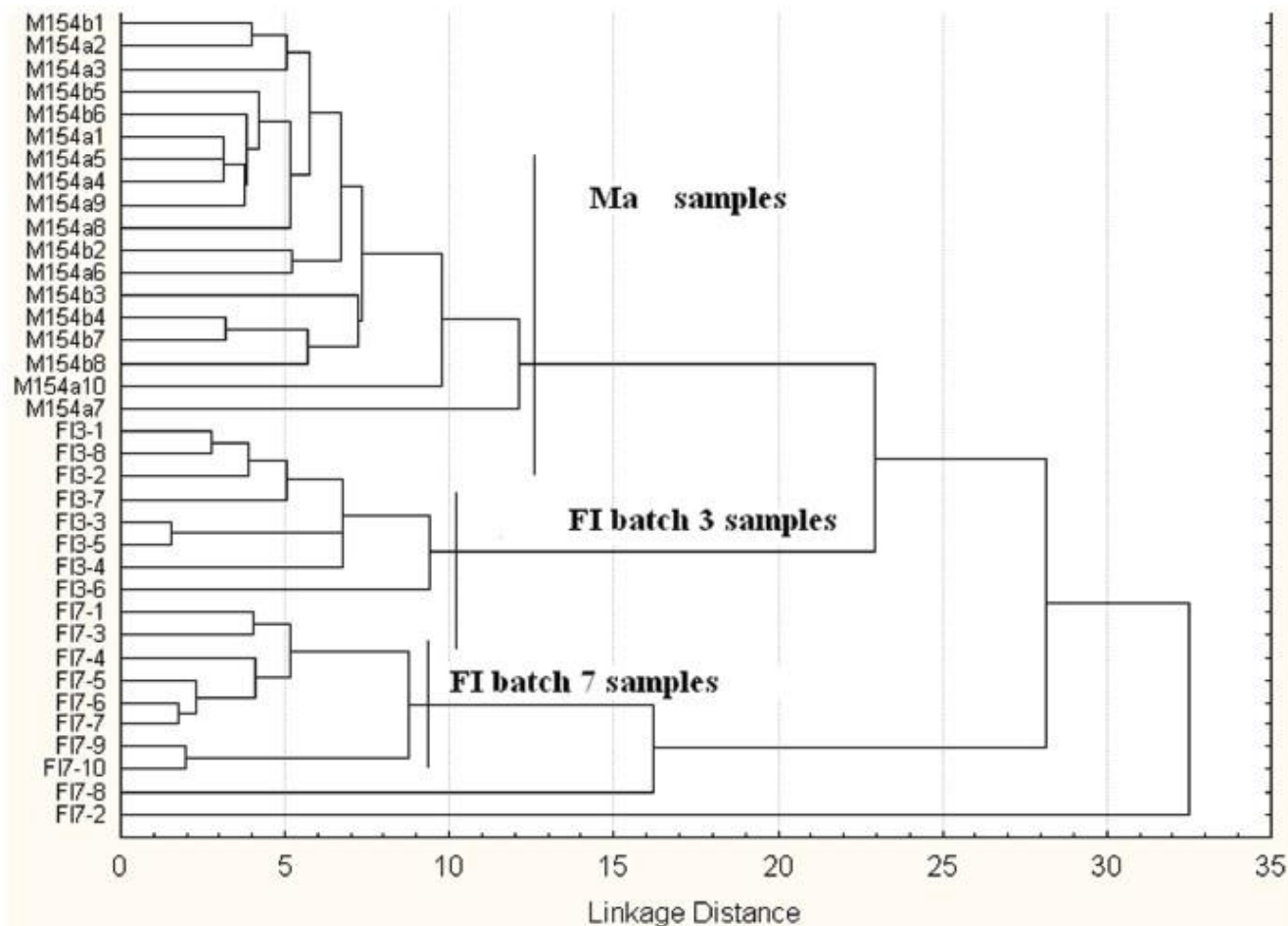
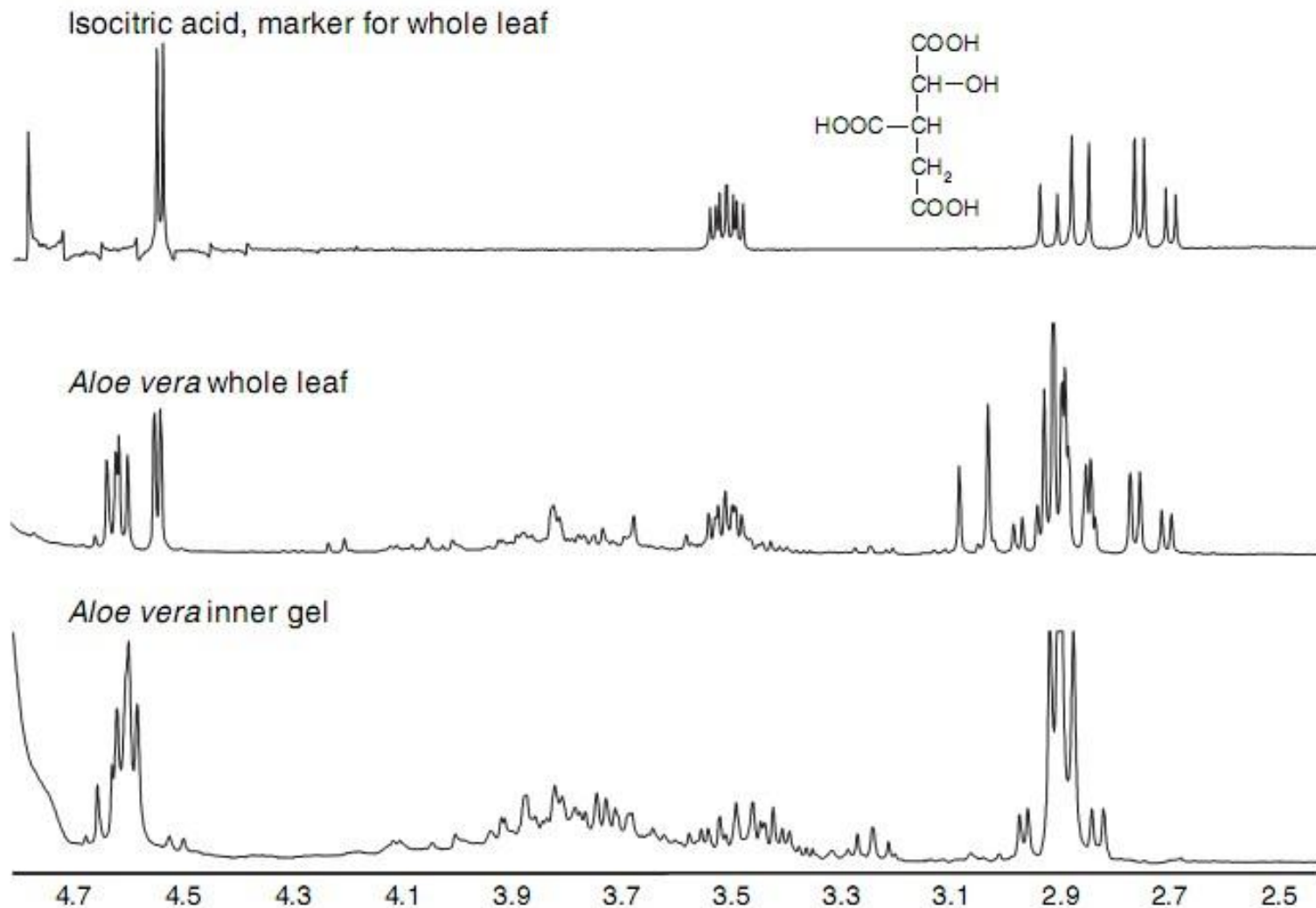


Figure 4. Dendrogram obtained from hierarchical cluster analysis of pyrolysis data from the hexane extract of commercial samples of *C. citratus* from the brands Ma and FI.

^1H -NMR no CQ Fitoterápicos



^1H -NMR no CQ Fitoterápicos

