



LUIZ EDUARDO CAVEDAL

**QUANTIFICAÇÃO DO CLONAZEPAM EM PLASMA HUMANO POR CROMATOGRRAFIA
LÍQUIDA DE ALTA PRESSÃO ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS EM UM
ESTUDO DE BIOEQUIVALENCIA**

CAMPINAS - SP

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

LUIZ EDUARDO CAVEDAL

**QUANTIFICAÇÃO DO CLONAZEPAM EM PLASMA HUMANO POR CROMATOGRRAFIA
LÍQUIDA DE ALTO DESEMPENHO ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS EM UM
ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA**

ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. GILBERTO DE NUCCI

Dissertação de mestrado apresentada à pós Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO
ALUNO LUIZ EDUARDO CAVEDAL E ORIENTADA
PELO PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI.

Assinatura do Orientador

Campinas - SP

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

C315q Cavedal, Luiz Eduardo, 1974-
Quantificação do clonazepam em plasma humano por cromatografia líquida de alta performance acoplada ao espectrômetro de massas em um estudo de bioequivalência / Luiz Eduardo Cavedal. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Gilberto De Nucci.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Clonazepam. 2. Voluntários saudáveis. 3. Equivalência terapêutica. 4. Farmacocinética. 5. Cromatografia líquida de alta pressão. 6. Espectrometria de massas. I. De Nucci, Gilberto, 1958-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Clonazepam quantification in human plasma by high performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry in a bioequivalence study

Palavras-chave em inglês:

Clonazepam
Healthy volunteers
Therapeutic equivalency
Pharmacokinetic
Chromatography, High pressure liquid
Mass spectrometry

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

Gilberto De Nucci [Orientador]
Paulo César Rosa
Ronilson Agnaldo Moreno

Data de defesa: 05-09-2014

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

LUIZ EDUARDO CAVEDAL

Orientador (a) PROF(A). DR(A). GILBERTO DE NUCCI

MEMBROS:

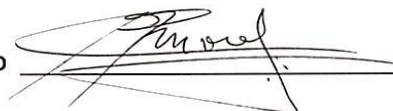
1. PROF(A). DR(A). GILBERTO DE NUCCI



2. PROF(A). DR(A). PAULO CÉSAR ROSA



3. PROF(A). DR(A). RONILSON AGNALDO MORENO



Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

Data: 05 de setembro de 2014

Dedicatória:

Dedico essa dissertação à minha mãe, Wagna Aparecida Mesquita Cavedal, que é o meu maior incentivo e a grande responsável pelo meu desenvolvimento acadêmico, e com muito carinho, dedico também ao meu filho, Caetano Moraes Cavedal, que é a maior razão para minha busca pelo sucesso profissional e evolução pessoal.

Com amor,

Luiz Eduardo Cavedal

Agradecimentos:

Agradeço primeiramente a Deus por conduzir a minha vida até este momento e sempre.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Gilberto de Nucci, por ter me aceitado como aluno e ter aberto as portas para meu aprendizado, na prática, das rotinas dos estudos de bioequivalência, no que tange todas as etapas.

Gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Ronilson Moreno, por ter me acompanhado pacientemente durante todo o período de escrita de minha dissertação.

Meus agradecimentos também para todos que trabalham no Cartesius, em especial para Prof. Dr. Gustavo Duarte Mendes, por terem me proporcionado o aprendizado no assunto em questão.

Epígrafe:

Cada momento de busca é um momento de encontro, e enquanto procuro meu tesouro, todos os dias são dias luminosos, pois eu sei que cada hora faz parte do sonho de encontrar. Enquanto procuro este meu tesouro, descubro no caminho coisas que jamais teria sonhado em encontrar, se não tivesse tido coragem de tentar.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	xv
Listas de tabelas e Quadros.....	xvii
Lista de abreviaturas.....	xix
Resumo.....	xxi
Abstract.....	xiii
1 Introdução.....	25
1.1 Revisão bibliográfica	25
1.2 Medicamento genérico	30
1.3 Estatísticas de Mercado	32
1.4 Testes de bioequivalência	33
1.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Espectrometria de massas	35
2 Objetivo	38
3 Métodos.....	39
3.1 Padrões de calibração e controles de qualidade	39
3.2 Reagentes Químicos	39
3.3 Análise da Droga.....	40
3.4 Condições Cromatográficas	41
3.5 Condições Espectrométricas	42
3.6 Estabilidade	43
3.7 Validação da metodologia analítica para quantificação do clonazepam.....	44
3.7.1 Especificidade.....	44
3.7.2 Recuperação	44
3.7.3 Curva de calibração	45
3.7.4 Limite de detecção e limite de quantificação.....	46
3.7.5 Precisão	46
3.7.6 Exatidão.....	47
4 Protocolo Clínico.....	48
4.1 Projeto do Estudo.....	48
4.2 Formulações.....	51
4.3 Programação do estudo	51
4.4 Seleção dos Voluntários.....	52
4.5 Critério de inclusão.....	52

4.6 Critério de exclusão.....	53
4.7 Dosagem.....	53
4.8 Critério de retirada.....	54
4.9 Produtos estudados.....	54
5 Análise Estatística e Farmacocinética	55
6 Resultados e Discussão	55
6.1 Equipamentos e materiais	58
7 Referências bibliográficas.....	61
Anexo 1.....	79
Anexo 2.....	81
Anexo 3.....	91
Anexo 4.....	125
Anexo 5.....	129

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formula estrutural do Clonazepam	26
Figura 2 - Curva de calibração.....	56
Figura 3 - Cromatograma LOQ.....	57
Figura 4 - Média das concentrações vs tempos	60
Figura 5 – Cromatograma do ponto mais alto.....	69
Figura 6 – Cromatograma do plasma branco normal.....	70
Figura 7 - Cromatogramas Hiperlipêmicos do clonazepam e do padrão interno.....	71
Figura 8 – Cromatograma do plasma hemolizado.	72
Figura 9 - Espectro de massas do Clonazepam em Monitoramento de Reação Multipla (MRM) – Full Scan.	73
Figura 10 - Espectro de massas do padrão interno em Monitoramento de Reação Multipla (MRM) – Full Scan.	74
Figura 11 - Rota de fragmentação do íon do clonazepam (A) e do padrão interno (B) selecionado no modo de reação múltipla.	75

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Principais reações adversas com o uso do clonazepam.....	29
Quadro 2 - Quadro comparativo entre o produto Teste e referência.	54
Tabela 1 – Condições cromatograficas utilizadas durante o ensaio.....	42
Tabela 2 – Parametros gerais do espectrometro de massas.	43
Tabela 3 – Parametros individuais de detecção de cada ion monitorado (MRM).....	43
Tabela 4 - Exames clínicos e laboratoriais realizados pré e pós estudo.	49
Tabela 5 - Padronização da alimentação dos voluntários durante o estudo	51
Tabela 6 - Média geométrica dos parâmetros farmacocinéticos obtidos dos 33 voluntários depois da administração de 2 mg de Clonazepam comprimido.	59

LISTA DE ABREVIATURAS

$C_{\text{máx}}$	Concentração plasmática máxima
$T_{\text{Máx}}$	Tempo para atingir o $C_{\text{Máx}}$
ASC	Área sob a curva
ASC_{0-72}	Área sob a curva até 72h
CI	Intervalo de Confiança
$T_{1/2}$	Tempo de meia vida
LC-MS-MS	Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
QCA	Amostra de controle de qualidade A
QCB	Amostra de controle de qualidade B
QCC	Amostra de controle de qualidade C
GABA	Ácido Gama Amino Butírico
DP	Desvio Padrão
PE	Poder estatístico
MIM	Valor mínimo
MÁX	Valor máximo
FDA	Food and Drug Administration

objetivo: O objetivo foi o desenvolvimento de um método rápido, sensível e específico para quantificar clonazepam em plasma humano. Posteriormente esse método foi utilizado em um estudo de bioequivalência para comparar a biodisponibilidade entre duas formulações de clonazepam comprimidos de 2 mg em 40 voluntários saudáveis de ambos os sexos. **Materiais e**

métodos: O estudo foi conduzido em dois períodos de confinamento dos voluntários, com 18 dias de intervalo entre o primeiro período e o segundo. Os plasmas dos voluntários, após a administração dos medicamentos, foram obtidos em diversos pontos de coleta dentro de um intervalo de 72 horas. As concentrações de clonazepam foram analisadas por cromatografia de fase reversa combinada e espectrometria de massas (LC-MS-MS) com eletrospray de ionização positiva usando o método de monitoramento de íon selecionado. Das curvas de concentração plasmática de Clonazepam vs tempo foram obtidos os seguintes parâmetros farmacocinéticos: C_{max} e ASC_{0-72} .

Resultados: A média geométrica da relação Clonazepam/ Rivotril® 2 mg foi de 100.30% (90% IC=91.59-109.85%) para C_{max} e 101.1% (90% IC=97.60-104.72%) para ASC_{0-72} .

Conclusão: Considerando que o IC de 90% (intervalo de confiança) para ambos C_{max} e ASC_{0-72} obedeceram ao intervalo proposto pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de 80-125%, foi concluído que Clonazepam 2 mg comprimido é bioequivalente ao Rivotril® 2 mg .

Palavras chaves – espectrometria de massas, LC-MS-MS, biodisponibilidade, farmacocinética.

ABSTRACT

Objective: The objective was a development of a rapid, sensitive and specific method for clonazepam quantification in human plasma. This method was used in a bioequivalence study to compare the bioavailability of two clonazepam tablet 2 mg formulations in 40 health volunteers of both sexes. **Material and methods:** The study was conducted in two-period crossover design and an 18 days washout period. The volunteers plasma samples were obtained, after dose, over several times until 72-hour interval. Clonazepam concentrations were analysed by combined reversed phase liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) with positive ion electrospray ionization using selected ion-monitoring method. From the Clonazepam plasma concentration vs time curves the following pharmacokinetic parameters were obtained: C_{max} and ASC_{last} . **Results:** Geometric mean of Clonazepam/ Rivotril® 2 mg individual percent ratio was 100.30% (90% CI=91.59-109.84%) for C_{max} and 101.1% (90% CI=97.61-104.72%) for ASC_{0-72} . **Conclusion:** Since the 90% CI (confidence interval) for both C_{max} and ASC_{last} were within the 80-125% interval proposed by the Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), it was concluded that Clonazepam 2 mg tablets was bioequivalent to Rivotril® 2 mg, according to both the rate and extent of absorption.

Key words – tandem mass spectrometry, LC-MS-MS, bioavailability, pharmacokinetics

1 Introdução

1.1 Revisão bibliográfica

Histórico

O Clonazepam é um derivado das benzodiazepinas¹, utilizado para o tratamento da ansiedade, do transtorno do pânico e como coadjuvante no controle de vários tipos de ataques epiléticos¹⁻³ (espasmos infantis, epilepsias mioclônicas e crises de ausências). Este fármaco atua como facilitador da transmissão GABAérgica no cérebro por um efeito direto sobre os receptores GABA.

O Clonazepam é um benzodiazepínico derivado da 7-nitrobenzodiazepina^{3,4} a principal função é a leve inibição do sistema nervoso central (SNC)⁵.

O nome químico é o 5-(o-clorofenil)-1,3-diidro-7-nitro-2H-1,4-benzodiazepina-2-ona, sua fórmula molecular é $C_{15}H_{10}ClN_3O_3$, peso molecular de 315,72 g/mol. É um pó cristalino levemente amarelo, tem um ligeiro odor é insolúvel em água, é pouco solúvel em álcool, é moderadamente solúvel em acetona e clorofórmio e é muito pouco solúvel em éter⁶.

Atua como depressor do SNC, produzindo todos os seus níveis de depressão, desde uma leve sedação até hipnose, dependendo da dose⁷. O Clonazepam estimula os receptores de GABA (ácido gama aminobutírico) no sistema reticular ativador ascendente. Dado que o GABA é inibidor, a estimulação dos receptores aumenta a inibição e bloqueia a excitação cortical e límbica, após estimular a formação reticular do tronco cerebral⁷. O Clonazepam apresenta efeitos benéficos nas epilepsias generalizadas e focais⁶.

O Clonazepam é rapidamente absorvido após administração oral, a biodisponibilidade da oral é de 90% a concentração máxima é atingida dentro de 1 e 4 horas⁸.

É absorvido pelo trato gastrointestinal e distribuído rapidamente a vários órgãos e tecido corporais, com captação preferencial pelas estruturas cerebrais, tem ligação de 85% com as proteínas plasmáticas, aproximadamente. O Clonazepam é altamente metabolizado e menos de 2% é eliminado na urina de forma inalterada, a meia vida de eliminação é de 30 a 40 horas²¹. Seu principal metabólito é o 7-aminocloanzepam (7ACLO)⁹⁻¹¹.

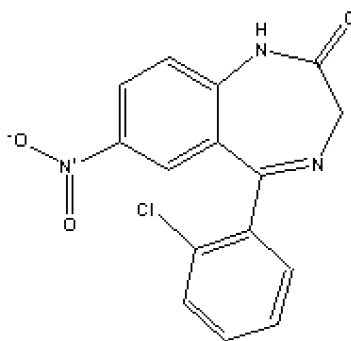


Figura 1 - Formula estrutural do Clonazepam

Indicações

As principais indicações do Clonazepam utilizado isoladamente ou como adjuvante são o tratamento de crises epiléticas, de crises de ausências típicas e atípicas. Está indicado como medicação de segunda linha em espasmos infantis⁸.

Em crises epiléticas do tipo grande mal, parciais simples, parciais complexas e tônico-crônicas generalizadas secundárias, indicado como tratamento de terceira linha⁸.

Além disso, é indicado para o tratamento de:

Transtornos de Ansiedade: Como ansiolítico em geral; Distúrbio do pânico; Fobia social ¹².

Transtornos do Humor: Transtorno afetivo bipolar: tratamento da mania; Depressão maior: como adjuvante de antidepressivos (depressão ansiosa e na fase inicial de tratamento)¹².

Emprego em algumas síndromes psicóticas¹²: Tratamento da acatisia; Tratamento da síndrome das pernas inquietas; Tratamento da vertigem e sintomas relacionados à perturbação do equilíbrio, como náuseas, vômitos, pré-síncope ou síncope, quedas, zumbidos e distúrbios auditivos. Tratamento da síndrome da boca ardente^{8,12}.

Contra indicado por pacientes com história de sensibilidade aos benzodiazepínicos ou a qualquer dos componentes da fórmula, por pacientes com insuficiência respiratória grave ou com insuficiência hepática grave. Pode ser usado em pacientes com glaucoma de ângulo aberto quando estão recebendo terapia apropriada, mas é contra-indicado em glaucoma agudo de ângulo fechado.

A relação risco-benefício deverá ser avaliada na presença de intoxicação alcoólica aguda, antecedentes de dependência de drogas, disfunção hepática ou renal, depressão mental grave, hipoalbuminemia, miastenia grave, psicose, porfiria ou doença pulmonar obstrutiva crônica grave¹³.

Evitar o consumo de álcool e outros depressores do SNC durante o tratamento. Ter precaução com idosos se ocorrerem sonolência, enjôos, torpeza e instabilidade. O Clonazepam atravessa a placenta, devendo, por isso, ser evitado seu uso durante a gravidez, principalmente no primeiro trimestre. Por ser excretado no leite materno, deve-se avaliar a relação risco-benefício antes de ser prescrito durante o período de

lactação, já que pode provocar sedação no recém-nascido e possivelmente dificuldades de alimentação e perda de peso. No tratamento em longo prazo em crianças, deve-se avaliar a relação risco-benefício devido aos possíveis efeitos adversos sobre o desenvolvimento físico e mental, que possa não se evidenciar por muitos anos⁷.

Quando utilizado junto com analgésicos opiáceos, reduzir a dose destes. O uso de antidepressivos tricíclicos pode diminuir o limiar convulsivo, devendo, portanto, modificar-se a dose de clonazepam. A carbamazepina pode aumentar seu metabolismo e diminuir, por isso, sua concentração sérica. A prescrição simultânea de haloperidol pode produzir uma alteração no padrão ou frequência das convulsões epileptiformes. Pode diminuir os efeitos terapêuticos de levodopa. Os barbitúricos e difenil-hidantoína reduzem o efeito do Clonazepam. Valproato de magnésio e ácido valpróico aumentam o risco de crises de ausência⁷.

A superdose de em geral se manifesta por depressão do sistema nervoso central, em graus variáveis, desde sonolência, confusão mental, ataxia, excitação, lentidão de movimento disartria e nistagmo. Coma, hipotensão e depressão respiratória, ocorrem ocasionalmente, mas são clinicamente tratáveis e reversíveis se tiver sido ingerido sozinho. Se ocorrer coma, normalmente tem duração de poucas horas; porém, pode ser prolongado e cíclico, particularmente em pacientes idosos. Os efeitos de depressão respiratória por benzodiazepínicos são mais sérios em pacientes com doença respiratória.

Os benzodiazepínicos aumentam os efeitos de outros depressores do sistema nervoso central⁸. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a administração de Clonazepam deve ser feita preferivelmente em jejum e dosar o princípio ativo deste fármaco^{14,15}.

<i>Distúrbios do Sistema Imunológico</i>	Reações alérgicas e muito poucos casos de anafilaxia.
<i>Distúrbios psiquiátricos</i>	Diminuição da concentração, inquietação, estado de confusão e desorientação. Foram observadas as seguintes reações paradoxais: excitabilidade, irritabilidade, agressividade, agitação, nervosismo, hostilidade, ansiedade, distúrbios do sono, pesadelos e sonhos anormais. Em casos raros, pode ocorrer perda da libido.
<i>Distúrbios do sistema nervoso</i>	Sonolência, lentidão de reações, hipotonia muscular, tonturas, ataxia. Em casos raros observou-se cefaléia. A amnésia anterógrada pode ocorrer durante o uso de benzodiazepinas em doses terapêuticas, sendo que o risco aumenta com as doses mais elevadas.
<i>Distúrbios oculares</i>	Podem ocorrer distúrbios reversíveis da visão (diplopia), particularmente no tratamento de longo prazo ou de alta dose.
<i>Distúrbios do sistema respiratório</i>	Depressão respiratória. Aumento da produção de saliva ou de secreção brônquica em lactentes e crianças. Recomenda-se particular atenção à manutenção das vias aéreas livres nesses pacientes.
<i>Distúrbios gastrintestinais</i>	Náuseas e sintomas epigástricos em casos raros.
<i>Distúrbios da pele e dos tecidos subcutâneos</i>	Urticária, prurido, erupção cutânea, perda de cabelo transitória, alterações da pigmentação podem ocorrer em casos raros.
<i>Distúrbios musculoesqueléticos</i>	Fraqueza muscular.
<i>Distúrbios renais e urinários</i>	Incontinência urinária em casos raros.
<i>Distúrbios do sistema reprodutivo</i>	Raros casos de disfunção erétil.
<i>Exames complementares</i>	Pode ocorrer diminuição da contagem de plaquetas em casos raros.

Quadro 1 - Principais reações adversas com o uso do clonazepam.

1.2 Medicamento genérico

Em muitos países a existência de medicamentos genéricos é possível após vários estágios a serem seguidos pelos produtores, frente às exigências dos órgãos locais para a aprovação da produção e comercialização. São avaliadas, segundo as boas práticas de fabricação, as obtenções de formulações de qualidade e reprodutibilidade do processo. O termo genérico é derivado da palavra latina *genus*, que significa classe geral¹⁶.

A razão do grande sucesso dos medicamentos genéricos, em vista da sua participação no mercado mundial, é a econômica, pela ausência dos mesmos encargos da produção de medicamentos patenteados, além de envolver um processo mais curto e menos trabalhoso na sua aprovação, o que traduz na comprovação da produção de um fármaco de qualidade, com características equivalentes ao produto referencia determinadas por processos analíticos de alta precisão e exatidão, nos quais os fármacos e/ou seus metabólitos são identificados e quantificados em diferentes fluídos orgânicos, principalmente plasma. Deve-se salientar, porém, que duas formulações equivalentes podem não ser idênticas, o importante é que os comportamentos delas não se difiram significativamente.

A determinação de diferentes substâncias em fluídos biológicos é realizada através de Testes de biodisponibilidades. Biodisponibilidade é uma medida da extensão de uma droga terapeuticamente ativa que atinge a circulação sistêmica e está disponível no local de ação¹⁷.

A comparação da biodisponibilidade entre diferentes formulações resultou no termo bioequivalência. Este é definido como a taxa e/ou extensão da absorção de princípios ativos similares na mesma dose molar e na mesma forma farmacêutica

quando estudados sob as mesmas condições experimentais, em tal nível em que a eficácia e segurança sejam essencialmente as mesmas.

A bioequivalência é um parâmetro derivado da comparação das características de absorção de dois ou mais produtos administrados pela mesma via. Os termos comparados são a quantidade de fármaco absorvida e a velocidade do processo de absorção, que devem apresentar semelhanças estatisticamente significativas. Cabe ressaltar que, até o momento, os ensaios de bioequivalência são efetuados em seres humanos, relacionando-se, portanto, ao desempenho da absorção do fármaco que é liberado a partir de sua forma farmacêutica¹⁸.

A Lei n.º 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece como sendo medicamento genérico, um medicamento similar a um produto de referência ou inovador, que se pretende ser com este intercambiável⁷, geralmente produzido após a 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 DCI¹⁹.

Todo medicamento genérico deve seguir rigorosamente todas as especificações contidas nessa Lei, conforme abaixo citado:

Denominação Comum Brasileira (DCB) – denominação do fármaco ou princípio farmacologicamente ativo aprovado pelo órgão federal responsável pela vigilância sanitária.

Denominação Comum Internacional (DCI) – denominação do fármaco ou princípio farmacologicamente ativo recomendado pela Organização Mundial de Saúde.

Medicamentos Intercambiáveis – equivalente terapêutico de um medicamento de referência, comprovados, essencialmente, os mesmos efeitos de eficácia e segurança.

Bioequivalência – Consiste na demonstração de equivalência farmacêutica entre produtos apresentados sob a mesma forma farmacêutica, contendo idêntica composição qualitativa e quantitativa de princípios ativos, e que tenham comparável biodisponibilidade, quando estudados sob um mesmo desenho experimental.

Biodisponibilidade – Indica a velocidade e a extensão de absorção de um princípio ativo em uma forma de dosagem, a partir de sua curva concentração/tempo na circulação sistêmica ou sua excreção na urina¹⁹.

1.3 Estatísticas de Mercado

Atualmente temos um total de 135 classes terapêuticas que são comercializadas como genéricos produzidos por 117 laboratórios fabricantes.

De fevereiro de 2000 a novembro de 2013 o número de registros de medicamentos genéricos passou de 94 para 3591 nas farmácias e de quase nenhum para 126 nos hospitais¹⁵.

Dos medicamentos genéricos produzidos no Brasil, 88% são fabricados e comercializados no mercado interno e 12% são importados de países como Canadá, Índia, Espanha, Estados Unidos e Alemanha dentre outros.

De fevereiro de 2000 a novembro de 2013 o número de apresentações chegou a 21.151.

Os estudos de bioequivalência correspondem a 45% de todos os Testes realizados nos medicamentos genéricos, atualmente¹⁵.

1.4 Testes de bioequivalência

Os critérios para a comprovação da bioequivalência de medicamentos estabelecem que a mesma só exista, para a maioria dos casos, quando são cumpridos os requisitos, que configuram na ausência de diferença significativa na velocidade de extensão de absorção de um fármaco. Este fato demonstra que, caso isso não ocorra, os produtos não podem ser considerados bioequivalentes, mesmo quando cumprem com as especificações de qualidade, relacionadas à atividade e teor do fármaco, uniformidade de conteúdo, desintegração, dissolução, etc^{18,19}.

Sabendo-se que as características farmacotécnicas do medicamento podem modificar a atividade farmacológica de seu princípio ativo, deve-se estabelecer as situações em que o efeito é dependente da quantidade absorvida e da velocidade de absorção. Estas variações podem levar a consequências como ineficácia clínica e sintomas de intoxicação²⁰.

O Teste de bioequivalência avalia uma nova formulação ou forma farmacêutica que substitui uma mais antiga ou quando se aumenta a linha de produtos, ou ainda para verificar as novas características físicas de um produto, comparar dois lotes de um mesmo fármaco, dois métodos de produção, dois locais diferentes de produção, ou quando o produtor deseja constatar se o novo produto é semelhante a outro referencia.

A legislação Brasileira exige, para aceitar a equivalência de fármacos, a existência de bioequivalência farmacocinética, e esta é obtida através do estudo de características específicas¹⁹.

Os parâmetros farmacocinéticos que avaliam a biodisponibilidade de cada fármaco analisado são obtidos a partir das curvas de concentração plasmática do fármaco em relação ao tempo e analisados estatisticamente para a determinação de bioequivalência^{19,21,22}. São elas:

- A ASC_{0-t} , área sob a curva do tempo zero até o último ponto de coleta, determina a extensão do princípio ativo inalterado que atinge a circulação sistêmica em relação à quantidade de fármaco administrado. É calculada pela integração da área sob a curva da concentração plasmática em relação ao tempo desde a administração do fármaco até a última coleta sanguínea, obtida pela aplicação da regra trapezoidal. Caso tenha adicionado ao seu valor a fração C_t/K_e , Ter-se-á o valor de ASC tendendo ao infinito (ASC_{0-inf}), no qual C_t é a última concentração do fármaco determinada experimentalmente e K_e é a constante de eliminação da fase terminal, estimada pela regressão linear dos pontos que descrevem a fase de eliminação da curva de concentração plasmática pelo tempo, em um gráfico mono logarítmico.
- C_{max} , Concentração plasmática máxima, é o pico da concentração plasmática que se registra após a administração de um fármaco.
- T_{max} , tempo em que se atinge a concentração plasmática máxima, é o ponto de equilíbrio entre absorção e eliminação e representa a velocidade de absorção do fármaco, após a administração oral, ambos dados obtidos diretamente das curvas.

Deve-se realizar análise de variância (ANOVA) dos parâmetros farmacocinéticos ASC_{0-t} e C_{max} para avaliar os efeitos de seqüência (grupo), de voluntários, de período, e de tratamento.

Para um estudo que emprega dose única dos medicamentos Teste e referência, a ANOVA é geralmente realizada com as razões de ASC_{0-t} e C_{max} entre as formulações, transformadas logaritmicamente. A distribuição dos dados transformados se aproxima mais a uma distribuição normal em relação aos dados não transformados. O poder esperado para o Teste é acima de 80% e o nível de significância de 5%, construindo-se um intervalo de confiança (IC) de 90% para a razão entre as médias dos valores obtidos com os medicamentos Teste e referência, para cada um destes parâmetros, utilizando-se dados transformados logaritmicamente. T_{max} será analisado como diferença individual: Teste – referência, construindo-se um intervalo de confiança (IC) de 90%, utilizando-se Teste não paramétrico.

Dois medicamentos serão considerados bioequivalentes quando I.C. de 90% para razão entre as médias de ASC_{0-t} e de C_{max} estiver compreendido entre 80% e 125%. Outros limites poderão ser aceitos mediante justificativas científicas. Quando clinicamente relevante $T_{máx}$ deverá também ser considerado^{19,21,22}.

1.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Espectrometria de massas

O método analítico aplicado a Testes de bioequivalência, na mensuração da concentração de diferentes fármacos em matrizes biológicas deve ser exato, preciso e específico.

A cromatografia líquida de alta eficiência (C.L.A.E.) é um método de separação químico normalmente utilizado para análise de fármacos em fluídos biológicos em

Testes de bioequivalência além de uma infinidade de outras aplicações em diversos setores da indústria química e farmacêutica.

A técnica é baseada numa fase líquida móvel que flui através de uma fase sólida estacionária, e a separação dos diferentes componentes do fluído biológico a ser analisado na fase móvel ocorre devido à interação com a fase estacionária, e dá-se por partição, adsorção ou por troca iônica.

Os dados obtidos são alturas ou áreas de picos da substância eluída, em diferentes tempos de eluição, saindo da coluna primeiramente àquela com menor interação e por fim aquela com maior afinidade com a fase estacionária. A concentração de cada substância é obtida pela relação entre o analisado e o padrão interno³⁰, além da área do pico cromatográfico.

Diferentes interfaces são utilizadas no acoplamento entre a cromatografia líquida e a espectrometria de massas, o que pode ser um problema, pois o espectrômetro requer íons em fase gasosa e as substâncias normalmente analisadas pela C.L.A.E. são compostos não voláteis^{15,30}. Aquele que parece ser o método ideal de ionização entre a C.L.A.E. e a espectrometria de massas é o electrospray. A fase móvel é borrifada após deixar o capilar, na extremidade do qual existe uma diferença de potencial de vários quilovolts. A natureza da fase móvel, a velocidade do fluxo e a diferença de potencial são parâmetros que influenciam no tamanho das gotículas, bem como a carga de cada uma delas^{15,30}. As gotículas caminham contra um fluxo de nitrogênio, que as faz diminuir de tamanho por evaporação do solvente, restando várias moléculas do analisado, que, carregadas eletricamente, vão se separando até

praticamente sobram íons, cuja carga dependerá do número de pontos de ionização de cada molécula em questão ou agregados eletricamente carregados (clusters)²⁴.

Os analisadores dos espectrômetros de massa separam as espécies carregadas eletricamente, de acordo com a relação massa/carga de cada uma, a partir do que determinará a abundância e massa de cada uma das espécies iônicas. Um dos quatro tipos de analisadores mais utilizados é o quadrupolo. É formado por quatro hastes dispostas de tal forma que configuram um quadrado, pelo centro do qual passam as espécies carregadas eletricamente. Assim, todos os íons formados no eletrospray entram no primeiro quadrupolo do espectrômetro, onde será separada, por potencial elétrico e rádio frequência, apenas a molécula com relação massa/carga desejada. No quadrupolo seguinte do espectrômetro, o íon colide com um gás inerte (argônio) e produz fragmentos também carregados. Esses são denominados íons produtos e são característicos para cada substância. Os íons produto são separados no terceiro quadrupolo do espectrômetro, para serem analisados e quantificados no detector. Para cada potencial elétrico, íons de determinada relação massa/carga são selecionados, pois só eles atravessarão o quadrupolo, atingindo o detector eletrônico no final do aparelho. Todos os demais são refletidos^{23,24}.

Este método analítico tem a característica de ser altamente seletivo. Quando se tem uma mistura de substâncias eluídas e advindas do cromatógrafo, o primeiro quadrupolo irá separar somente pela relação massa/carga desejada, porém, caso haja mais de uma com a mesma relação, a colisão que se dá no segundo quadrupolo irá formar novas espécies, que serão definitivamente separadas no terceiro, restando somente o íon desejado pelo analisador.

O processo analítico inicia-se com a infusão da mistura em análise no sistema, pelo eletrospray, sem a operação do segundo e terceiro quadrupolos (modo scan), gerando espectros de massa totais que registram todas as moléculas. Ajustes serão feitos para que o sinal da molécula em estudo seja máximo (energia do cone). Após os ajustes, o gás de colisão é ligado e os espectros de massa por “*collision induced dissociation*” (C.I.D.) são registrados. Novos ajustes são realizados posteriormente para que o sinal do íon produto selecionado seja máximo, principalmente pela energia de colisão.

2 Objetivo

O objetivo desse estudo foi o desenvolvimento de um método rápido, sensível e específico para a quantificação de Clonazepam em plasma humano usando a cromatografia líquida de alto desempenho acoplada ao espectrômetro de massas com ionização por eletrospray positivo⁵. O Diazepam foi escolhido como padrão interno em função de sua similaridade com a molécula do Clonazepam, fácil disponibilidade e baixo custo.

Esse método foi subsequentemente utilizado em um estudo de bioequivalência entre a formulação de Clonazepam 2 mg comprimido da Ranbaxy Laboratories Limited, India (formulação Teste) e Rivotril® 2 mg comprimido da Roche Laboratórios Ltda, Brazil (formulação referência), em 40 voluntários saudáveis de ambos os sexos.

3 Métodos

3.1 Padrões de calibração e controles de qualidade

Soluções master de Clonazepam e Diazepam foram preparadas em acetonitrila/água (50:50, v/v) nas concentrações de 1mg/mL. Curvas de calibração de Clonazepam foram preparadas em plasmas brancos nas concentrações de 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 7.5, 10.0, 20.0 e 50.0 ng/mL e cada concentração foi analisada em duplicata. As amostras de controle de qualidade foram preparadas em plasmas brancos nas concentrações de 1.5, 9.0 e 45.0 ng/mL (QCA, QCB e QCC respectivamente).

3.2 Reagentes Químicos

Clonazepam foi obtido da Nortec Química (Brasil). Diazepam foi obtido da Globo Química (Brasil). Acetonitrila, metanol, dietil éter, ácido fórmico e o ácido acético glacial foram adquiridos na J.T. Baker (USA) e o hexano na Mallinckrodt (USA). Os plasmas humanos foram coletados dos voluntários saudáveis isentos da droga. Os plasmas foram obtidos pela centrifugação do sangue dos voluntários com solução de heparina sódica. A mistura de plasma foi preparada e estocada a uma temperatura de -20°C até a necessidade de uso.

Para conduzir os testes, a qualidade dos padrões de referência utilizados no preparo das soluções foi assegurada. Como foram utilizados padrões de referência autenticados, o fornecedor e o número do lote dos padrões estão mostrados na tabela abaixo:

Padrão	Finalidade	Manufaturado	Fornecedor	Lote	Validade
Clonazepam	Analito	Nortec Química	EMS	4068133 CZC-0024	01/04/2006
Diazepam	Padrão Interno	Globe Química	EMS	3115907 3CGS004	10/2006

3.3 Análise da Droga

Amostras de sangue (5 mL) foram coletadas por um cateter introduzido nas veias de cada voluntário, utilizando heparina sódica como anticoagulante, nos seguintes tempos: 00:20, 00:40, 01:00, 01:20, 01:40, 02:00, 02:20, 02:40, 03:00, 03:20, 3:40, 04:00, 04:30, 05:00, 06:00, 08:00, 12:00, 16:00, 24:00, 36:00, 48:00 e 72:00 horas.

As amostras de sangue foram centrifugadas por 10 minutos à aproximadamente 4.000 rpm em temperatura de 4°C e o plasma armazenado à temperatura de -20°C até sua respectiva análise. O Clonazepam e o padrão interno (Diazepam) foram extraídos dos plasmas dos voluntários usando extração por fase líquida, e posteriormente quantificada por cromatografia líquida acoplado à espectrometria de massas.

Resumindo, 500 µL de cada amostra de plasma foram introduzidos dentro de um tubo de vidro seguido do padrão interno (50 µL de diazepam à 100 ng/mL) e misturado no vórtex por aproximadamente 10 segundos, adicionado 4 mL de solvente orgânico (hexano/dietil-éter: 20/80; v/v) e misturado no vórtex por mais 40 segundos, sendo que este passo deve ser realizado em tubos ambares. Depois de centrifugado

por 10 min a 2.000 rpm, o sobrenadante foi transferido para outro tubo, no qual o solvente orgânico foi evaporado em atmosfera de nitrogênio a 40°C. O resíduo foi então ressuspendido em 150 µL de acetonitrila/água (50/50; v/v) e colocado em um vial que por sua vez foi tampado e colocado no auto-sampler.

3.4 Condições Cromatográficas

Uma alíquota de 10 µL do extrato de cada plasma foi injetado numa coluna analítica Genesis C₁₈ 4 µm (100 mm x 2,1 mm de diâmetro interno), com fluxo de 0,450 mL/min de fase móvel. Sob essas condições, o tempo de retenção do Clonazepam foi de 1,5 min, e o do padrão interno (PI) foi de 1,6 min, com pressão observada de 100bar aproximadamente. A temperatura do auto-sampler foi mantida em 8°C ±2 e o tempo total da análise foi de 3,0 min.

O gradiente da fase móvel para esse método foi 0,2-1,0 min – 50% da fase móvel A (acetonitrila/água/ácido fórmico (90/9/1; v/v/v) e 50% da fase móvel B (Água com 10 mM de ácido fórmico), 1,0-2,2 min – 90% da fase móvel A e 10% fase móvel B, e 2,2-2,8 min – 50% da fase móvel A e 50% da fase móvel B. Conforme demonstrado na tabela 1.

Parametros	Descrição
Tipo da coluna	C8 4 um (100 x 2.1 mm de diâmetro interno)
Fase móvel A	Acetonitrila/Água/Ácido Fórmico (90/9/1, v/v/v)
Fase móvel B	Solução aguosa a 10 mM of formic acid
Fluxo da fase móvel	0.450 mL/min.
Gradiente da fase móvel	0.0 min – 50 % fase móvel A / 50% fase móvel B 0.2 min – 50 % fase móvel A / 50% fase móvel B 1.0 min – 90 % fase móvel A / 10% fase móvel B 2.2 min – 90 % fase móvel A / 10% fase móvel B 2.8 min – 50 % fase móvel A / 50% fase móvel B
Volume injetado	10 uL
Tempo total de corrida	3.0 min.

Tabela 1 – Condições cromatográficas utilizadas durante o ensaio.

3.5 Condições Espectrométricas

O espectrômetro de massas (API 3000) operado no modo de ionização por eletrospray positivo foi programado para monitoramento de reação múltipla (MRM) para monitorar as transições 316.0 > 285.1 e 285.1 > 193.2, para o Clonazepam e o padrão interno, respectivamente. Para otimizar todos os parâmetros de MS, uma solução padrão do analito e do padrão interno foi injetada no espectrômetro de massas. Os seguintes parâmetros de otimização foram obtidos para o Clonazepam e para o Diazepam: O tempo de permanência, a voltagem do cone e a pressão do gás foram 300 s, 31V e 1.26×10^{-3} mBar e de 300 s, 36V e 1.26×10^{-3} mBar, respectivamente. A energia de colisão foi de 37eV para o Clonazepam e de 45eV para o Diazepam, conforme

Parâmetros	Descrição
Voltage do Electrospray (KV)	5.5
Temperature na fonte (°C)	400

Tabela 2 – Parâmetros gerais do espectrômetro de massas.

	ion Precursor	ion Produto	Tempo de permanência (s)	Voltage do cone (V)	Diferença de potencial (V)	Energia de colisão (eV)	CXP (V)
1	316.0	270	300	31	210	37	26
2	285.1	193.2	300	36	200	45	20

Tabela 3 – Parâmetros individuais de detecção de cada íon monitorado (MRM)

3.6 Estabilidade

Determinar a estabilidade de um produto é importante para garantir que a concentração da substância não sofra alteração entre o preparo, armazenamento e coleta das amostras e o momento de sua análise.

Para garantir a estabilidade, as amostras de controles de qualidade dos plasmas foram submetidas a um teste de curto período de 7 horas à temperatura ambiente; 4 ciclos de congelamento e descongelamento a 20°C; 47 horas no injetor automático (8°C $\pm$ 2); e um de longo período de 25 dias. Subsequentemente as concentrações de Clonazepam foram mensuradas e comparadas com amostras preparadas na hora.

3.7 Validação da metodologia analítica para quantificação do clonazepam

A validação do método bioanalítico foi realizada através da determinação dos parâmetros de recuperação, linearidade, limite de quantificação, precisão, exatidão, especificidade e estabilidade²⁷.

3.7.1 Especificidade

A especificidade é definida como a capacidade do método em distinguir a substância analisada dentre todas as outras substâncias presentes na amostra³².

Cada amostra de plasma “branco” foi testada para interferência usando o procedimento de extração proposto no método, assim como as condições cromatográficas e espectrométricas em comparação com os resultados obtidos em soluções aquosas do analito em concentrações próximas ao do limite de quantificação (LIQ).

A especificidade foi provada pela injeção das diferentes amostras de plasma “branco” de diferentes fontes e nenhuma interferência foi observada nos cromatogramas.

3.7.2 Recuperação

A recuperação corresponde ao resultado obtido após análise de amostras de plasma “branco” acrescida do analito e do padrão interno, submetida à pré-tratamento, expresso como porcentagem do resultado obtido após análise do padrão puro, não submetido à pré-tratamento²⁶.

A eficiência da extração do método analítico foi assegurada utilizando um lote específico de amostras, contendo as seguintes características:

- Uma curva de calibração preparada em fase móvel para quantificar as amostras de controle de qualidade (CQ1, CQ2 e CQ3).

- Cinco amostras de controles de qualidade de cada concentração (baixa, média e alta) diluídas em fase móvel, denominadas amostras MP.

- Cinco amostras de cada controle de qualidade com concentrações baixas, médias e altas, CQA, CQB e CQC respectivamente, foram preparadas em plasmas normais, hiperlipêmicos e hemolizados, previamente extraídos e contaminados com concentração conhecida tanto do analito quanto do padrão interno.

- Cinco amostras de controle de qualidade com concentrações baixas, médias e altas, preparadas em plasmas normais, hiperlipêmicos e hemolisados, obtidos por extração, denominadas amostras EXT.

A recuperação foi avaliada calculando a média da concentração de cada amostra EXT divididas pela média da concentração das amostras da substância padrão, submetidas ao processo de extração.

A recuperação experimentada para o analito e para o padrão interno se mostrou reprodutiva e consistente nas três diferentes concentrações, e seu resultado foi de acordo com os parâmetros de consistência e reprodutibilidade e foram considerados satisfatórios para o ensaio.

3.7.3 Curva de calibração

A curva de calibração indica a relação entre a concentração do analito e a resposta do método, representada, nesse estudo, pela área do pico cromatográfico^{26,28}.

A equação de regressão simples que descreveu a curva de calibração foi $y = a + bx$ (1/x² pesado). Três curvas de calibração, preparadas independentemente a partir

de diferentes soluções padrões, foram montadas para o estudo no desenvolvimento do método.

3.7.4 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção representa a menor concentração que pode ser diferenciada do nível de ruído, determinado pelo desvio padrão do ruído vezes três. O limite de quantificação deve apresentar resposta igual ou até dez vezes o desvio padrão do ruído, e representa a menor concentração que pode ser determinada com exatidão e precisão aceitáveis^{28,29}.

Nesse estudo, o limite de quantificação aprovado para ser aceito dentro dos requisitos foi de 0,5 ng/mL. A exatidão ficou entre 20% do valor nominal da concentração, com coeficiente de variação de, no máximo 20%^{23,27}.

3.7.5 Precisão

A precisão de método analítico é uma medida de erro aleatório e é definida como concordância entre varias medidas da mesma amostra, sendo expressa como coeficiente de variação (C.V.%) de até 20% dessas medidas. A precisão intra-dia refere-se ao coeficiente de variação obtido por repetição do método com o mesmo analista, utilizando o mesmo equipamento, os mesmos reagentes, em curto intervalo de tempo (por exemplo, no mesmo dia). A precisão inter-dia é obtida por meio de alterações de condições, como mudança de analista, reagentes ou equipamentos, ou utilização do método durante várias semanas ou meses²⁶.

$$CV = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

CV = coeficiente de variação

DP = desvio padrão

CMD = concentração média determinada

3.7.6 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a medida de erro sistemático definido como concordância entre o valor determinado e o valor real ²⁶.

$$Exatidão = \frac{CMD}{CT}$$

CMD = Concentração média determinada

CT = Concentração teórica

NOTA IMPORTANTE: Durante o período transcorrido entre a publicação do artigo científico referente à dissertação, e a defesa do título de mestre, ocorreu uma mudança da RDC 899/2003 para a RDC 27/2012, para efeito de atualização das normas de validação dos métodos bioanalíticos a serem desenvolvidos e utilizados em estudos com matrizes biológicas.

É de extrema importância frisar que as alterações que foram feitas nessa atualização não invalidam nenhum dos dados e procedimentos realizados em nosso método, no momento em que foi desenvolvido e validado ^{27,30,31}.

4 Protocolo Clínico

4.1 Projeto do Estudo

Quarenta voluntários saudáveis de ambos os sexos (vinte homens e vinte mulheres), com idades entre 18 e 55 anos e com índice de massa corporal entre 19 e 27 kg/m², foram selecionados para o estudo depois de asseguradas suas respectivas condições de saúde pôr suas evoluções clínicas (exames físicos, ECG) e os testes laboratoriais, conforme Tabela 4:

Todos os indivíduos deram concessão por escrito e o comitê de ética da universidade de Campinas aprovou o protocolo clínico.

Os voluntários tiveram as seguintes características clínicas (Expressos pela média $\pm$ DP): Homens: Idade: 30.7 $\pm$ 6.5 anos. Altura: 173.2 $\pm$ 7.4 cm, Peso corporal: 67.1 $\pm$ 8.07 kg; Mulheres: Idade: 27.4 $\pm$ 9.0 anos, Altura: 157.1 $\pm$ 5.8 cm, Peso corporal: 57.8 $\pm$ 5.6 kg.

FASE	EXAME
Recrutamento	Hemograma
	Uréia
	Creatinina
	Bilirrubinas
	Proteínas totais
	Albumina
	Glicemia
	Fosfatase alcalina
	Transaminase pirúvica
	Transaminase oxalacética
	Colesterol total
	Triglicérides
	Ácido úrico
	Gama-glutamil transferase
	Sorologia para HIV I e II
	Sorologia para hepatite B
	Sorologia para hepatite C
	Urina I
	Parasitológico de fezes.
	b-HCG para mulheres
Em cada Internação	Creatinina
	Transaminase pirúvica
	Transaminase oxalacética
	Hematócrito
	Hemoglobina
	b-HCG para mulheres
Pós Estudo – Dentro de 21 dias da última coleta	Hemograma
	Uréia
	Creatinina
	Bilirrubinas
	Proteínas totais
	Albumina
	Glicemia
	Fosfatase alcalina
	Transaminase pirúvica
	Transaminase oxalacética
	Colesterol total
	Triglicérides
	Ácido úrico
	Gama-glutamil transferase
	Urina I
	b-HCG para mulheres

Tabela 4 - Exames laboratoriais realizados pré e pós-estudo.

Os voluntários receberam, conforme a aleatorização (ANEXO 1), 2 mg de Clonazepam em dose única a partir das 7:00 horas da manhã do dia após o confinamento (o tempo exato foi anotado no CRF), acompanhado de 240 mL de água mineral sem gás, após pelo menos 8 horas de jejum. Após a ingestão da água mineral sem gás foi feita feita checagem para confirmar deglutição do medicamento em sua totalidade.

O intervalo de tempo entre a medicação dos voluntários será de 1 minuto de leito para leito ou 2 minutos de quarto para quarto dependendo da localização do seu leito.

A fim de manter a padronização dos grupos de tratamento, a dieta (alimentos e líquidos) oferecida obedeceu o mesmo padrão para todos os voluntários. Após o desjejum a ingestão de líquidos foi autorizada sem restrição.

Foi anotado o horário do início e fim de cada refeição, bem como o de início das ingestões programadas de líquidos, conforme tabela 5:

HORAS (*)	REFEIÇÃO
- 12 horas	Jantar
- 10 horas	Ceia
+ 2 horas	Desjejum
+ 5 horas	Almoço
+ 8 horas	Lanche
+ 12 horas	Jantar
+ 15 horas	Ceia
+ 24 horas	Desjejum

Tabela 5 - Padronização da alimentação dos voluntários durante o estudo

*Dieta geral isenta de xantina em torno de 3750 calorias correspondente às 5 refeições (desjejum, almoço, lanche da tarde, jantar e ceia).

4.2 Formulações

T - Formulação Teste:

- Clonazepam - comprimido - 2 mg; Ranbaxy Laboratories Limited, India

R – Formulação Referência:

- Rivotril® - comprimido - 2 mg; Roche Laboratórios Ltda, Brazil.

4.3 Programação do estudo

Período pré-estudo:

- História Médica
- Exame físico geral
- Eletrocardiograma
- Exame Clínico Laboratorial

Período confinado:

- Foi coletada uma amostra de sangue antes da administração do medicamento e após a mesma foram coletados 5 mL a cada tomada de amostra nos seguintes tempos: 00:20, 00:40, 01:00, 01:20, 01:40, 02:00, 02:20, 02:40, 03:00, 03:20, 3:40, 04:00, 04:30, 05:00, 06:00, 08:00, 12:00, 16:00, 24:00, 36:00, 48:00 e 72:00 horas.

Período pós-estudo:

- Exame físico geral
- Eletrocardiograma
- Exame Clínico Laboratorial

4.4 Seleção dos Voluntários

- Voluntários masculinos saudáveis ou voluntários femininos que não estivessem grávidas ou amamentando.
- Idade entre 18 e 55 anos.
- Livre de qualquer tipo de doenças foi comprovado pelo histórico médico e os demais exames.
- Disponibilidade para terminar o estudo.

4.5 Critério de inclusão

Os voluntários foram aceitos no estudo somente se considerados saudáveis, conforme determinado pela história médica, exame físico e os exames laboratoriais que antecedem ao início do estudo. Os voluntários realizaram eletrocardiograma (ECG) na avaliação inicial, pré-estudo, e após o último período de internação.

Antes do início do estudo os voluntários serão avaliados quanto as suas condições emocionais para participarem da investigação. Serão esclarecidas todas as dúvidas restantes e, assinaram o termo de consentimento para a participação no estudo.

4.6 Critério de exclusão

- Aqueles que participaram em um estudo voluntário dentro dos três meses precedentes.
- Voluntários que receberam regularmente porções de medicamentos durante as quatro semanas anteriores ao estudo.
- Voluntários que estiveram no hospital por qualquer razão durante as oito semanas antes do estudo.
- Voluntários que doaram sangue nos três meses precedentes.
- Voluntários que tiveram histórico de abuso de álcool e/ou drogas.
- Voluntários que bebem regularmente mais de duas unidades de álcool por dia (1 unidade = $\frac{1}{2}$ cerveja / 1 copo de vinho / 1 medida de água ardente)
- Peso acima de 100 quilogramas ou 15% acima do peso ideal.
- Voluntários com conhecida alergia à penicilina.

4.7 Dosagem

Os voluntários foram orientados a estarem presentes no local de recrutamento para serem conduzidos à unidade clínica Phillippe Pinel, em Itapira, para realização da etapa clínica onde permaneceram confinados por 44 horas, das quais 36 horas foram para administração do medicamento e coletas de sangue. Na conclusão da etapa clínica, os voluntários foram levados novamente para suas residências.

4.8 Critério de retirada

Os seguintes critérios foram utilizados para a retirada dos voluntários da pesquisa:

- Voluntários que não desejam continuar com o estudo por qualquer motivo, como por exemplo: indisponibilidade ou intolerância para o procedimento do estudo.
- Quando os efeitos não fossem os desejados da droga.
- Quando os Testes de laboratório de significado clínico fossem considerados anormais.
- Quando existisse doença concomitante que requeresse medicação.

4.9 Produtos estudados

O medicamento Teste, com as informações abaixo, foi fornecido pelo Laboratório Rambaxy. O medicamento referência foi adquirido comercialmente pelo investigador principal.

Nome	Medicamento Teste	Medicamento referência
	Clonazepam	Rivotril®
Ingrediente ativo	Clonazepam	Clonazepam
Forma de dosagem	Comprimido	Comprimido
Dosagem	2 mg	2 mg
Número do lote	1391899	RJ0233
Data da expiração	Março, 2006	Maio, 2007
Fabricante	Rambaxy Laboratories Limited, India	Laboratórios Roche Ltda, Brasil

Quadro 2 - Quadro comparativo entre o produto Teste e referência.

5 Análise Estatística e Farmacocinética

O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) não foi calculado, pois o gráfico é truncado em 72 horas e desta forma não houve doseamento de amostras nos tempos necessários para cobrir toda a curva de eliminação do fármaco. Isso ocorre em situações onde o fármaco possui tempo de meia vida superior a 24 horas e baixa variabilidade, e caso o $T_{1/2}$ fosse calculado nessas condições, o resultado seria impreciso.

A bioequivalência entre as duas formulações foi determinada calculando-se as relações individuais entre medicamento Teste/referência dos seguintes parâmetros: Concentração plasmática máxima (C_{max}), área sob a curva (ASC) da concentração plasmática até a última concentração observada (ASC_{0-72}). A concentração máxima (C_{max}) e o tempo necessário para atingi-la (T_{max}) foram obtidos diretamente da curva. As áreas sob a curva da concentração plasmática vs. Tempo do Clonazepam do tempo 0 até a última concentração detectável (ASC_{last}) foi calculada pelo método trapezoidal linear. Os resultados das áreas sob as curvas e as concentrações plasmáticas máximas foram analisados por análise de variância (ANOVA) para verificar se o intervalo indicado pelos US Food and Drug Administration e ANVISA, para confirmação da bioequivalência, foi obedecido (90% CI 80 – 125%).^{21,22}.

Análises paramétricas e não paramétricas das médias aritméticas ln-transformadas e as diferenças individuais de T_{max} entre as duas formulações (Teste e referência) também foram realizadas.

6 Resultados e Discussão

O método foi linear para as concentrações de Clonazepam, de 0.5 to 50.0 ng/mL (curva de calibração $0.0554 \cdot x + 0.00317$, $r^2 > 0.9965$). Uma regressão linear foi realizada na relação dos picos das áreas do Clonazepam e do padrão interno versus

as concentrações de Clonazepam em oito padrões de plasmas humanos (em duplicata) para gerar a curva de calibração, conforme demonstrado na figura 2

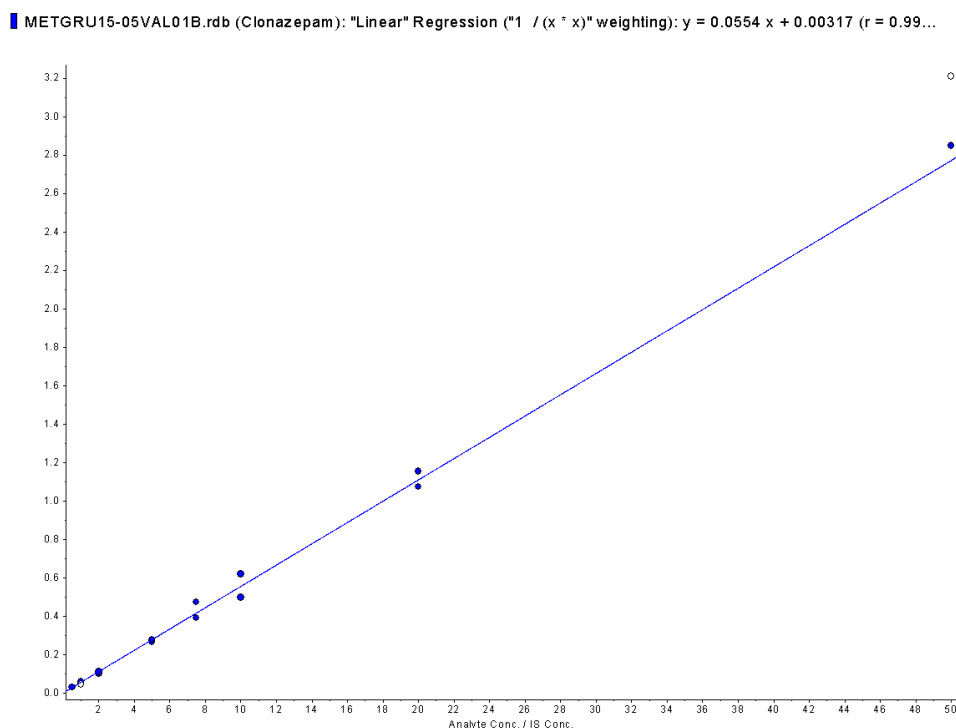


Figura 2 - Curva de calibração

Nenhuma supressão iônica significativa foi observada na região onde o analito e o padrão interno eluíram.

A recuperação do Clonazepam foi $87.4 \pm 6.9\%$, $89.9 \pm 7.5\%$ e $86.2 \pm 2.5\%$ para as concentrações de 1.5, 9.0 e 45.0 ng/mL, respectivamente. O limite de quantificação (LIQ), definido como a menor concentração na qual a precisão e a acurácia foram menores que 20%, foi de 0.5 ng/mL. Os Testes de estabilidade indicaram que não ocorreu significativa degradação nas condições descritas.

Não foram observadas concentrações endógenas nos cromatogramas dos plasmas brancos. A figura 3 mostra o cromatograma do LIQ da amostra de padrão do Clonazepam, no qual os tempos de retenção para o Clonazepam foi de 1.5 min.

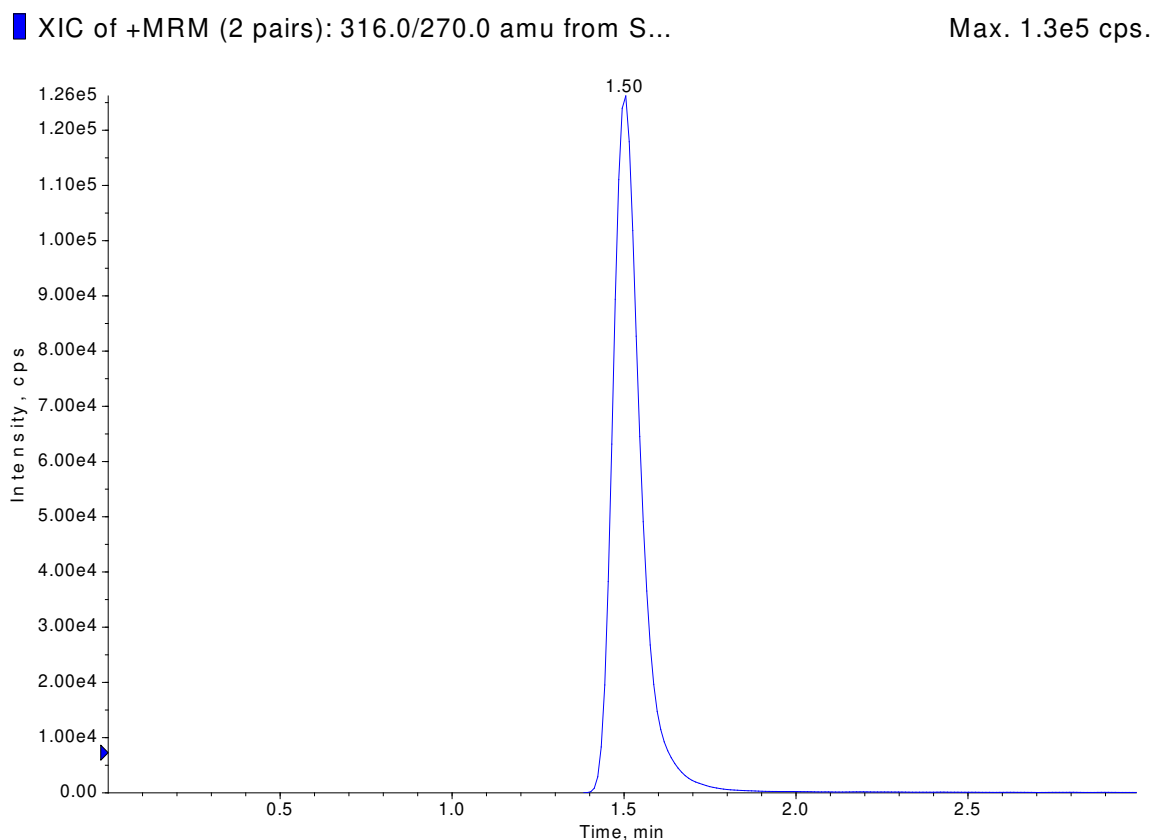


Figura 3 - Cromatograma LOQ

A tabela 6 mostra os valores para $ASC_{(0-72h)}$, C_{max} , e T_{max} e resume as análises de bioequivalência para $ASC_{(0-72h)}$ and C_{max} para as formulações de Clonazepam. A média entre as curvas das concentrações plasmáticas de Clonazepam Vs. Tempo obtidas após dose única oral de cada formulação de Clonazepam é mostrada no gráfico *média das concentrações Vs. Tempo*.

Clonazepam tem sido determinado por métodos como cromatografia gasosa - espectrometria de massas em plasma (LOQ 0.25 ng/mL; TR 5.13 min)^{32,33} e cabelo

(20 pg/mg)³², espectrofotometria³⁴, cromatografia em camada delgada-densitometria³⁵, cromatografia líquida de alta pressão em plasma (LOQ 5 ng/mL; RT 1.8 min)^{36,37} e cromatografia líquida de alta pressão – espectrômetro de massas em cabelo humano (LOQ 0.12-2 pg/mg; TR 8-15 min)^{38,39}, saliva (LOQ 0.12 pg/mg; TR 8 min) e urina (LOQ 1 ng/mL; TR 15 min)^{38,40}.

O método aqui descrito demonstra ótima sensibilidade (LOQ 0.5 ng/mL) e um tempo de retenção menor (1.5 min) para o Clonazepam, num tempo total de 3.0 min de análise em comparação com os métodos conhecidos anteriormente.

Após a administração oral de Clonazepam comprimidos aos voluntários, a concentração plasmática máxima da droga (C_{max}) e o tempo necessário para atingi-la (T_{max}) foram similares aos reportados na literatura e equivalentes entre as formulações Teste e referência. Sendo assim, a formulação Teste foi bioequivalente à formulação referência por estar de acordo com os intervalos impostos pelo FDA.^{21,22}

6.1 Equipamentos e materiais

- Pipetas ajustáveis (P200, P1000, P10000) marca Gilson, França.
- Ponteiras plásticas descartáveis para pipetas (5-200ul) e (200-1000ul).
- Tubos de ensaio descartáveis 120 X 12mm.
- Pipetas repetitivas Eppendorf.
- Frascos para amostrador automático (Vials).
- Agitador Vórtex marca Fischer, USA.
- Balança analítica marca A&D, Japão.
- Cromatógrafo líquido (HPLC) marca Shimadzu, Modelo LC10ADVp.
- Injetor automático marca CTC Analytics, modelo HTS Pal.
- Espectrometro de massas marca Sciex/Applied Biosystems, modelo API3000.
- Fonte marca Sciex/Applied Biosystems, modelo turboionspray.
- Software marca Sciex/Applied Biosystems, Modelo Analyst v 1.

Parâmetros Farmacocinéticos do Clonazepam						
Formulação	Rivotril			Clonazepam		
Variável	T _{max}	C _{max}	ASC _{0-72h}	T _{max}	C _{max}	ASC _{0-72h}
N	33	33	33	33	33	33
Média	1.72	15.87	405.96	1.90	15.90	408.73
DP	1.32	4.87	78.07	0.88	4.68	66.92
PE	0.23	0.85	13.59	0.15	0.81	11.65
Min	0.67	8.65	225.35	1.00	9.51	295.31
Media	1.33	15.80	390.28	1.33	14.10	406.55
Max	6.00	31.80	622.80	3.67	25.70	540.86
Análise Estatística do Clonazepam						
Teste/Referência	Poder	% Média Geométrica	90% CI	Intra-indivíduo CV%		
C _{max} (n=33)	0.98	100.3	91.59 – 109.85	21.7		
ASC _{0-72h} (n=33)	1.00	101.1	97.60 – 104.72	8.3		
C _{max} (n=14) - Homens	0.74	106.58	90.58 – 125.41	22.6		
ASC _{0-72h} (n=14) - Homens	1.00	101.91	95.45 – 108.81	9.5		
C _{max} (n=19) - Mulheres	0.94	95.86	85.32 – 107.69	21.5		
ASC _{0-72h} (n=19) - Mulheres	1.00	99.61	96.07 – 103.29	6.4		

Tabela 6 - Média geométrica dos parâmetros farmacocinéticos obtidos dos 33 voluntários depois da administração de 2 mg de Clonazepam comprimido, assim como os resultados classificados por gêneros.

Os voluntários 4 e 12 saíram do estudo por razões pessoais após a administração do medicamento no segundo período. Voluntário 37 foi excluído do estudo por decisão do investigador principal de acordo com critérios de exclusão, após a administração no segundo período e os voluntários 17, 18, 19 e 20 não participaram do estudo.

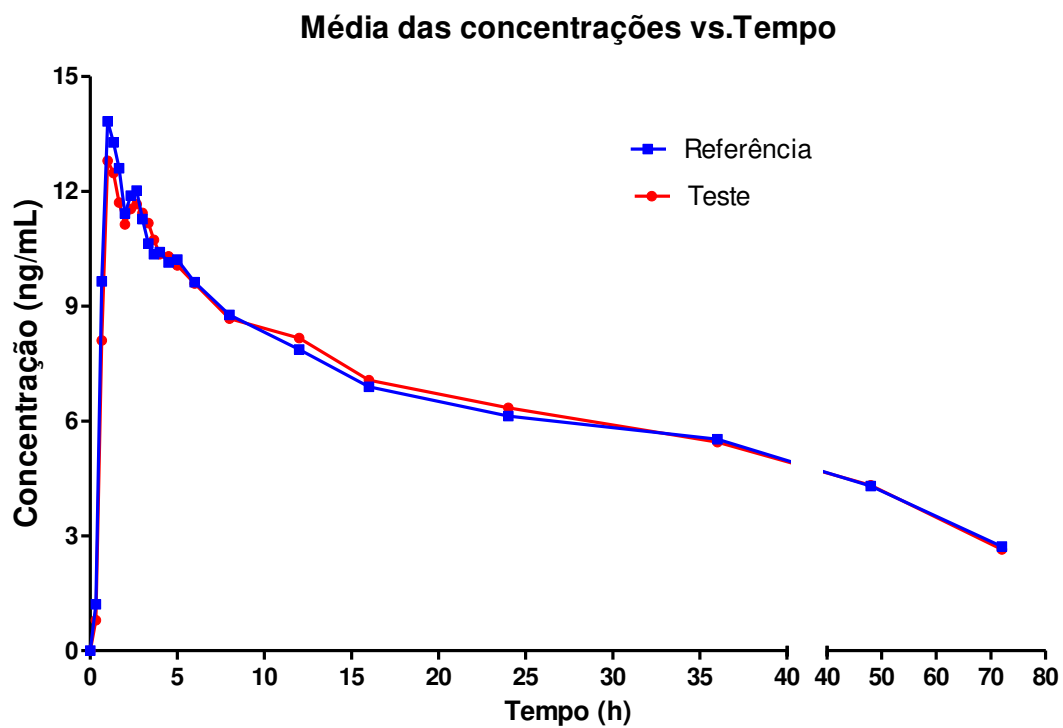


Figura 4 - Média das concentrações vs tempos

Curvas médias do decaimento plasmático após a administração dos produtos Teste e Referência a 33 voluntários sadios.

7 Referências bibliográficas

1. Andre M, Boutroy MJ, Dubruc C, Thenot JP, Bianchetti G, Sola L, Vert P, Morselli PL. Clonazepam pharmacokinetics and therapeutic efficacy in neonatal seizures. Eur J Clin Pharmacol. 1986;30(5):585-9.
2. Chauhan BL, Sane SP, Revankar SN, Rammamurthy L, Doshi B, Bhatt AD, Bhate VR, Kulkarni RD. Comparative bioavailability study of clonazepam after oral administration of two tablet formulations. J Assoc Physicians India. 2000 Oct;48(10):985-7.
3. Crevoisier C, Delisle MC, Joseph I, Foletti G. Comparative single-dose pharmacokinetics of clonazepam following intravenous, intramuscular and oral administration to healthy volunteers. Eur Neurol. 2003;49(3):173-7.
4. Yukawa E, Satou M, Nonaka T, Yukawa M, Ohdo S, Higuchi S, et al. Pharmacoepidemiologic Investigation of Clonazepam Relative Clearance by Mixed-Effect Modeling Using Routine Clinical Pharmacokinetic Data in Japanese Patients. Journal of Clinical Pharmacology, 2002;42:81-88, 2002 the American College of Clinical Pharmacology.
5. Chauhan BL, Sane SP, Revankar SN, Rammamurthy L, Doshi B, Bhatt AD, et al. Comparative Bioavailability Study of Clonazepam After Oral Administration of Two Tablet Formulations. JAPIU 2000;48:10:985-987
6. Song DM, Zhang S, Kohlhof K. Quantitative determination of Clonazepam in plasma by gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry. Journal of Chromatography 686:1996:199-204
7. Vademecum PR. Consulta de medicamentos. Editora Saraiva, Brasil, 2012/2013, página 50.
8. Mosbys. Drug consult for health professionals. Editora Elsevier, 2010.

9. International Programme on Chemical Safety Poisons Information Monograph 326 Pharmaceutical, disponível em <http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/pim326.htm> acesso em 14/02/2011.
10. Negrusz A, Bowen AM, Moore CM, Dowd SM, Strong MJ, Janicak PG. Elimination of 7-aminoclonazepam in urine after a single dose of clonazepam Anal Bioanal Chem (2003) 376:1198–1204.
11. Chézea M, Villainb M, Pépina G. Determination of bromazepam, clonazepam and metabolites after a single intake in urine and hair by LC–MS/MS Application to forensic cases of drug facilitated crimes. Forensic Science International 145 (2004) 123–130, 2004.
12. Greenblatt DJ, Blaskovich PD, Nuwayser ES, Harmatz JS, Chen G, and Zinny MA. Clonazepam Pharmacokinetics: Comparison of Subcutaneous Microsphere Injection With Multiple-Dose Oral Administration. Journal of Clinical Pharmacology, 2005;45:1288-1293, the American College of Clinical Pharmacology.
13. Bula Rivotril – www.roche.com.br/fmfiles/re7196006/pdf/bulas/rivotril.pdf, acesso em 14/02/2011
14. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Lista 1 – Forma de Administração, Resolução RE nº 1170 de 19 de abril de 2006. Atualizada em 27/01/2011:
http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/310601804475410f8010c17d1535961/lista+1+27_01_11.pdf?MOD=AJPERES. Acesso: 14/02/2011.
15. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Lista 2 - Analito para Estabelecimento da Biodisponibilidade Relativa/Bioequivalência, Resolução RE nº 1170 de 19 de abril de 2006. Atualizada em 14/02/2011. Disponível em:
http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/19adee8041190c2bb717bf65e55ae87b/lista+2+27_01_11.pdf?MOD=AJPERES. Acesso: 04/02/11.

16. Kirim AS. Reconsidering patents and economic development: a case study of the Turkish pharmaceutical industry. *World Development*, 13(2), p.219-236, 1985.
17. *Pharmaceutics & pharmacokinetics*, Editora McGraw-Hill, 4th ed. New York.
18. UNITED STATES. Nacional Archives and records servisse. Office of the federal register. Code of Federal Regulations. Title 21: Food and Drug Administration. Part 320. Bioavailability an bioequivalence requiriments. 1998. P. 191-205.
19. BRASIL. Leis e decretos, etc. Lei nº 9787, de 10 de fev. 1999. *Diário Oficial da União*, Brasília, n. 29, 10 de fev. De 1999. Seção 1, p.1-2. [Altera Lei nº 6360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências] 1999.
20. Shargel L, Yu ABC. *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics* 4 ed., Stamford: Appletn & Lange, 1999, 768p.
21. Food and Drug Administration. Bioavailability and bioequivalence requeriments; abbreviated applications; proposed revisions-FDA. Proposed rule. Fed. Regist. 63: 64 222–64 228 (1998).
22. Food and Drug Administration. In vivo bioequivalence guidances. Pharmacopeial 19:6501-6508 (1993).
23. United States Pharmacopeia, 35, November 2011; official may 1, 2012.
24. Hoffman BB, Lefkowitz RJ. In: Hardman JG, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG, (Eds.). *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 9.ed. New York: McGraw-Hill, 1996)

25. Badcock NR, Pollard AC. Micro-determination of clonazepam in plasma or serum by electron-capture gas-liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1982 Jul 9;230(2):353-61.
26. Causon, R. Validationa of chromatographic method in biomedical analysis: viewpoint and discution. *J. Chormatog. B: Appl.* Amsterdam, v, 689, n.1, p. 175-180, 1997.
27. BRASIL. Leis e decretos, etc. RDC nº 899, de 29 de mai. 2003. *Diário Oficial da União, poder executivo*, Brasília, 02 de junho de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos".
28. Bressole FB, Petit M, Audran M. Validation of liquid chromatographic and gás chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics.*J.Chromatogr.B: Biomed. Appl.*, Amsterdam, v. 686, n.1, p3. 1996.
29. Rodrigues LC, Campaña AM, Linars CC, Ceba MR. Estimation of performance characteristics of na analytical method using the data set of the calibration experimemente. *Analytica Letters*, New York, v.26, n.6, p.1243-1258, 1993.
30. BRASIL. Leis e decretos, etc. RDC nº 27, de 17 de maio 2012. *Diário Oficial da União, poder executivo*, Brasília, 22 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos.
31. Favreto WA, Pinto AM, Manfio JL, Hoss I, Pristch MC, Bordignon SF. Development and validation of an ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry bioanalytical method for quantifying clonazepam in human plasma. *J AOAC Int.* 2013 Jul-Aug;96(4):745-50.
32. Negrusz A, Bowen AM, Moore CM, Dowd SM, Strong MJ, Janicak PG. Deposition of 7-aminoclonazepam and clonazepam in hair following a single dose of Klonopin. *J Anal Toxicol.* 2002 Oct;26(7):471-8.

33. PR.vade-mécum 2006-2007 página 50.
34. Song D, Zhang S, Kohlhof K. Quantitative determination of clonazepam in plasma by gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry. J Chromatogr B Biomed Appl. 1996 Nov 15;686(2):199-204.
35. Maslanka A, Krzek J. Densitometric high performance thin-layer chromatography identification and quantitative analysis of psychotropic drugs. J AOAC Int. 2005 Jan-Feb;88(1):70-9.
36. Bares IF, Pehourcq F, Jarry C. Development of a rapid RP-HPLC method for the determination of clonazepam in human plasma. J Pharm Biomed Anal. 2004 Nov 19;36(4):865-9.
37. Nakamura M, Fukawa K, Sugiyama T, Katagiri Y. High-performance liquid chromatographic assay of clonazepam in human plasma using a non-porous silica column. Biol Pharm Bull. 2004 Jun;27(6):893-5.
38. Cheze M, Villain M, Pepin G. Determination of bromazepam, clonazepam and metabolites after a single intake in urine and hair by LC-MS/MS. Application to forensic cases of drug facilitated crimes. Forensic Sci Int. 2004 Oct 29;145(2-3):123-30.
39. Irving RC, Dickson SJ. The detection of sedatives in hair and nail samples using tandem LC-MS-MS. Forensic Sci Int. 2006 May 15
40. Kronstrand R, Nystrom I, Josefsson M, Hodgins S. Segmental ion spray LC-MS-MS analysis of benzodiazepines in hair of psychiatric patients. J Anal Toxicol. 2002 Oct;26(7):479-84.

FIGURAS

■ XIC of +MRM (2 pairs): 316.0/270.0 amu from S...

Max. 1.3e5 cps.

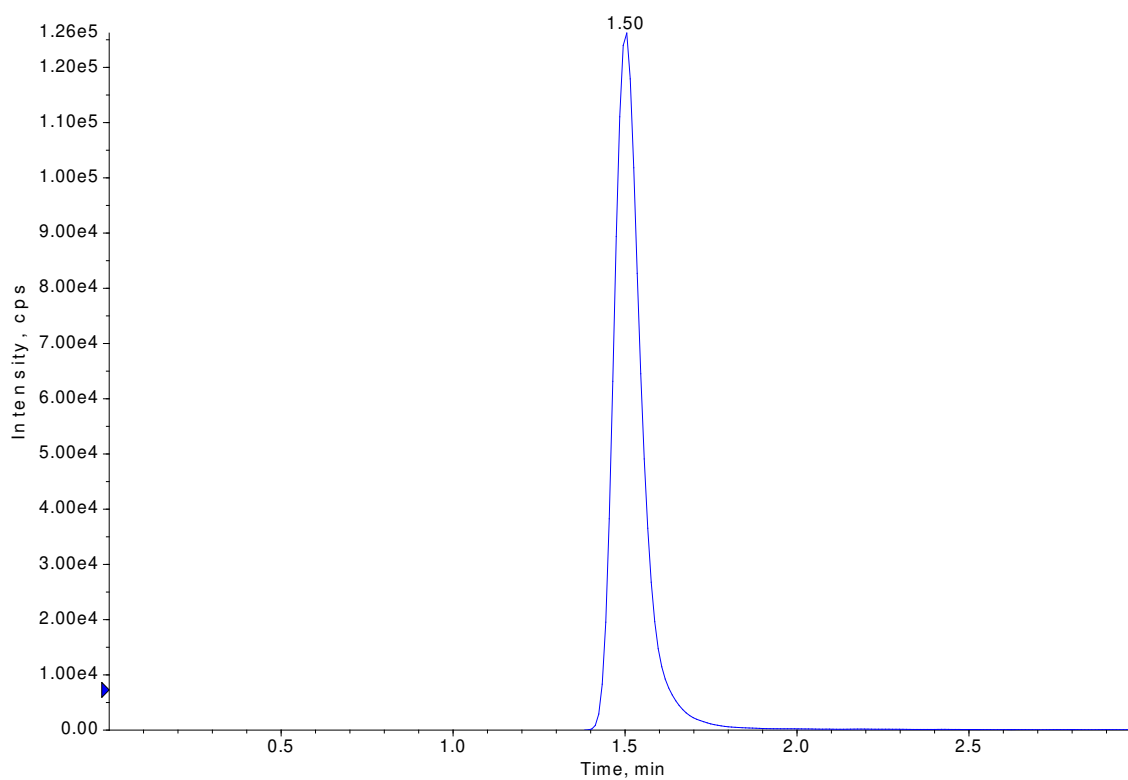


Figura 5 – Cromatograma do ponto mais alto.

■ XIC of +MRM (2 pairs): 316.0/270.0 amu from S...

Max. 8.3e4 cps.

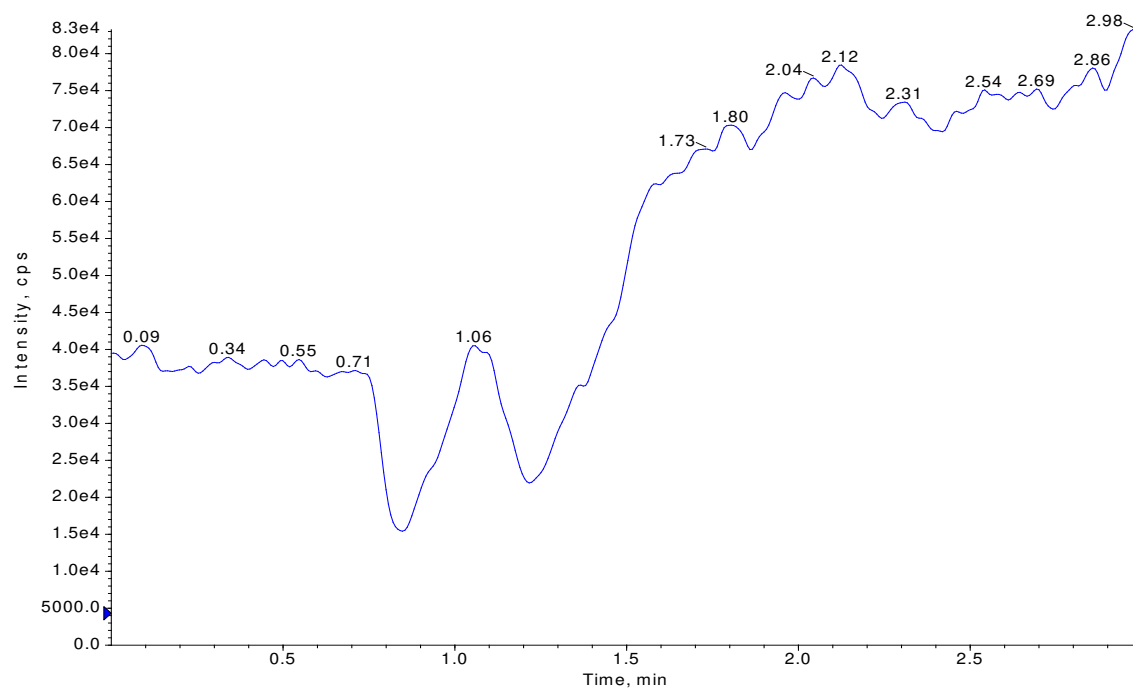
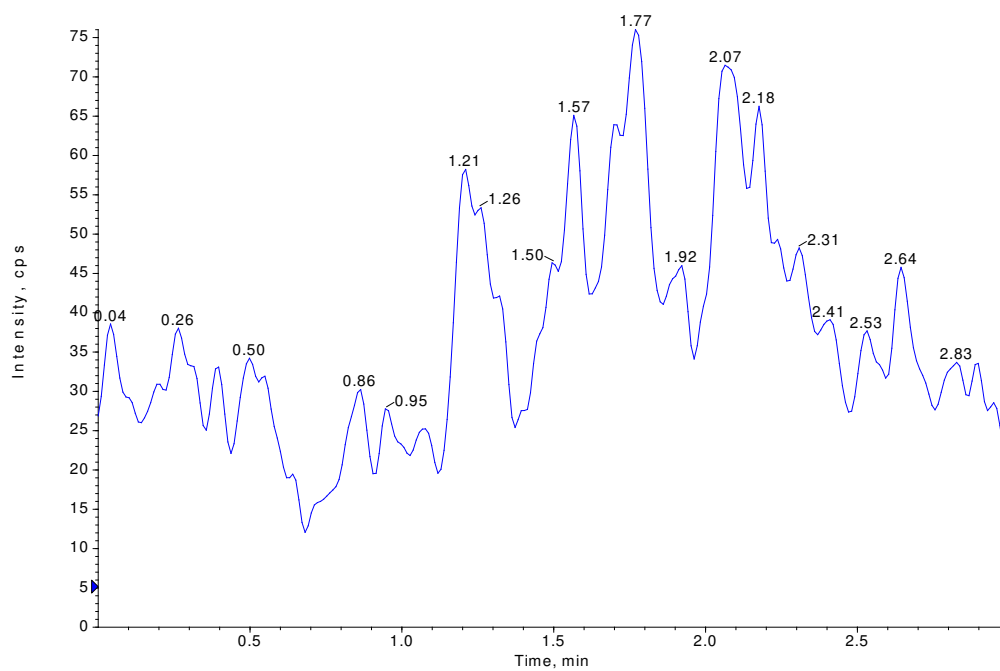


Figura 6 – Cromatograma do plasma branco normal.

■ XIC of +MRM (2 pairs): 316.0/270.0 amu from Sa...

Max. 76.0 cps.



■ XIC of +MRM (2 pairs): 285.1/193.2 amu from S...

Max. 127.6 cps.

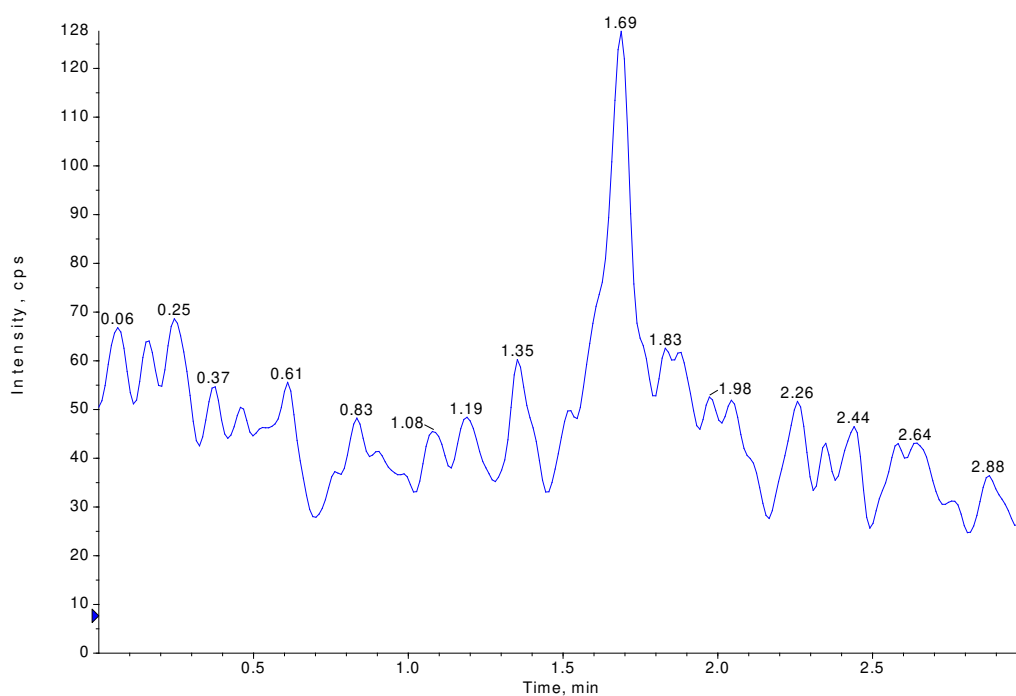


Figura 7 - Cromatogramas Hiperlipêmicos do clonazepam e do padrão interno..

■ XIC of +MRM (2 pairs): 316.0/270.0 amu from S...

Max. 196.1 cps.

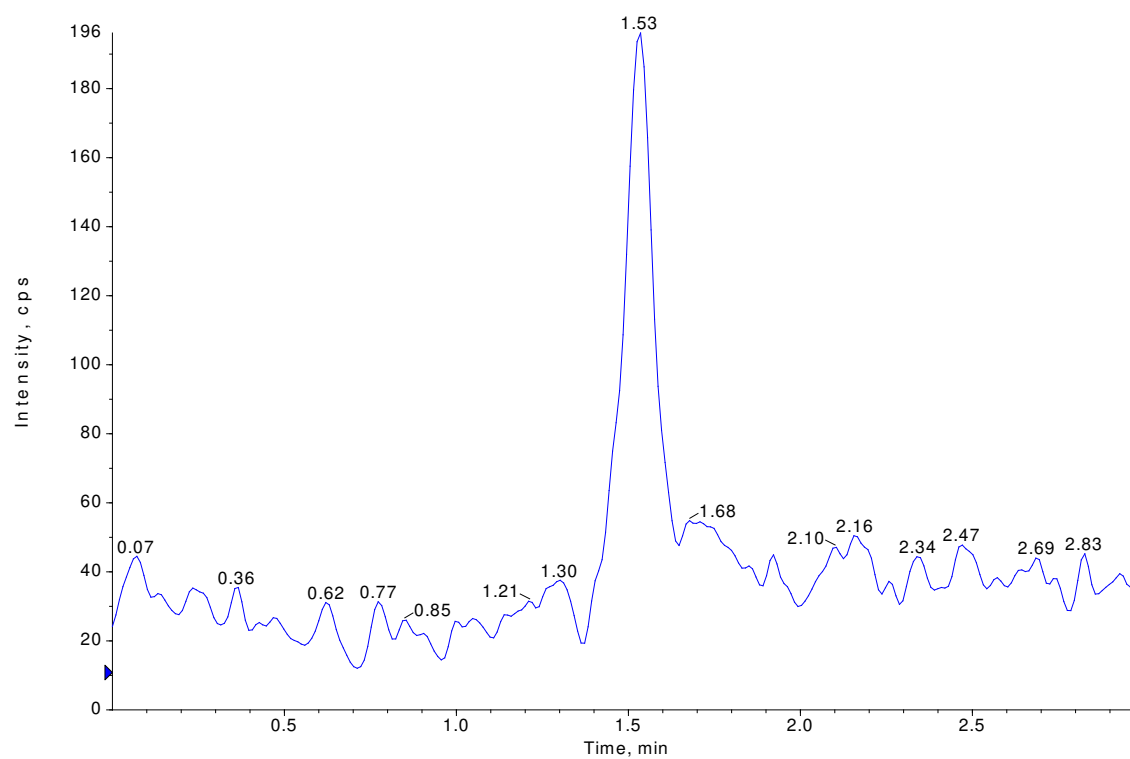


Figura 8 – Cromatograma do plasma hemolizado.

■ +MS2 (315.98) CE (30): 26 MCA scans from Sa...

Max. 1.7e6 cps.

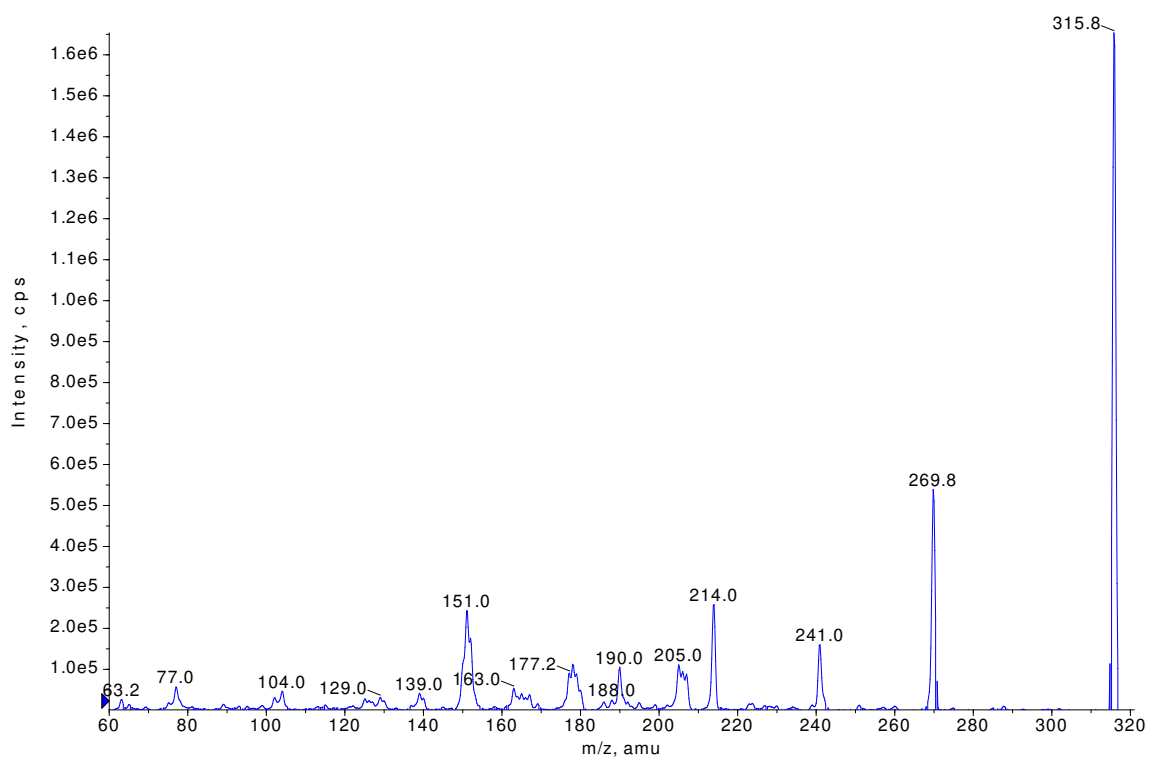


Figura 9 - Espectro de massas do Clonazepam em Monitoramento de Reação Multipla (MRM) – Full Scan.

■ +MS2 (285.07) CE (30): 26 MCA scans from Sa...

Max. 5.2e5 cps.

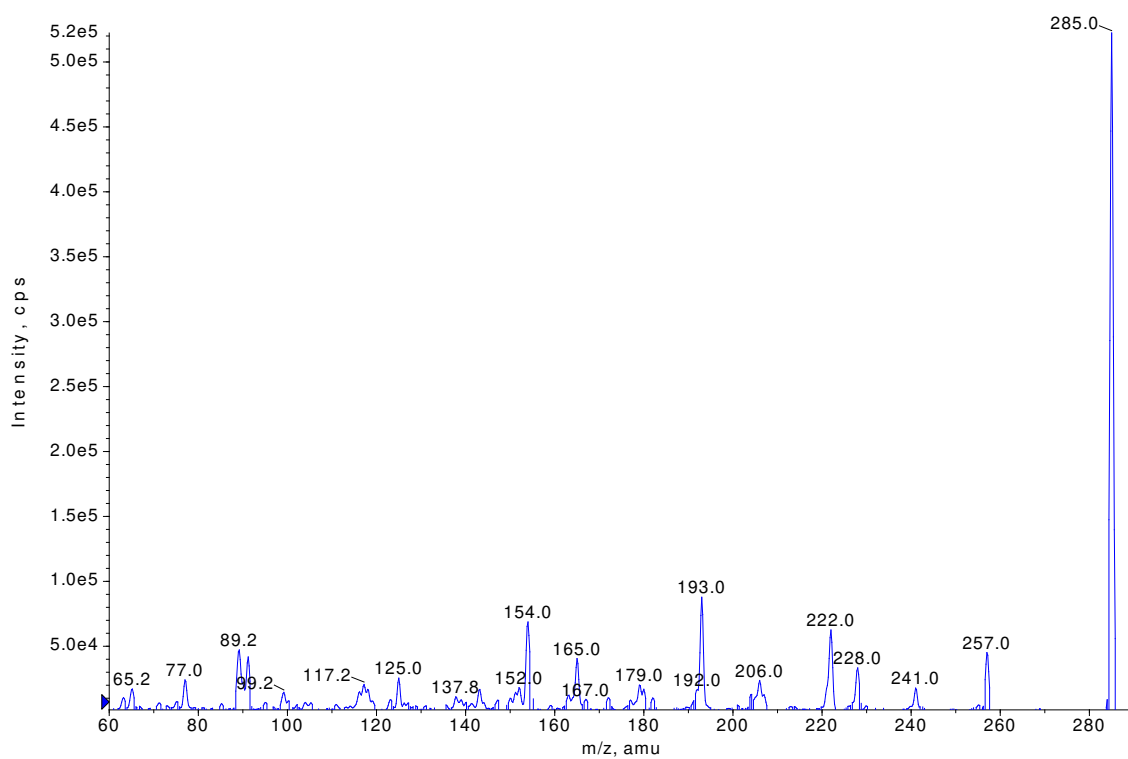


Figura 10 - Espectro de massas do padrão interno em Monitoramento de Reação Multipla (MRM) – Full Scan.

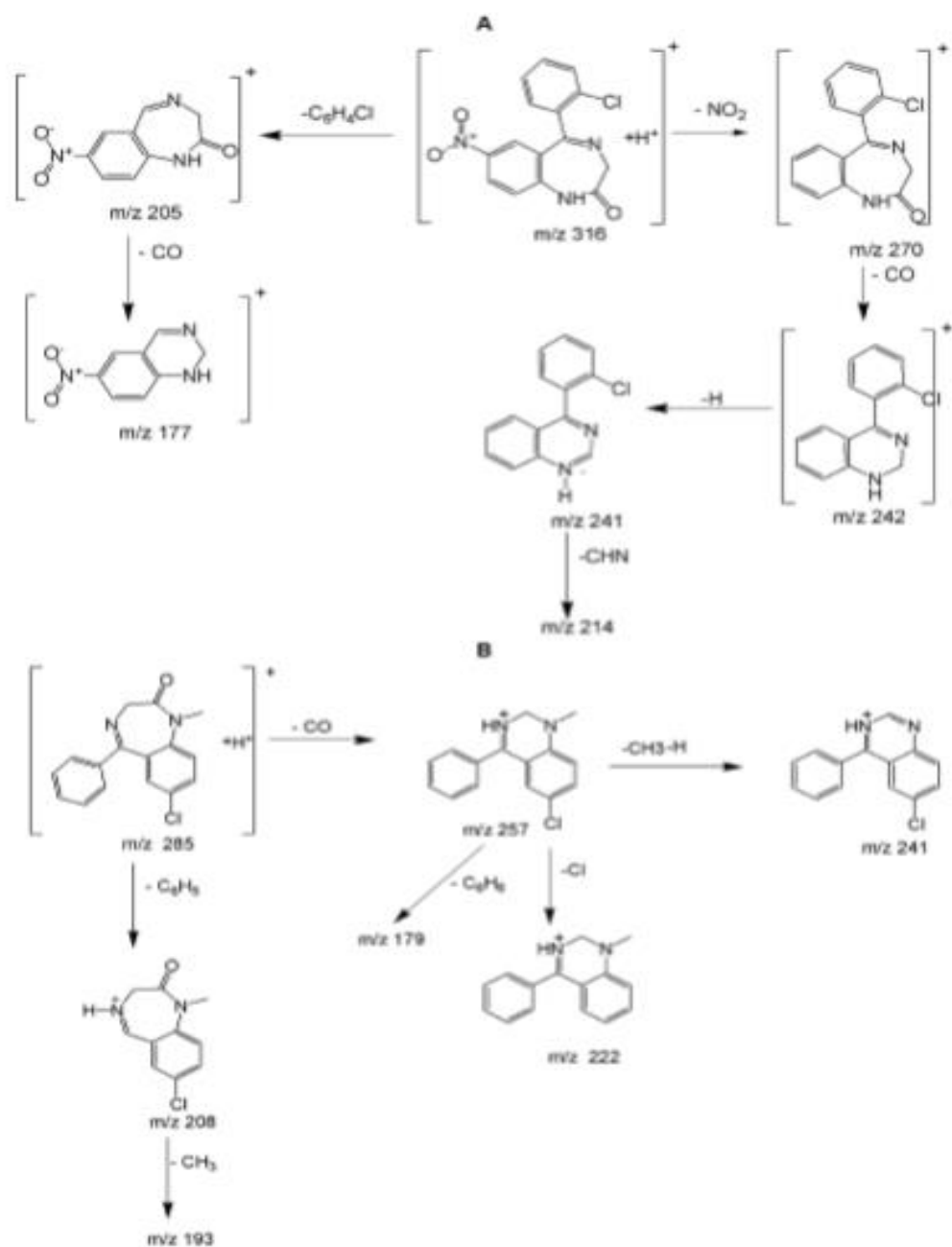


Figura 11 - Rota de fragmentação do íon do clonazepam (A) e do padrão interno (B) selecionado no modo de reação múltipla.

ANEXOS

Anexo 1

Aleatorização

Voluntário	Sexo	Seqüência	Período I	Período II
1	M	2	Teste	Referencia
2	M	1	Referencia	Teste
3	M	2	Teste	Referencia
4	M	1	Referencia	Teste
5	M	2	Teste	Referencia
6	M	1	Referencia	Teste
7	M	2	Teste	Referencia
8	M	1	Referencia	Teste
9	M	1	Referencia	Teste
10	M	2	Teste	Referencia
11	M	1	Referencia	Teste
12	M	2	Teste	Referencia
13	M	2	Teste	Referencia
14	M	1	Referencia	Teste
15	M	2	Teste	Referencia
16	M	1	Referencia	Teste
17	M	1	Referencia	Teste
18	M	2	Teste	Referencia
19	M	1	Referencia	Teste
20	M	2	Teste	Referencia
21	F	1	Referencia	Teste
22	F	2	Teste	Referencia
23	F	1	Referencia	Teste
24	F	2	Teste	Referencia
25	F	1	Referencia	Teste
26	F	2	Teste	Referencia
27	F	2	Teste	Referencia
28	F	1	Referencia	Teste
29	F	2	Teste	Referencia
30	F	1	Referencia	Teste
31	F	1	Referencia	Teste
32	F	2	Teste	Referencia
33	F	2	Teste	Referencia
34	F	1	Referencia	Teste
35	F	2	Teste	Referencia
36	F	1	Referencia	Teste
37	F	1	Referencia	Teste
38	F	2	Teste	Referencia
39	F	1	Referencia	Teste
40	F	2	Teste	Referencia

Anexo 2

Concentrações plasmáticas individuais de Clonazepam após administração dos produtos teste e referência

Tempo (h)	1 Referencia	1 Teste	2 Referencia	2 Teste	3 Referencia	3 Teste	5 Referencia	5 Teste
0:00	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ
0:20	3.44	1.25	BLOQ	1.07	3.22	BLOQ	BLOQ	BLOQ
0:40	22	13.8	6.02	13	14.7	2.47	0.611	0.534
1:00	21.6	25.7	8.74	20.7	12.5	3.89	2.03	3.87
1:20	20.5	22.9	9.42	21	13.7	3.72	2.87	3.62
1:40	16.8	21.4	6.92	17.2	13.6	3.92	3.4	3.77
2:00	16.4	16.3	7.34	16.5	12.6	3.48	3.49	2.67
2:20	14.4	13.7	7.36	14.1	12.3	6.31	2.28	2.39
2:40	14	14.1	8.09	13.1	12.3	9.21	7.91	3.21
3:00	13.9	12.7	8.04	12.3	12.2	9.21	3.02	10.4
3:20	12.8	12.9	8.07	11.6	12.1	10.3	6.04	11.3
3:40	12.3	11.7	8.63	11.2	11.3	9.57	8.44	9.84
4:00	12.6	11	9.62	10.8	11.1	9.22	8.65	9.58
4:30	12.2	11.3	8.9	7.4	10.3	9.31	7.97	9.69
5:00	11.4	12	9.83	6.99	9.89	9.83	7.89	10.1
6:00	10.6	11.2	8.96	9.98	9.07	8.25	7.97	8.52
8:00	9.31	11	8.09	8.57	7.93	8.04	6.46	7.07
12:00	7.95	10.6	7.75	7.53	5.13	7.34	6.57	7.62
16:00	7.12	8.18	6.2	7.15	4.06	6.5	5.34	6.46
24:00	6.73	7.84	5.56	6.12	2.99	5.09	4.35	5.49
36:00	5.46	6.72	4.22	5.09	2.24	4.13	N/A	4.13
48:00	N/A	5.37	4.65	4.17	1.05	3.22	2.8	2.41
72:00	3.18	3.26	2.3	2.78	0.732	2	1.36	1.17
	1 Referencia	1 Teste	2 Referencia	2 Teste	3 Referencia	3 Teste	5 Referencia	5 Teste
ASC 0-all	445.8	507.8	361.6	406.5	225.4	321.9	266.0	295.3
Cmax	22	25.7	9.83	21	14.7	10.3	8.65	11.3
Tmax (h)	0.67	1.00	5.00	1.33	0.67	3.33	4.00	3.33

Tempo (h)	6 Referencia	6 Teste	7 Referencia	7 Teste	8 Referencia	8 Teste	9 Referencia	9 Teste
0:00	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ
0:20	BLOQ	0.927	BLOQ	BLOQ	6.27	BLOQ	1.07	0.527
0:40	5.12	9.41	5.5	2.93	31.8	20.1	12.9	11.1
1:00	12.3	13.5	10.5	6.43	29.7	24.7	22.3	15
1:20	11.5	8.8	16.9	7.22	23.7	20.4	17	17.1
1:40	9.71	10.5	18.4	8.62	21.5	20.2	17.7	14.8
2:00	7.85	10.8	12.2	14.5	18.9	18.3	16.4	13.8
2:20	8.11	9.35	16.8	16.8	20.1	18	16.4	13.5
2:40	8.95	9.59	16.8	17.5	15.5	14.1	15	12.6
3:00	8.03	10.8	17.6	16.2	16.3	15.2	14.5	10.7
3:20	8.83	9.3	13.7	14.7	14.5	14.1	14.8	12.2
3:40	7.5	8.35	12.8	13.7	14.3	15.1	13.7	10.8
4:00	6.83	8.65	12.9	13.1	13.5	14.4	15.8	11.7
4:30	7.56	9.18	12.9	11.9	13.9	15.1	14.5	14.9
5:00	8.73	8.01	12.7	11.9	14.9	13.8	13.9	15.1
6:00	9.3	7.81	9.5	9.81	12.6	13.2	12.1	13.7
8:00	8.46	7.57	9.31	7.66	12.1	11.9	12	12.1
12:00	7.99	7.4	7.37	7.83	11.1	11.5	11.7	12.9
16:00	6.41	6.21	6.19	6	10.5	9.65	9.32	9.31
24:00	6.09	5.9	5.91	5.96	8.38	9.64	7.72	7.13
36:00	4.95	5.3	5.63	5.46	10.3	7.18	7.66	N/A
48:00	4.77	4.33	4.86	4.54	6.94	3.37	4.97	5.55
72:00	2.86	2.67	4.24	3.51	3.38	4.82	2.56	N/A
	6 Referencia	6 Teste	7 Referencia	7 Teste	8 Referencia	8 Teste	9 Referencia	9 Teste
ASC 0-all	390.3	379.6	441.0	412.8	622.8	539.7	519.5	411.0
Cmax	12.3	13.5	18.4	17.5	31.8	24.7	22.3	17.1
Tmax (h)	1.00	1.00	1.67	2.67	0.67	1.00	1.00	1.33

Tempo (h)	10 Referencia	10 Teste	11 Referencia	11 Teste	13 Referencia	13 Teste	14 Referencia	14 Teste
0:00	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ
0:20	BLOQ	2.78	BLOQ	BLOQ	0.566	BLOQ	0.632	0.604
0:40	3.8	10.6	11.2	9.96	8.75	2.4	3.28	6.96
1:00	6.31	12.5	19.4	19.5	13.7	8.71	12.4	8.47
1:20	7	13.3	19.3	22.2	8.7	4.49	14.8	9.25
1:40	7.25	11.2	20	18.6	10.7	7.79	12.1	7.99
2:00	7.04	11.6	14.2	15	10.5	6.66	14.1	8.11
2:20	8.31	11.4	14.5	12.6	10.3	6.66	12.5	10.4
2:40	8.78	10.4	15.3	14	11.6	10.4	12.6	10.6
3:00	8.69	9.5	14.3	14.6	10.9	10.7	11.3	9.45
3:20	7.93	9.61	15	12.6	11	12.1	10	9.56
3:40	8.73	9.32	12.9	12.6	11	10.6	10	8.72
4:00	8.63	8.66	13.5	13.6	11.5	7.82	10.6	8.38
4:30	9.65	9.17	13.7	14.1	11.6	10.6	10.8	9.03
5:00	9.38	10.1	14.2	13.7	9.93	8.74	11	8.82
6:00	8.36	8.36	12.6	11.4	11.9	10.9	9.94	10.1
8:00	7.49	7.98	12.1	11.1	10.1	11	8.73	8.39
12:00	6.79	6.88	10	11.2	10.2	8.95	8.3	8.18
16:00	5.4	5.36	8.46	8.78	8.62	7.9	7.97	7.73
24:00	4.5	4.58	7.43	8.81	6.62	6.19	6.23	6.13
36:00	4.05	4.22	6.14	6.44	6.11	6.46	6.49	5.92
48:00	3.15	3.2	4.75	4.62	4.37	4.47	5.51	5.66
72:00	1.94	1.76	2.8	3.11	1.96	1.96	3.8	3.97
	10 Referencia	10 Teste	11 Referencia	11 Teste	13 Referencia	13 Teste	14 Referencia	14 Teste
ASC 0-all	306.5	322.2	485.1	504.4	431.2	412.5	461.0	444.5
Cmax	9.65	13.3	20	22.2	13.7	12.1	14.8	10.6
Tmax (h)	4.50	1.33	1.67	1.33	1.00	3.33	1.33	2.67

Tempo (h)	15 Referencia	15 Teste	16 Referencia	16 Teste	21 Referencia	21 Teste	22 Referencia	22 Teste
0:00	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ
0:20	BLOQ	0.519	0.777	1.07	0.977	BLOQ	3.37	BLOQ
0:40	1.82	6.78	6.75	13.8	9.91	3.78	8.88	7.41
1:00	4.51	19.5	17.3	15.1	11.3	11.9	10.7	9.42
1:20	4.75	20.2	14.4	17.8	12.9	13.6	12.1	7.51
1:40	5.83	17.3	15.3	12.4	12	10.5	10.3	9.59
2:00	5.85	14.6	11.8	13.9	12.4	11.2	10	10.8
2:20	8.68	13.7	11.5	13.1	12.5	10.7	11.4	22.9
2:40	11.7	14.4	11.6	12.3	12.6	9.7	11.7	18.1
3:00	10.7	8.7	11.2	12.4	11.8	9.71	11.2	16.2
3:20	9.49	7.23	10.4	11.7	11.8	9.89	9.94	15.4
3:40	8.82	10.5	9.03	11.2	11	8.28	10.2	14
4:00	9.08	10.5	10.5	11.9	10.7	7.84	10.6	12.9
4:30	9.06	9.98	9.75	11.4	10.7	8.51	10.6	12.5
5:00	8.79	6.67	10.6	10.9	10.3	8.38	12	12.1
6:00	8.62	9.8	8.79	9.81	8.82	8.47	10.9	11.8
8:00	8.44	9.13	8.33	8.05	8.46	9.1	9.95	11.1
12:00	7.23	8.33	7.49	7.29	7.36	8.18	8.6	10.4
16:00	5.63	8.15	6.17	6.33	6.55	7.72	8.17	9.02
24:00	5.26	5.95	5.31	5.23	5.99	7.02	6.93	7.78
36:00	4.91	5.55	4.87	5.09	5.58	6.35	7.16	7.35
48:00	3.82	4.24	3.69	4.42	4.6	4.84	3.9	6.92
72:00	2.78	N/A	2.17	2.67	3	3.33	N/A	BLOQ
	15 Referencia	15 Teste	16 Referencia	16 Teste	21 Referencia	21 Teste	22 Referencia	22 Teste
ASC 0-all	352.4	333.5	364.1	392.5	408.6	437.7	361.3	501.5
Cmax	11.7	20.2	17.3	17.8	12.9	13.6	12.1	22.9
Tmax (h)	2.67	1.33	1.00	1.33	1.33	1.33	1.33	2.33

Tempo (h)	23 Referencia	23 Teste	24 Referencia	24 Teste	25 Referencia	25 Teste	26 Referencia	26 Teste
0:00	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ
0:20	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	2.62	BLOQ	BLOQ	2.52
0:40	6.43	5.91	2.91	3.82	16.1	5.44	7.02	13.9
1:00	18	10.8	7.2	10.7	18.8	9.4	20.9	22.7
1:20	15.3	6.11	12.7	12.5	16.8	9.13	21.3	18.6
1:40	13.4	9.09	17	14.5	15.4	7.48	12.4	11.8
2:00	7.79	7.92	17.2	12.9	16.4	10.6	12.3	11.7
2:20	12.4	9.83	17.1	13.8	11	10.9	12.7	11.9
2:40	11.7	9.5	15.2	13.9	14.4	13.8	11.8	12.2
3:00	10.7	11.4	13.4	13	12.5	11.3	11.2	10.6
3:20	9.75	9.97	12.2	13.2	12.1	12.8	10.5	11.3
3:40	9.33	9.51	11.7	11.9	11.5	12.6	10.3	11.2
4:00	9.5	8.68	10.9	11.6	10.1	11.6	10.2	10.8
4:30	8.81	8.33	10.6	11.7	10.2	10.6	10.1	11.2
5:00	8.95	8.83	11.1	11.4	10	10.7	9.95	12.2
6:00	7.84	8.67	10.2	10.8	11.3	9.42	9.14	10.7
8:00	7.17	7.4	9.79	10.6	9.34	8.57	8.68	9.14
12:00	7.14	7.02	8.78	10.1	9.51	7.65	7.96	8.64
16:00	5.99	6.41	8.13	8.37	6.63	6.77	6.9	7.81
24:00	5.33	5.46	7.11	8.21	7.37	6.48	6.6	7.02
36:00	4.79	4.96	7.33	6.97	4.93	5.3	5.61	5.77
48:00	4.28	N/A	5.51	7.07	4.96	4.43	4.85	4.81
72:00	3.69	2.62	4.08	4.4	N/A	N/A	3.21	3.58
	23 Referencia	23 Teste	24 Referencia	24 Teste	25 Referencia	25 Teste	26 Referencia	26 Teste
ASC 0-all	382.6	362.3	494.6	540.9	349.9	318.3	430.5	457.8
Cmax	18	11.4	17.2	14.5	18.8	13.8	21.3	22.7
Tmax (h)	1.00	3.00	2.00	1.67	1.00	2.67	1.33	1.00

Tempo (h)	27 Referencia	27 Teste	28 Referencia	28 Teste	29 Referencia	29 Teste	30 Referencia	30 Teste
0:00	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ
0:20	5.07	1.86	0.878	3.09	0.94	1.19	0.956	1
0:40	13.8	12.2	7.3	17.4	10.2	8.28	9.86	5.66
1:00	14.3	17.6	17.6	22.4	10.7	8.76	10.8	8.03
1:20	12	15.8	13.1	21.3	10.7	9.11	11.1	9.5
1:40	11.6	11.4	14.7	17	9.28	7.92	9.42	13.5
2:00	12	11.6	13.6	14.3	8.63	5.82	9.32	9.89
2:20	11.5	10.9	15.8	15.3	9.37	8.67	9	9.13
2:40	10	10.6	16.2	14.9	9.11	12.1	9.85	11.2
3:00	10.2	10.4	14.1	13.1	8.01	12.3	9.19	10.1
3:20	9.25	10.2	13.7	12.6	7.22	11.1	8.35	8.9
3:40	8.64	9.92	12.5	11.9	7.96	9.72	7.01	9.01
4:00	8.73	9.74	12.4	11.4	7.85	8.31	8.41	9.39
4:30	8.35	9.09	11.5	11.2	7.96	8.91	8.03	8.99
5:00	9.16	8.8	12.5	11.6	7.94	7.63	8.1	8.88
6:00	9.24	8.55	11.9	10.2	7.27	7.5	10.3	9.14
8:00	7.7	7.82	10.2	8.99	6.78	6.59	9.1	6.79
12:00	6.41	6.63	8.91	8.55	6.2	6.45	7.67	8.83
16:00	5.52	5.76	8.12	7.7	5.49	5.46	6.69	6.84
24:00	5.37	5.32	6.88	7.04	5.03	5.37	6.77	7.48
36:00	4.57	4.56	6.84	6.74	4.58	5.07	6.79	5.89
48:00	3.85	4.21	6.4	5.92	3.73	4.17	4.13	5.05
72:00	3.21	3.34	4.26	3.97	2.69	2.88	2.66	2.85
	27 Referencia	27 Teste	28 Referencia	28 Teste	29 Referencia	29 Teste	30 Referencia	30 Teste
ASC 0-all	365.5	376.4	514.4	499.8	336.7	357.8	411.4	424.5
Cmax	14.3	17.6	17.6	22.4	10.7	12.3	11.1	13.5
Tmax (h)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	3.00	1.33	1.67

Tempo (h)	31 Referencia	31 Teste	32 Referencia	32 Teste	33 Referencia	33 Teste	34 Referencia	34 Teste
0:00	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ
0:20	3.07	1.61	BLOQ	1.05	1.18	BLOQ	BLOQ	0.546
0:40	20.2	16.9	9.27	10.1	18.4	2.31	3.94	3.1
1:00	21.5	20.6	15.9	12.9	15.1	5.48	6.47	6.14
1:20	17.1	13.7	14.4	10.1	12.5	5.62	5.94	7.35
1:40	15.7	13.8	11.7	10.4	9.09	7.11	8.56	6.71
2:00	12.1	16	11.7	10.7	9.45	6.97	8.42	6.81
2:20	16.3	15.1	11.3	11	10	4.34	12	7.12
2:40	13.1	13.2	10.6	10.8	10.8	5.54	12.4	5.72
3:00	11.2	15.8	10.1	10.8	10.7	8.17	10.4	9.51
3:20	10.2	12.5	9.71	9.54	10.3	12	9.06	9.29
3:40	10.4	10.8	9.59	9.7	13.2	14.1	8.27	8.39
4:00	11.8	10.2	9.43	10.3	10.3	13	7.61	8.33
4:30	11.4	9.67	9.98	9.36	8.67	11.1	7.15	7.56
5:00	8.88	10.6	10.2	9.65	9.23	10	7.6	7.84
6:00	10.2	8.8	9.33	7.43	8.37	9.5	7.71	7.32
8:00	8.38	8.6	8.13	7.47	7.79	7.77	6.55	6.64
12:00	7.83	6.47	6.97	6.59	6.81	7.06	6.28	5.49
16:00	7.67	6.49	6.63	5.97	6.05	6.44	6.66	5.35
24:00	6.78	5.43	5.85	5.39	5.72	6.68	5.77	4.41
36:00	6.97	4.63	5.13	4.34	5.01	5.81	6.13	7.47
48:00	4.85	4.13	3.66	3.15	4.16	4.74	3.98	6.04
72:00	3.43	3.08	2.4	1.83	2.94	2.29	2.36	3.16
	31 Referencia	31 Teste	32 Referencia	32 Teste	33 Referencia	33 Teste	34 Referencia	34 Teste
ASC 0-all	463.2	390.7	373.6	330.1	381.4	392.1	365.7	396.2
Cmax	21.5	20.6	15.9	12.9	18.4	14.1	12.4	9.51
Tmax (h)	1.00	1.00	1.00	1.00	0.67	3.67	2.67	3.00

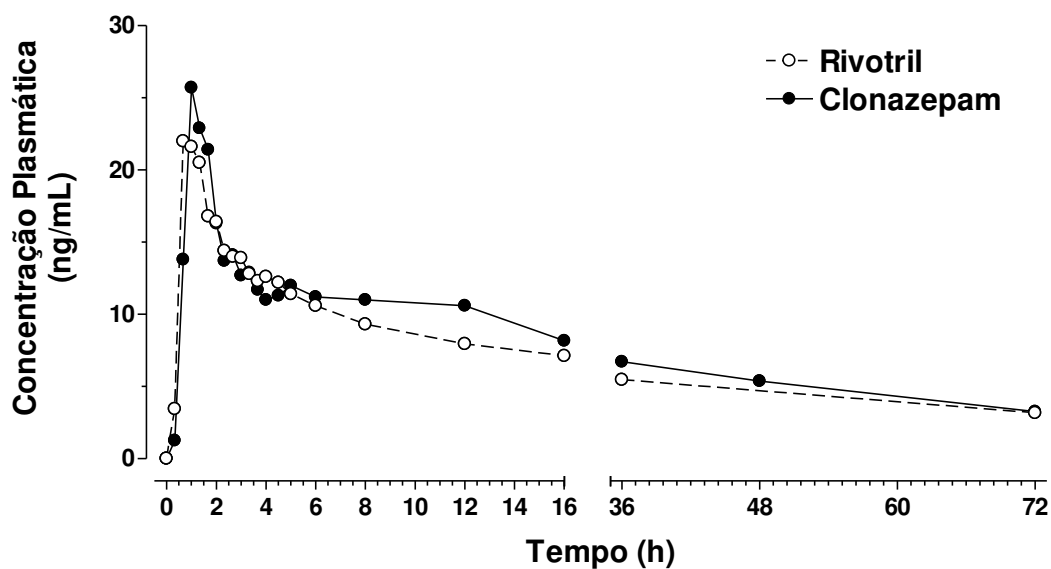
Tempo (h)	35 Referencia	35 Teste	36 Referencia	36 Teste	38 Referencia	38 Teste	39 Referencia	39 Teste
0:00	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ
0:20	1.27	BLOQ	0.513	BLOQ	BLOQ	BLOQ	3.32	4.7
0:40	15.7	1.41	12	5.39	1.43	4.98	8.89	11
1:00	18.9	8.35	17.8	9.97	8.4	10.1	12.8	13.1
1:20	16.4	9.27	15.2	10.6	11.6	14.1	15.6	14.6
1:40	14.9	12.2	17.9	10.5	10.3	12.6	15	15.2
2:00	11.6	10.5	13.3	9.27	9.66	10.8	14.5	14.9
2:20	10.6	8.4	12.3	11.2	8.62	11.1	15.8	17
2:40	12	10.4	10.8	10.5	9.61	10.9	15.8	15.3
3:00	11.3	10.8	11.3	10.4	9.6	8.73	14.6	14
3:20	10.3	8.82	9.7	10.7	8.68	8.73	13.9	13.5
3:40	10.1	9.23	9.18	10.2	8.74	8.64	13	13.1
4:00	9.47	9.67	8.99	9.31	8.65	8.12	13.2	12.2
4:30	9.4	9.68	8.56	8.63	7.51	8.35	12.2	12
5:00	10.1	8.81	8.86	8.79	7.31	8.14	11.8	11.8
6:00	7.69	7.85	8.62	8.15	7.95	9.14	10.4	10.8
8:00	7.67	6.92	7.75	7.15	7.45	7.89	10	9.08
12:00	6.77	6.79	6.32	6.86	7.06	8.05	8.96	8.27
16:00	6.02	5.83	6.95	4.9	6.28	7.27	7.89	7.98
24:00	5.33	5.33	5.86	5.23	6.01	6.19	7.03	6.91
36:00	4.29	4.36	4.87	4.83	5.53	5.99	7.18	6.17
48:00	3.8	3.43	4.8	4.33	4.1	5.06	5.73	N/A
72:00	2.55	2.34	3.4	3.01	2.43	4.12	3.9	3.61
	35 Referencia	35 Teste	36 Referencia	36 Teste	38 Referencia	38 Teste	39 Referencia	39 Teste
ASC 0-all	360.3	334.0	403.9	361.3	369.0	433.9	501.5	470.9
Cmax	18.9	12.2	17.9	11.2	11.6	14.1	15.8	17
Tmax (h)	1.00	1.67	1.67	2.33	1.33	1.33	2.33	2.33

Tempo (h)	40 Referencia	40 Teste
0:00	BLOQ	BLOQ
0:20	BLOQ	BLOQ
0:40	1.81	4.56
1:00	5.97	6.5
1:20	6.95	11.2
1:40	8.08	9.27
2:00	7.95	8.66
2:20	9.05	9.54
2:40	8.88	11
3:00	9.95	8.23
3:20	9.69	9.14
3:40	9.79	8.89
4:00	9.95	9.04
4:30	10.1	9.47
5:00	10.1	9.46
6:00	10.3	9.58
8:00	9.76	9.06
12:00	8.58	7.98
16:00	7.83	7.52
24:00	7.42	6.7
36:00	6.06	5.5
48:00	5.24	4.72
72:00	3.48	3.18
	40 Referencia	40 Teste
ASC 0-all	449.9	417.6
Cmax	10.3	11.2
Tmax (h)	6.00	1.33

Anexo 3

Curvas individuais concentração plasmática vs tempo e parâmetros farmacocinéticos de Clonazepam após administração dos produtos teste e referência

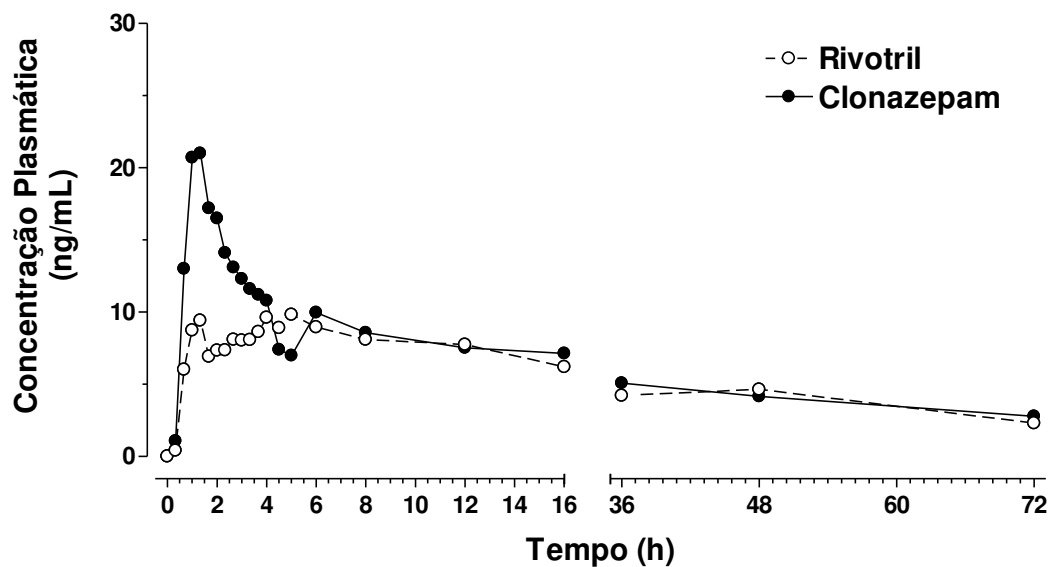
Curvas médias “concentração plasmática vs tempo” após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 1



Parâmetros farmacocinéticos após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 1.

Produto	Concentração (ng/mL)		
	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	$ASC_{0-72:00h}([ng^* h]/mL)$
Teste	25,70	1:00	507,85
Referência	22,00	0,67	445,77

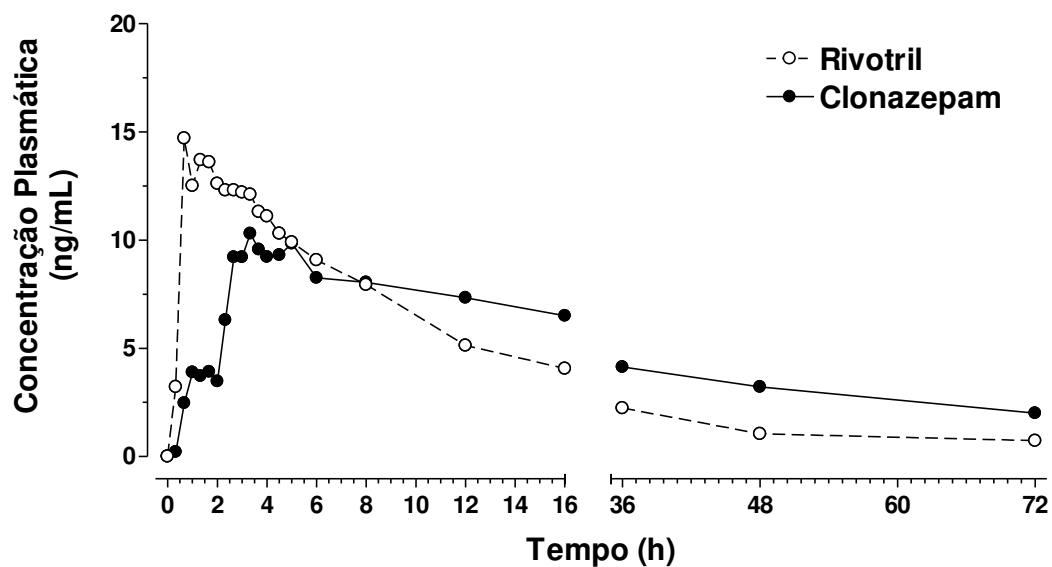
Curvas médias “concentração plasmática vs tempo” após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 2



Parâmetros farmacocinéticos após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 2.

Produto	Concentração (ng/mL)		
	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	ASC _{0-72:00h} ([ng* h]/mL)
Teste	21,00	1,33	406,55
Referência	9,83	5,00	361,63

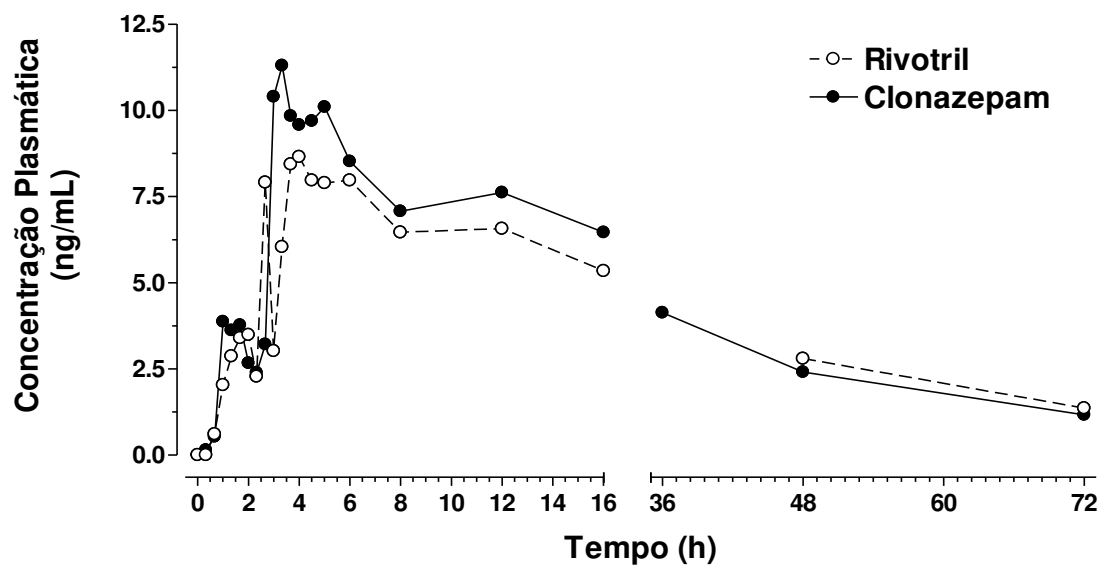
Curvas médias “concentração plasmática vs tempo” após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 3



Parâmetros farmacocinéticos após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 3.

Produto	Concentração (ng/mL)		
	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	ASC _{0-72:00h} ([ng* h]/mL)
Teste	10,30	3,33	321,95
Referência	14,70	0,67	225,35

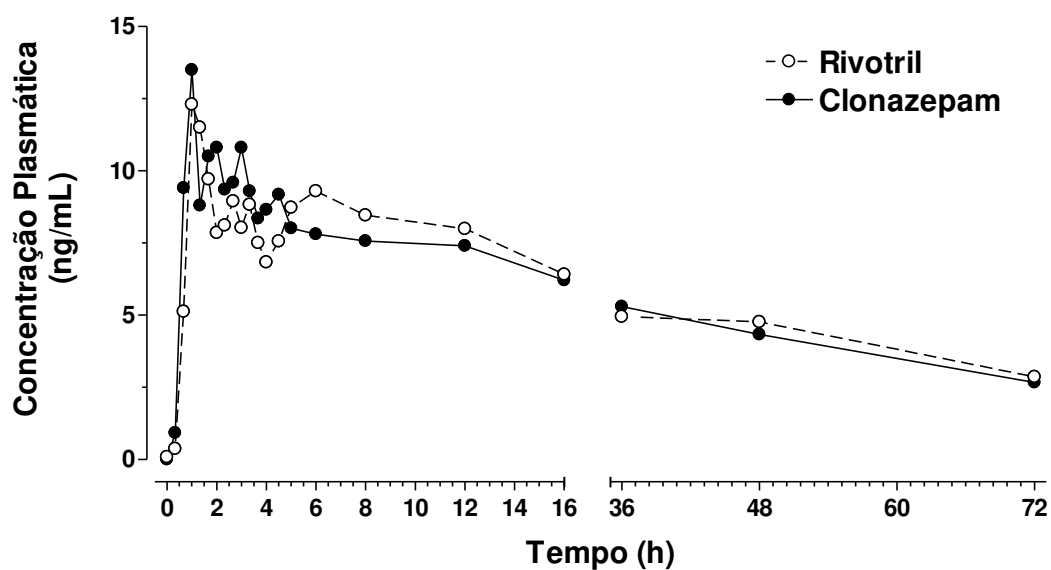
Curvas médias “concentração plasmática vs tempo” após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 5



Parâmetros farmacocinéticos após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 5.

Produto	Concentração (ng/mL)		
	$C_{\max}$ (ng/mL)	$T_{\max}$ (h)	ASC _{0-72:00h} ([ng* h]/mL)
Teste	11,30	3,33	295,31
Referência	8,65	4,00	265,98

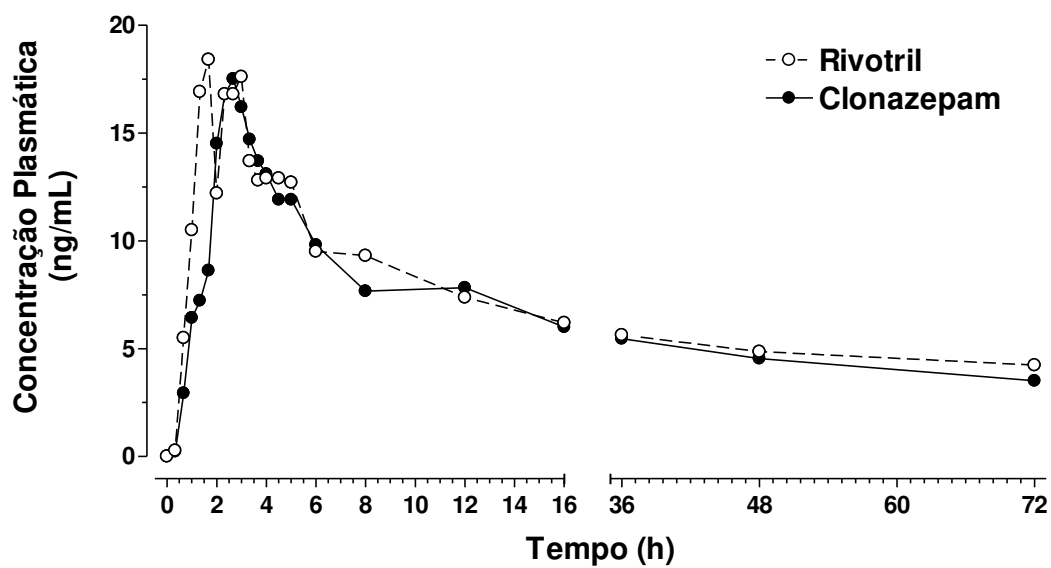
Curvas médias “concentração plasmática vs tempo” após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 6.



Parâmetros farmacocinéticos após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 6.

Produto	Concentração (ng/mL)		
	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	ASC _{0-72:00h} ([ng* h]/mL)
Teste	13,50	1,0	379,62
Referência	12,30	1,0	390,28

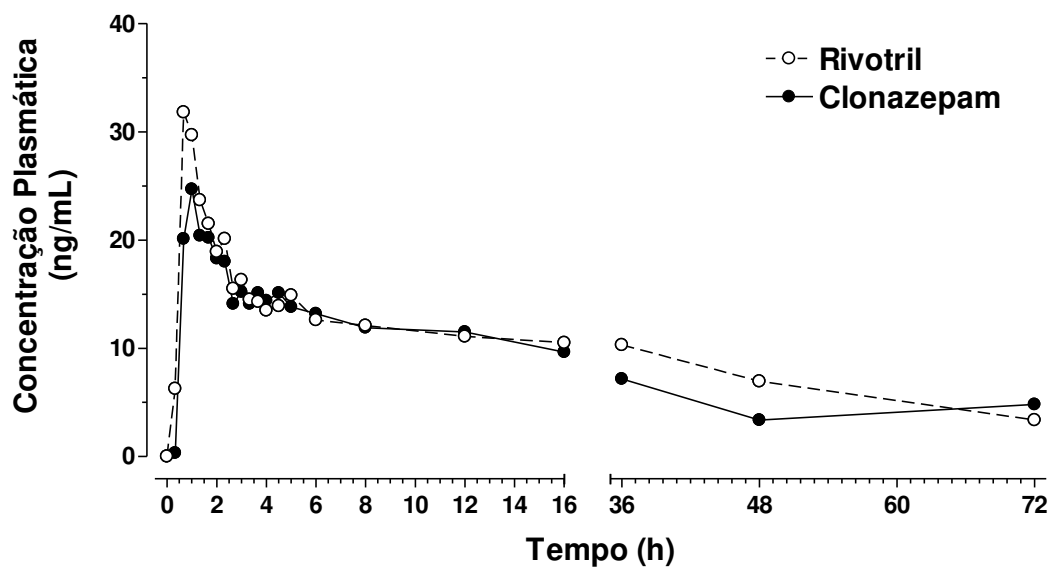
Curvas médias “concentração plasmática vs tempo” após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 7.



Parâmetros farmacocinéticos após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 7.

Produto	Concentração (ng/mL)		
	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	ASC _{0-72:00h} ([ng* h]/mL)
Teste	17,50	2,67	412,79
Referência	18,40	1,67	440,98

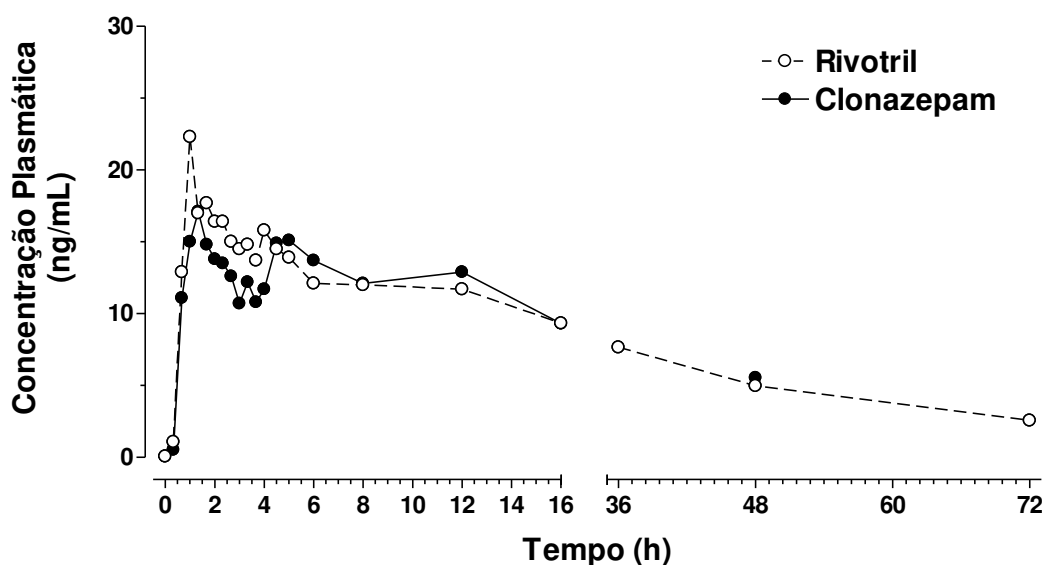
Curvas médias “concentração plasmática vs tempo” após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 8.



Parâmetros farmacocinéticos após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 8.

Produto	Concentração (ng/mL)		
	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	ASC _{0-72:00h} ([ng* h]/mL)
Teste	24,70	1,0	539,72
Referência	31,80	0,67	622,80

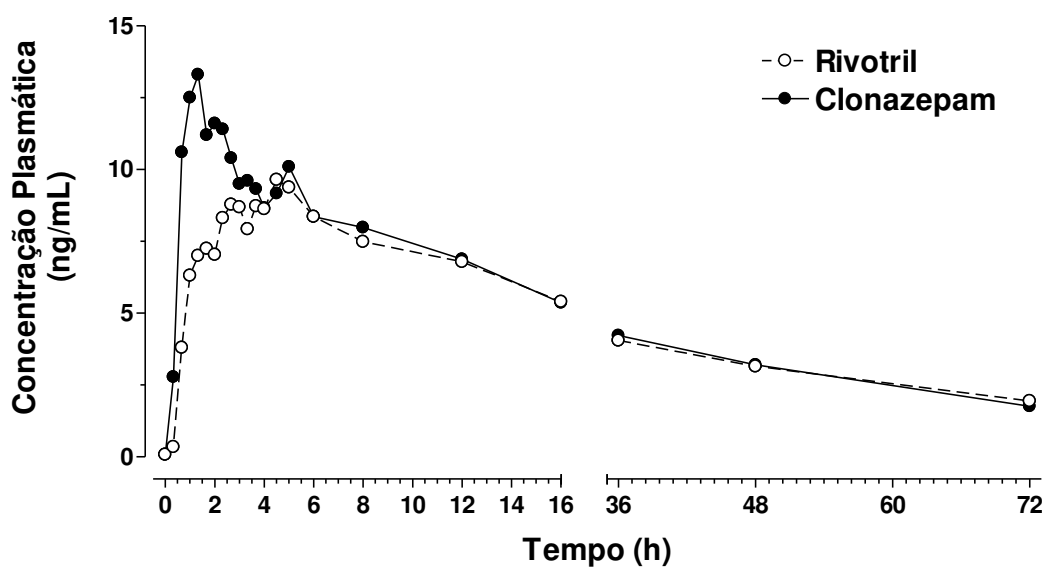
Curvas médias “concentração plasmática vs tempo” após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 9.



Parâmetros farmacocinéticos após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 9.

Produto	Concentração (ng/mL)		
	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	$ASC_{0-72:00h}([ng \cdot h]/mL)$
Teste	17,10	1,33	411,00
Referência	22,30	1,00	519,53

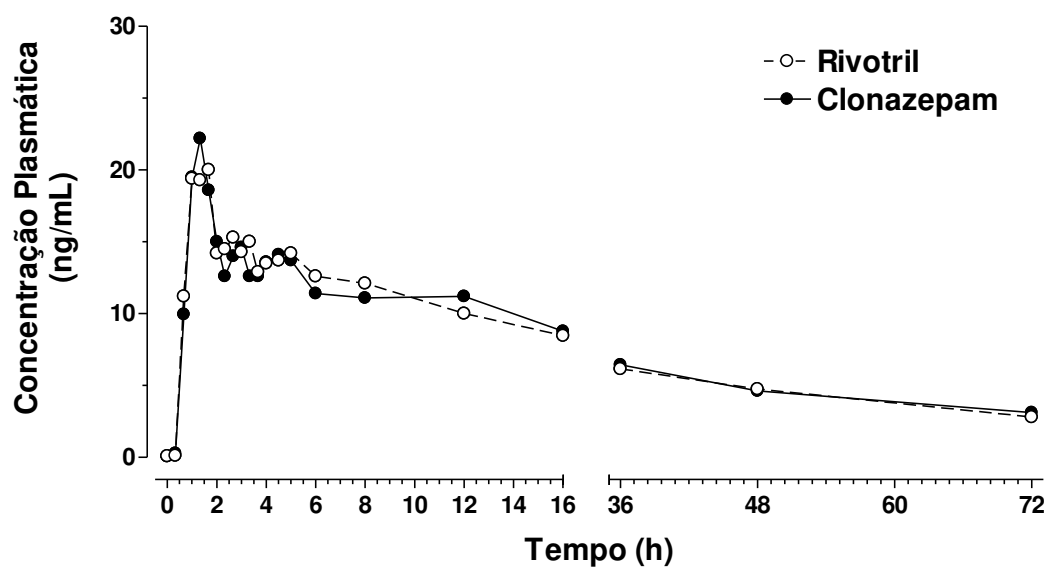
Curvas médias “concentração plasmática vs tempo” após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 10.



Parâmetros farmacocinéticos após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 10.

Produto	Concentração (ng/mL)		
	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	$ASC_{0-72:00h}$ ([ng* h]/mL)
Teste	13,30	1,33	322,19
Referência	9,65	4,50	306,51

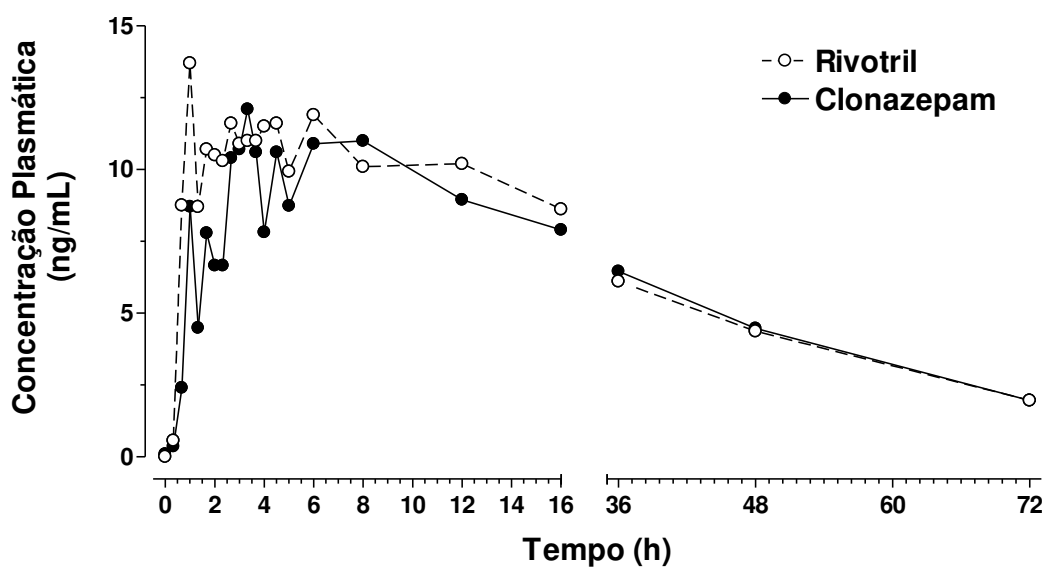
Curvas médias “concentração plasmática vs tempo” após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 11.



Parâmetros farmacocinéticos após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 11.

Produto	Concentração (ng/mL)		
	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	ASC _{0-72:00h} ([ng* h]/mL)
Teste	22,20	1,33	504,43
Referência	20,00	1,67	485,15

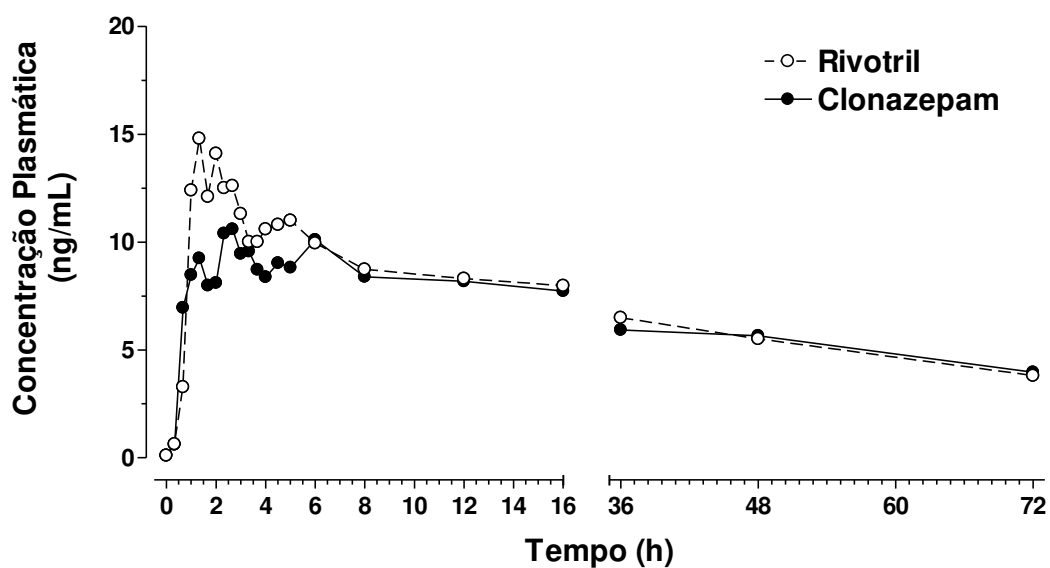
Curvas médias “concentração plasmática vs tempo” após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 13.



Parâmetros farmacocinéticos após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 13.

Produto	Concentração (ng/mL)		
	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	$ASC_{0-72:00h}([ng^* h]/mL)$
Teste	12,10	3,33	412,47
Referência	13,70	1,00	431,24

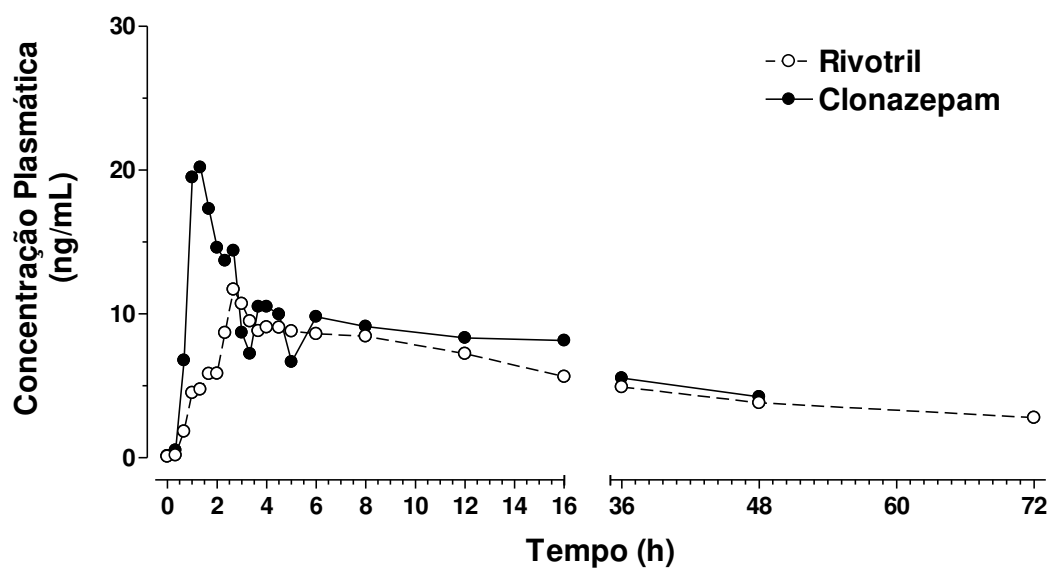
Curvas médias “concentração plasmática vs tempo” após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 14.



Parâmetros farmacocinéticos após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 14.

Produto	Concentração (ng/mL)		
	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	$ASC_{0-72:00h}$ ([ng* h]/mL)
Teste	10,60	2,67	444,45
Referência	14,80	1,33	460,99

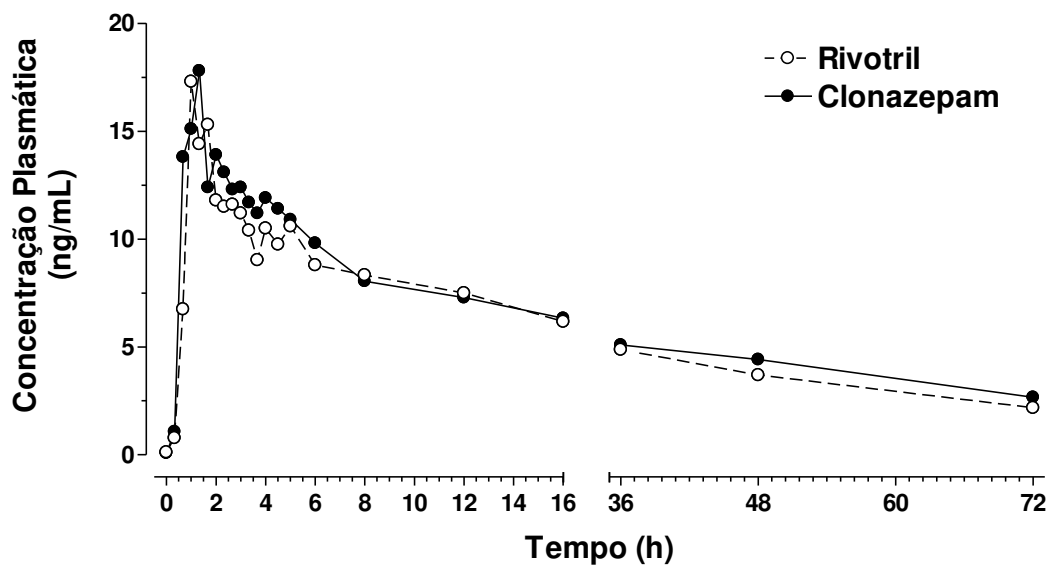
Curvas médias “concentração plasmática vs tempo” após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 15.



Parâmetros farmacocinéticos após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 15

Produto	Concentração (ng/mL)		
	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	$ASC_{0-72:00h}([ng^* h]/mL)$
Teste	20,20	1,33	333,54
Referência	11,70	2,67	352,28

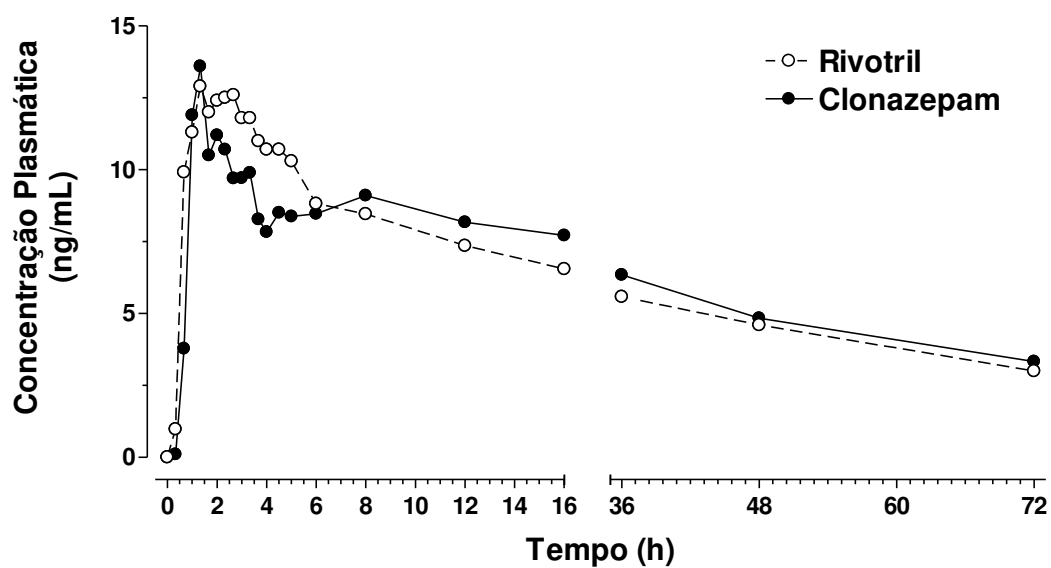
Curvas médias “concentração plasmática vs tempo” após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 16.



Parâmetros farmacocinéticos após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 16.

Produto	Concentração (ng/mL)		
	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	$ASC_{0-72:00h}([ng^* h]/mL)$
Teste	17,80	1,33	392,54
Referência	17,30	1,00	364,09

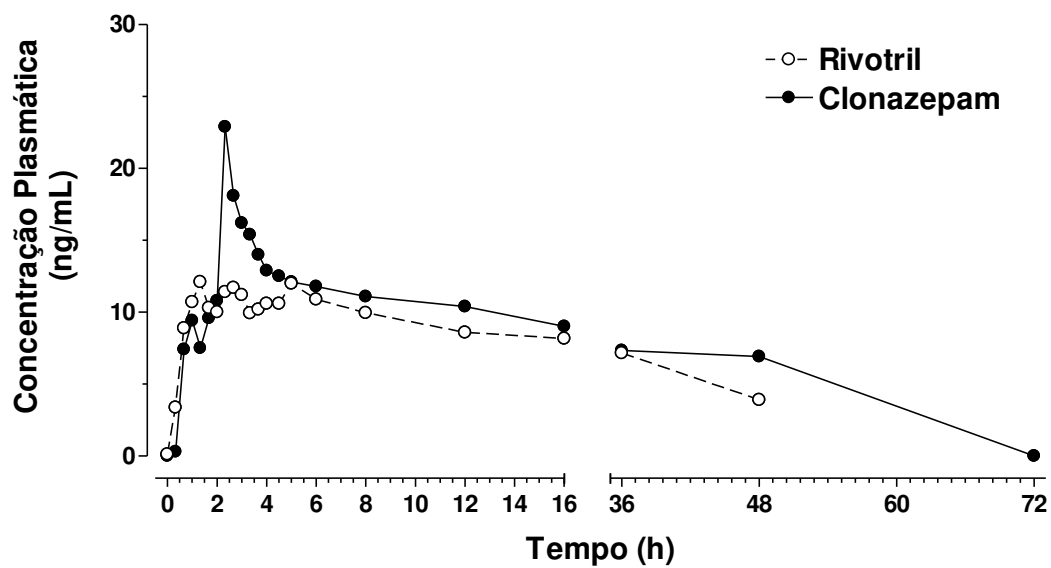
Curvas médias “concentração plasmática vs tempo” após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 21.



Parâmetros farmacocinéticos após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 21.

Produto	Concentração (ng/mL)		
	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	ASC _{0-72:00h} ([ng* h]/mL)
Teste	13,60	1,33	437,67
Referência	12,90	1,33	408,57

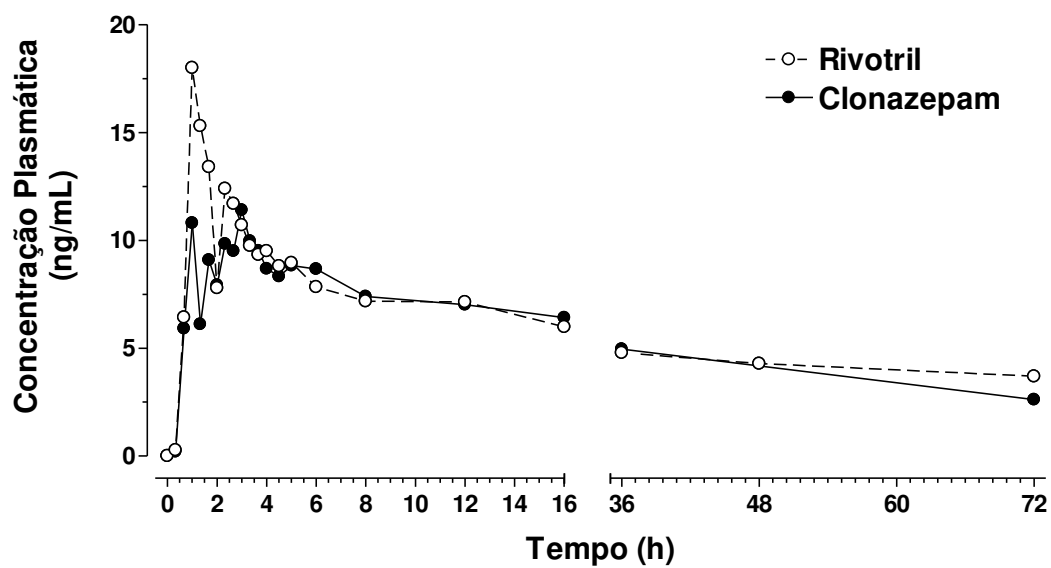
Curvas médias “concentração plasmática vs tempo” após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 22.



Parâmetros farmacocinéticos após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 22.

Produto	Concentração (ng/mL)		
	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	$ASC_{0-72:00h}([ng^* h]/mL)$
Teste	22,90	2,33	501,46
Referência	12,10	1,33	361,28

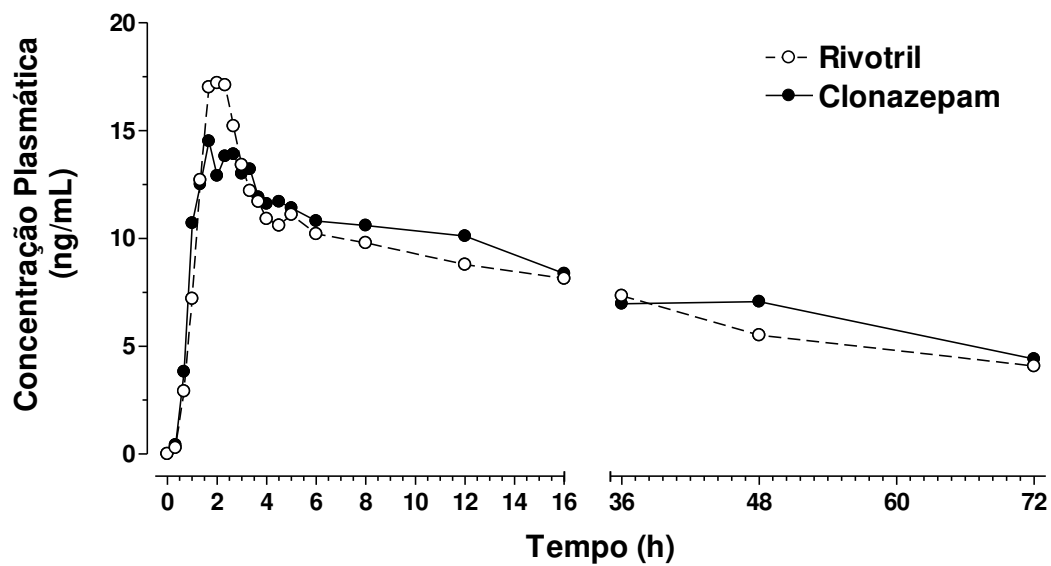
Curvas médias “concentração plasmática vs tempo” após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 23.



Parâmetros farmacocinéticos após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 23.

Produto	Concentração (ng/mL)		
	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	$ASC_{0-72:00h}([ng^* h]/mL)$
Teste	11,40	3,00	362,28
Referência	18,00	1,00	382,63

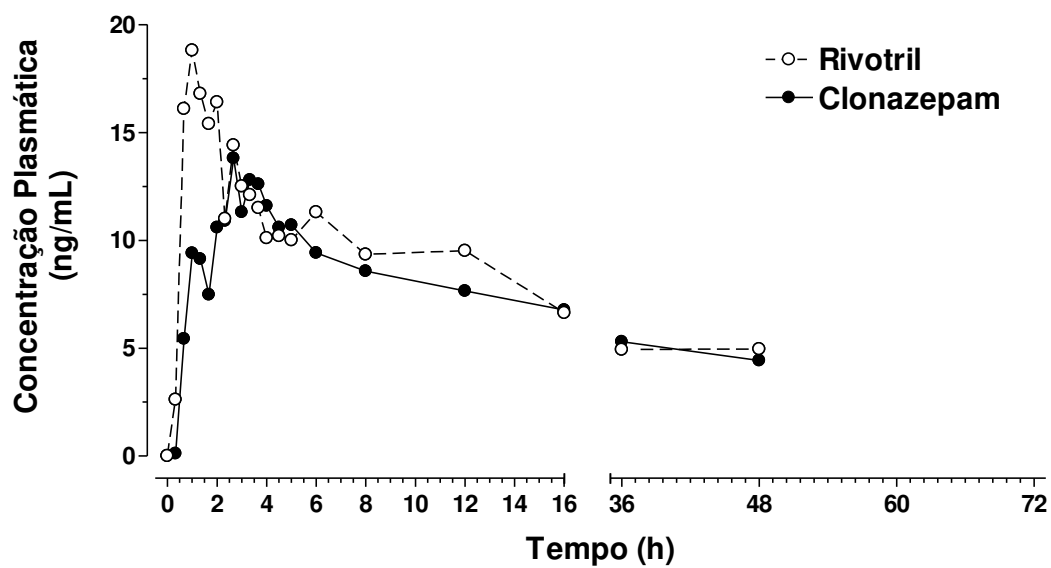
Curvas médias “concentração plasmática vs tempo” após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 24.



Parâmetros farmacocinéticos após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 24.

Produto	Concentração (ng/mL)		
	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	ASC _{0-72:00h} ([ng* h]/mL)
Teste	14,50	1,67	540,86
Referência	17,20	2,00	494,59

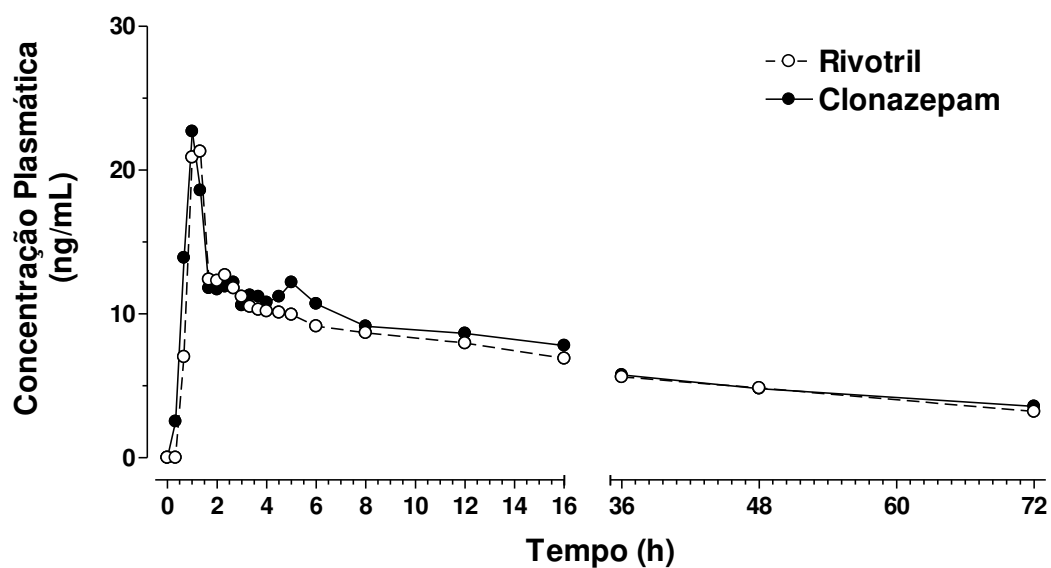
Curvas médias “concentração plasmática vs tempo” após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 25.



Parâmetros farmacocinéticos após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 25.

Produto	Concentração (ng/mL)		
	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	ASC _{0-72:00h} ([ng* h]/mL)
Teste	13,80	2,67	318,31
Referência	18,80	1,00	349,87

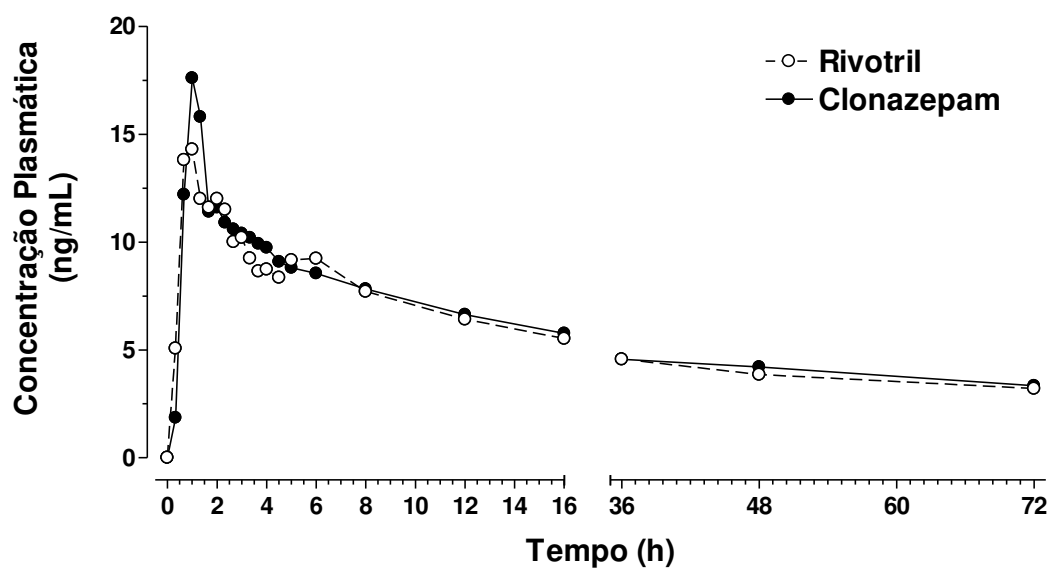
Curvas médias “concentração plasmática vs tempo” após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 26.



Parâmetros farmacocinéticos após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 26.

Produto	Concentração (ng/mL)		
	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	$ASC_{0-72:00h}([ng^* h]/mL)$
Teste	22,70	1,00	457,83
Referência	21,30	1,33	430,49

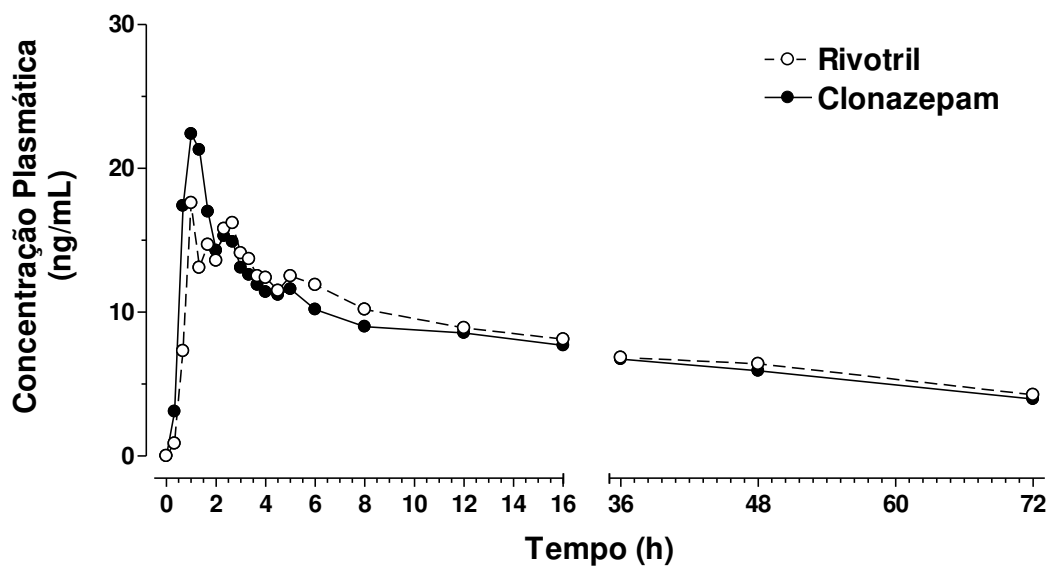
Curvas médias “concentração plasmática vs tempo” após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 27.



Parâmetros farmacocinéticos após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 27.

Produto	Concentração (ng/mL)		
	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	$ASC_{0-72:00h}([ng^* h]/mL)$
Teste	17,60	1,00	376,44
Referência	14,30	1,00	365,53

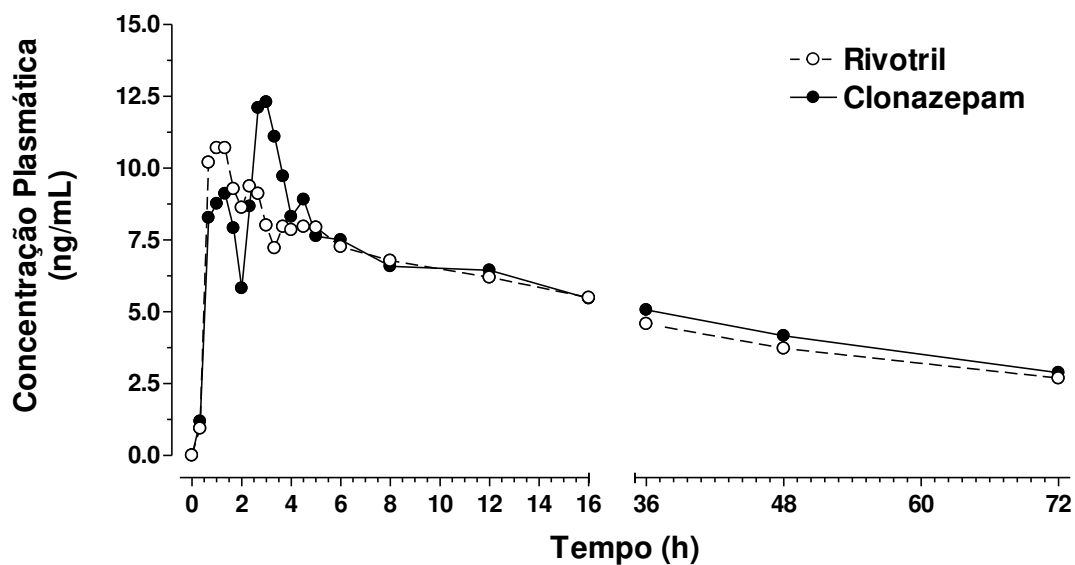
Curvas médias “concentração plasmática vs tempo” após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 28.



Parâmetros farmacocinéticos após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 28.

Produto	Concentração (ng/mL)		
	$C_{\max}$ (ng/mL)	$T_{\max}$ (h)	ASC _{0-72:00h} ([ng* h]/mL)
Teste	22,40	1,00	499,82
Referência	17,60	1,00	514,43

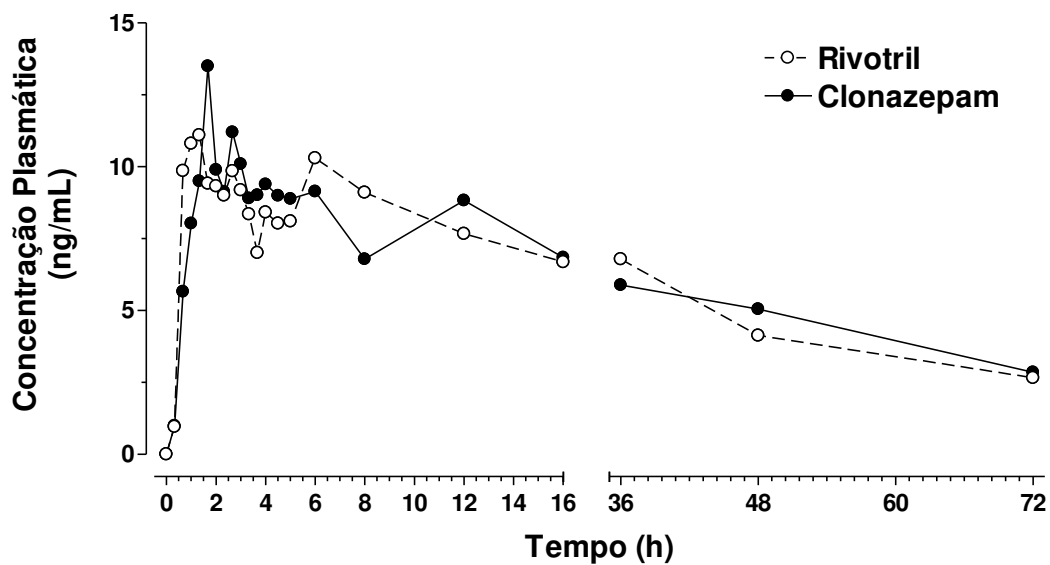
Curvas médias “concentração plasmática vs tempo” após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 29.



Parâmetros farmacocinéticos após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 29.

Produto	Concentração (ng/mL)		
	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	$ASC_{0-72:00h}([ng^* h]/mL)$
Teste	12,30	3,00	357,80
Referência	10,70	1,00	336,73

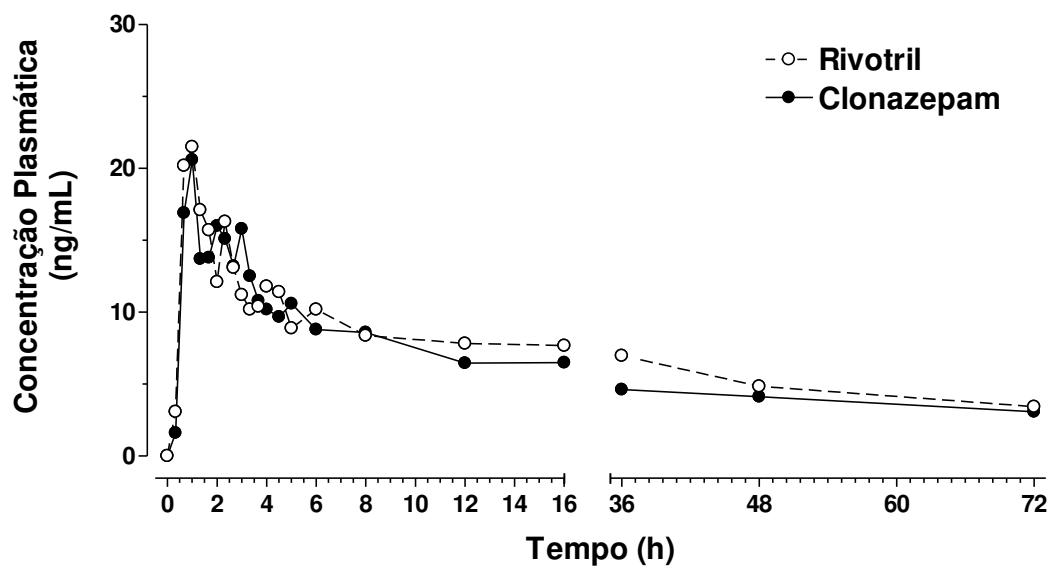
Curvas médias “concentração plasmática vs tempo” após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 30.



Parâmetros farmacocinéticos após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 30.

Produto	Concentração (ng/mL)		
	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	ASC _{0-72:00h} ([ng* h]/mL)
Teste	13,50	1,67	424,50
Referência	11,10	1,33	411,38

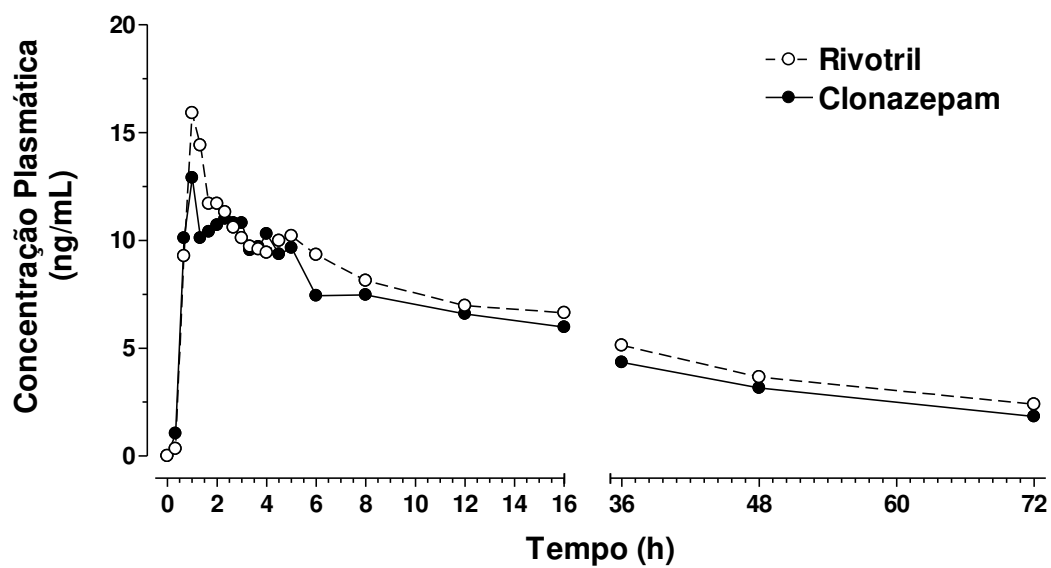
Curvas médias “concentração plasmática vs tempo” após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 31.



Parâmetros farmacocinéticos após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 31.

Produto	Concentração (ng/mL)		
	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	ASC _{0-72:00h} ([ng* h]/mL)
Teste	20,60	1,00	390,72
Referência	21,50	1,00	463,19

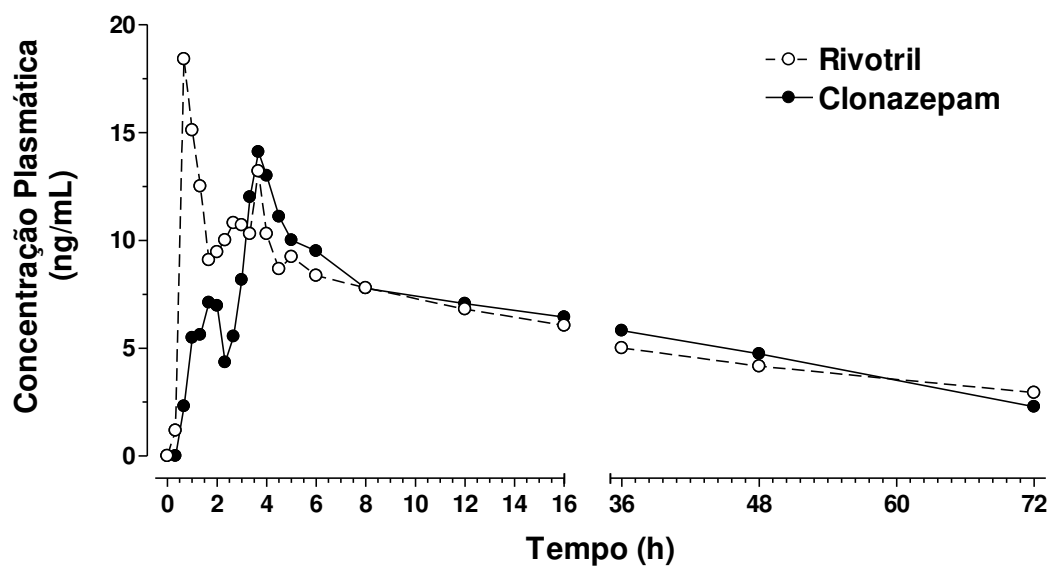
Curvas médias “concentração plasmática vs tempo” após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 32.



Parâmetros farmacocinéticos após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 32.

Produto	Concentração (ng/mL)		
	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	ASC _{0-72:00h} ([ng* h]/mL)
Teste	12,90	1,00	330,06
Referência	15,90	1,00	373,64

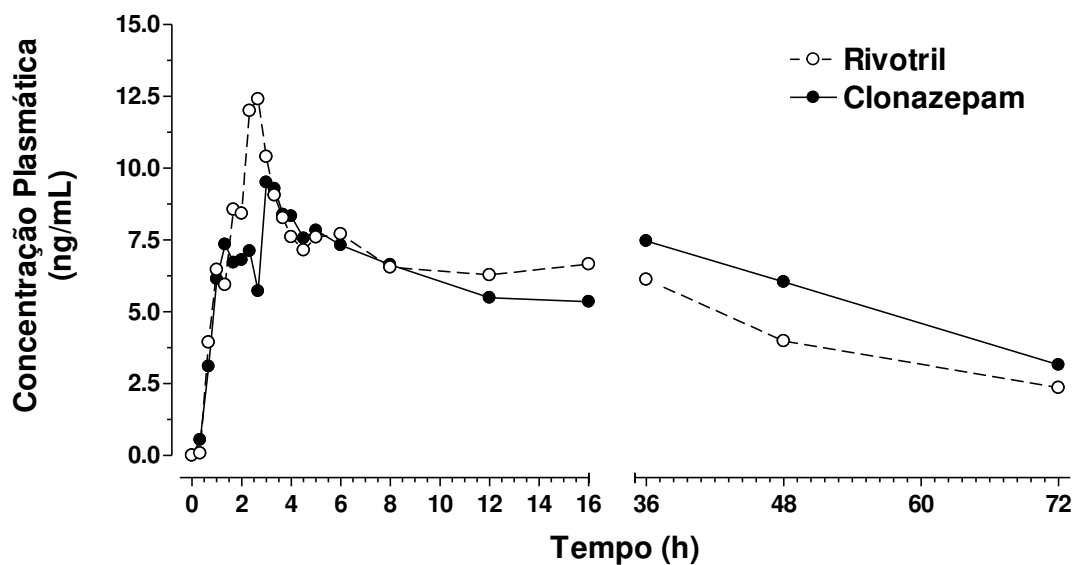
Curvas médias “concentração plasmática vs tempo” após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 33.



Parâmetros farmacocinéticos após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 33

Produto	Concentração (ng/mL)		
	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	ASC _{0-72:00h} ([ng* h]/mL)
Teste	14,10	3,67	392,10
Referência	18,40	0,67	381,43

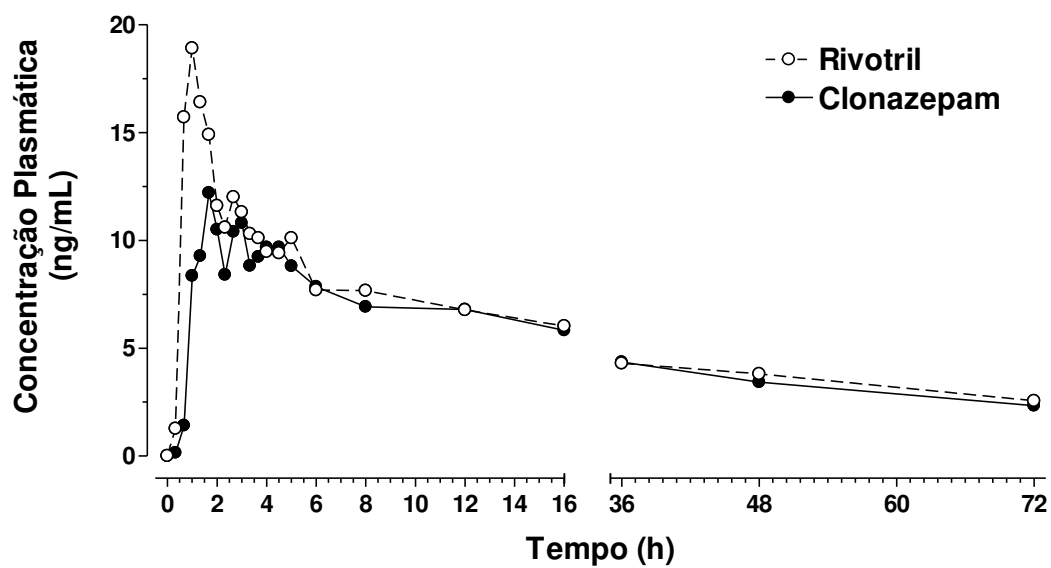
Curvas médias “concentração plasmática vs tempo” após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 34.



Parâmetros farmacocinéticos após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 34

Produto	Concentração (ng/mL)		
	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	$ASC_{0-72:00h}$ ([ng* h]/mL)
Teste	9,51	3,00	396,21
Referência	12,40	2,67	365,67

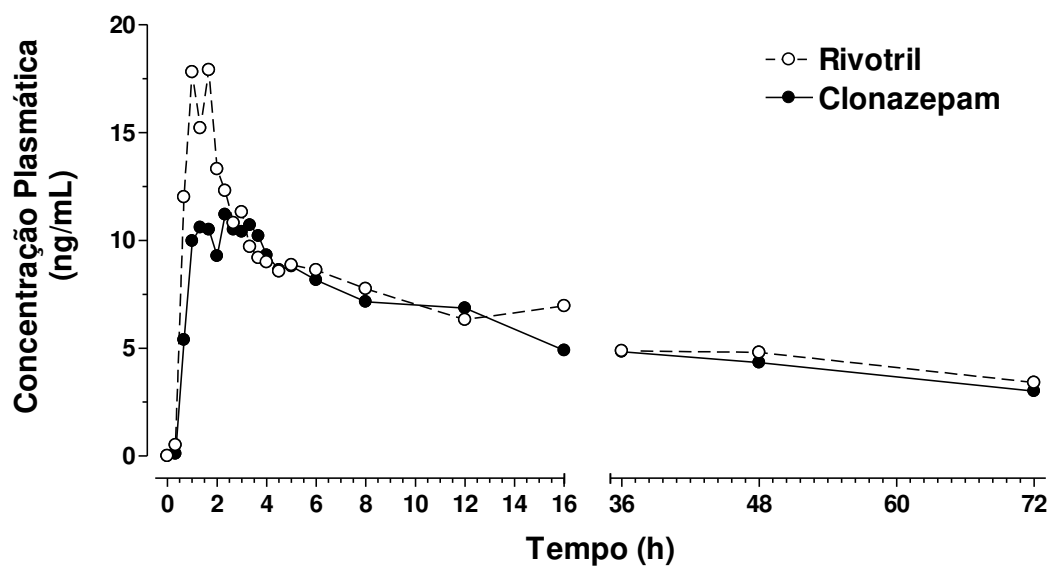
Curvas médias “concentração plasmática vs tempo” após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 35.



Parâmetros farmacocinéticos após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 35

Produto	Concentração (ng/mL)		
	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	ASC _{0-72:00h} ([ng* h]/mL)
Teste	12,20	1,67	333,99
Referência	18,90	1,00	360,27

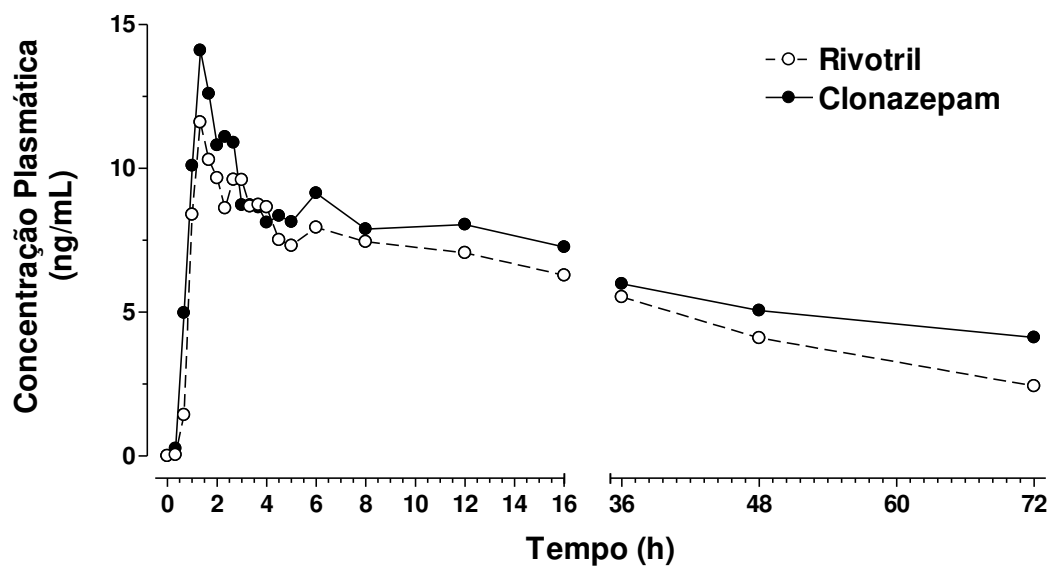
Curvas médias “concentração plasmática vs tempo” após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 36.



Parâmetros farmacocinéticos após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 36

Produto	Concentração (ng/mL)		
	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	ASC _{0-72:00h} ([ng* h]/mL)
Teste	11,20	2,33	361,26
Referência	17,90	1,67	403,93

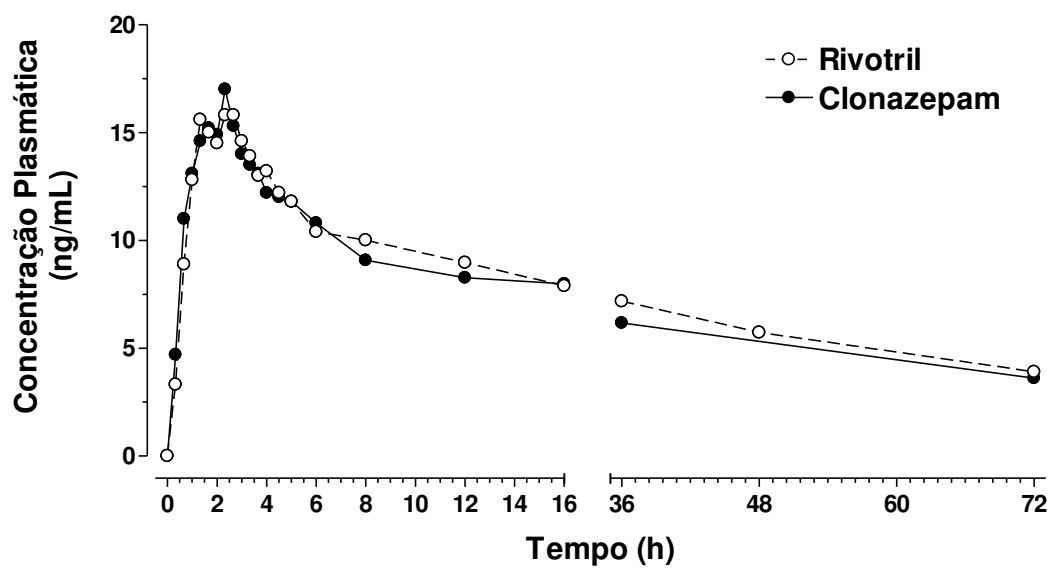
Curvas médias “concentração plasmática vs tempo” após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 38.



Parâmetros farmacocinéticos após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 38

Produto	Concentração (ng/mL)		
	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	ASC _{0-72:00h} ([ng* h]/mL)
Teste	14,10	1,33	433,87
Referência	11,60	1,33	369,05

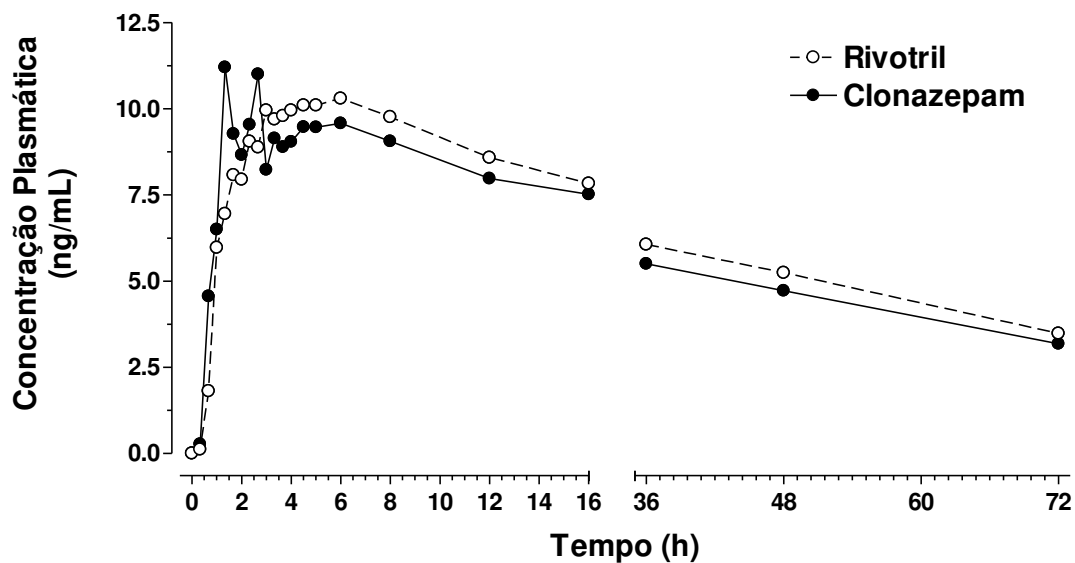
Curvas médias “concentração plasmática vs tempo” após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 39.



Parâmetros farmacocinéticos após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 39

Produto	Concentração (ng/mL)		
	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	ASC _{0-72:00h} ([ng* h]/mL)
Teste	17,00	2,33	470,93
Referência	15,80	2,33	501,46

Curvas médias “concentração plasmática vs tempo” após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 40.



Parâmetros farmacocinéticos após a administração dos produtos teste e referência ao voluntário 40

Produto	Concentração (ng/mL)		
	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	$ASC_{0-72:00h}([ng^* h]/mL)$
Teste	11,20	1,33	417,58
Referência	10,30	6,00	449,91

Anexo 4

Aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

 **COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**
Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP
☎ (0_19) 3788-8936
FAX (0_19) 3788-8925
🌐 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html
✉ cep@fcm.unicamp.br

CEP, 15/02/05.
(Grupo II)

PARECER PROJETO: N° 044/2005

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "ESTUDO DE BIODISPONIBILIDADE COMPARATIVA DE UMA FORMULAÇÃO DE TESTE (CLONAZEPAN - COMPRIMIDO - 2MG; RANBAXY LABORATORIES, DEWAS, INDIA) VERSUS UMA FORMULAÇÃO DE REFERÊNCIA (RIVOTRIL® - COMPRIMIDO - 2MG; ROCHE - BRASIL) EM VOLUNTÁRIOS SADIOS DE AMBOS OS SEXOS"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Gilberto de Nucci
INSTITUIÇÃO: Clínica de Repouso Itapira
APRESENTAÇÃO AO CEP: 14/02/2005
APRESENTAR RELATÓRIO EM: 15/08/05 e 15/02/06

II - OBJETIVOS

Comparar a biodisponibilidade de duas formulações de clonazepam em voluntários sadios de ambos os sexos.

III - SUMÁRIO

Clonazepam é um inibidor do sistema nervoso central, indicado para tratamento de crises epilépticas e ausências (pequeno mal). Sua absorção, após a administração oral, em indivíduos sadios é rápida e praticamente completa, com Tmax ao redor de três horas. Nesse protocolo os sujeitos da pesquisa (40 sendo 20 homens e 20 mulheres) receberão as duas formulações - teste e referência- em dose única contendo 2mg de clonazepam, com intervalo superior a 7 meias vidas entre elas. Todos os sujeitos serão internados na unidade clínica na noite anterior ao início do estudo, que ocorrerá pela manhã e preservando o jejum pelas primeiras duas horas, após esse período será seguido um padrão alimentar estabelecido. Tanto para ingressar como para receber alta, os voluntários serão avaliados clínica e laboratorialmente, também serão realizados eletrocardiogramas. Existem critérios de inclusão e exclusão e todos os participantes devem ter idades superiores a 18 anos.

Para a avaliação farmacocinética serão coletadas 24 amostras de sangue em cada período de internação, ao longo de 72 horas após a ingestão do comprimido, sendo que uma de 25mL e as demais de 5mL cada. As amostras serão encaminhadas para determinação dos níveis plasmáticos da droga em estudo (levofloxacina). Os resultados obtidos serão avaliados estatisticamente para determinação da bioequivalência. Todos os sujeitos terão coletadas amostras de sangue por um período de até 48 horas após a administração da levofloxacina e,

pelo tempo de sua participação e pelas despesas decorrentes, todos os participantes receberão R\$ 550,00 (quinhentos e cinquenta reais).

Existem o termo de recrutamento e o termo de consentimento livre e esclarecido, nesse constam as responsabilidades de cada parte, todos os procedimentos aos quais será submetido e os efeitos adversos que podem decorrer do uso da droga em estudo. Também fica claro que o sujeito da pesquisa poderá retirar seu consentimento a qualquer momento, durante o protocolo sem qualquer tipo de prejuízo.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto está bem elaborado e esclarecedor. Todos os participantes estarão cobertos por um seguro de vida em grupo pela empresa "executivos seguros" e pela empresa "Trial Plan Assistência Médica" para eventos adversos relacionados ao estudo.

O projeto trata sobre um tema atual e importante para a produção de medicamentos a baixo custo e de boa qualidade. O grupo envolvido é pioneiro nesse tipo de pesquisa. Não fere a legislação em vigor.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na II Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 15 de fevereiro de 2005.


Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Anexo 5

Artigo publicado

Clonazepam quantification in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry in a bioequivalence study

Luiz E. Cavedal,¹ Fabiana D. Mendes,^{3,4} Claudia C. Domingues,^{1,2} Anil K. Patni,⁵ Tausif Monif,⁵ Simrit Reyar,⁵ Alberto dos S. Pereira,⁴ Gustavo D. Mendes^{2,3,4} and Gilberto De Nucci^{1,2,3,4*}

¹ Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas/SP, Brazil

² Cartesius Analytical Unit, Department of Pharmacology ICB-USP, Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, 05508-900 Sao Paulo, SP, Brazil

³ Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

⁴ Galeno Research Unit, Latino Coelho St., 1301, Parque Taquaral, 13087-010, Campinas, SP, Brazil

⁵ Ranbaxy Laboratories Ltd, Haryana, India

Received 7 June 2006; Accepted 14 October 2006

A rapid, sensitive and specific method for quantifying clonazepam in human plasma using diazepam as the internal standard (IS) is described. The analyte and the IS were extracted from plasma by liquid-liquid extraction using a hexane/diethylether (20:80, v/v) solution. The extracts were analysed by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry (HPLC-MS-MS). Chromatography was performed on a Jones Genesis C8 4 µm analytical column (100 × 2.1 mm i.d.). The method had a chromatographic run time of 3.0 min and a linear calibration curve over the range 0.5–50 ng/ml ($r^2 > 0.9965$). The limit of quantification was 0.5 ng/ml. This HPLC/MS/MS procedure was used to assess the bioequivalence of two clonazepam 2 mg tablet formulations (clonazepam test formulation from Ranbaxy Laboratories Ltd and Rivotril from Roche Laboratórios Ltda as standard reference formulation). Copyright © 2006 John Wiley & Sons, Ltd.

KEYWORDS: clonazepam; healthy volunteer; plasma; pharmacokinetic; HPLC-MS-MS

INTRODUCTION

Clonazepam [5-(2-chlorophenyl)-1,3-dihydro-7-nitro-2H-1,4-benzodiazepin-2-one] is a benzodiazepine¹ with a molecular weight of 315.04. Clonazepam has been used for the treatment of epilepsies and panic disorders.^{1–3}

Several analytical methods based on gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS; hair, plasma and serum),^{4–6} spectrophotometry,⁷ thin-layer chromatography (TLC)-densitometry,⁸ high-performance liquid chromatography (HPLC; plasma and hair)^{9,10} and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS; hair, nail and urine)^{11–13} have been used for clonazepam quantification. In this paper, we describe a fast, sensitive and specific method for the quantification of clonazepam in human plasma using HPLC coupled with tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS), with diazepam as the internal standard (IS) (Fig. 1). This method was subsequently used in a bioequivalence study of two clonazepam 2 mg tablet formulations.

METHODS

Calibration standards and quality control

Stock solutions of clonazepam and IS (diazepam) were prepared in acetonitrile/water (50:50, v/v) at concentrations of 1 mg/ml. Calibration curves of clonazepam were prepared by spiking blank plasma at concentrations of 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 7.5, 10.0, 20.0 and 50.0 ng/ml, and each concentration was analysed in duplicate. The quality control samples were prepared daily in blank plasma at concentrations of 1.5, 9.0 and 45.0 ng/ml (lower QC (LQC), middle QC (MQC) and higher QC (HQC), respectively). Eight quality controls for each level were analysed in each validation ($n = 3$). The spiked plasma samples (standards and quality controls) were extracted in each analytical batch along with the unknown samples.

Chemicals and reagents

Clonazepam was obtained from Nortec Química (Brazil). Diazepam was obtained from Globe Química (Brazil). Acetonitrile, methanol, diethylether and formic acid were purchased from J.T. Baker (USA), and hexane from Mallinckrodt

*Correspondence to: Gilberto De Nucci, Av. Jesuino Marcondes Machado, 415 13092-320, Campinas, SP, Brazil.
E-mail: denucci@dglnet.com.br

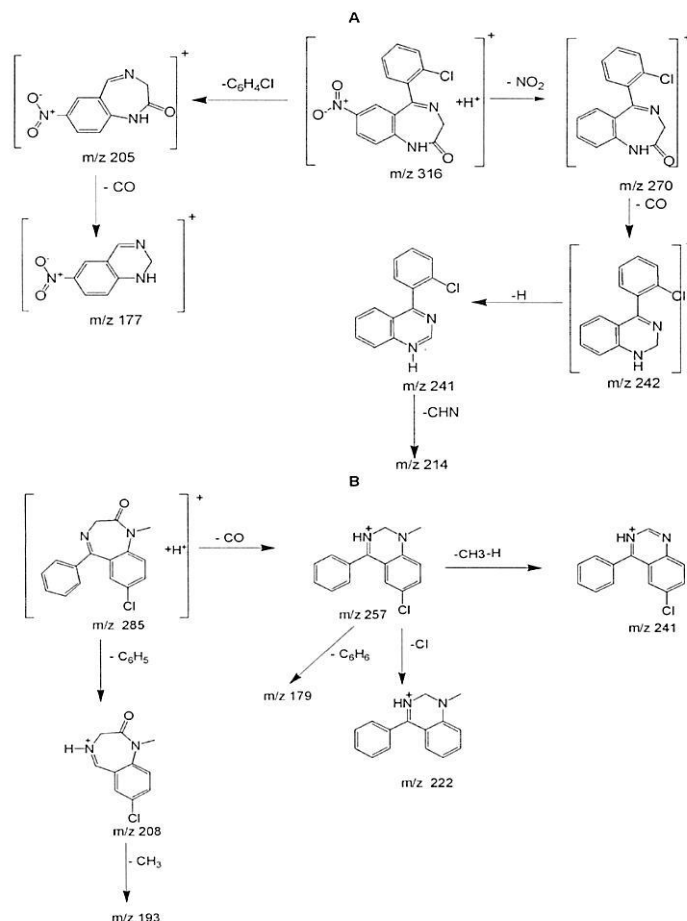


Figure 1. Proposed fragmentation pathways for clonazepam (A) and diazepam (B).

(USA). Blank human blood was collected from healthy, drug-free volunteers. Plasma was obtained by centrifugation of blood treated with sodium heparin. Pooled plasma was prepared and stored at approximately -20°C until needed.

Drug analysis

The blood samples treated with sodium heparin were centrifuged at approximately 2000 *g* for 10 min at room temperature and the plasma was stored at -20°C until assayed.

The extraction was performed by vortex-mixing 500 μl of each plasma sample placed in glass tubes, followed by the IS (50 μl of diazepam at 100 ng/ml), with 4 ml of an organic

solvent mixture (hexano/diethylether; 20:80, v/v) for 40 s. This step was performed in a fume cupboard. The upper organic phase was transferred to another set of clean glass tubes and evaporated until dry under N_2 at 40°C . The dry residues were dissolved with 150 μl of acetonitrile/water (50/50; v/v). The possibility of direct injection without previous cleanup was not explored. It is definitely possible to reduce the amount of plasma in the extraction process. (A new validation would be required to establish that.)

Chromatographic conditions

An aliquot (10 μl) of each plasma extract was injected into a Genesis C₈ analytical column (100 $\times$ 2.1 mm i.d.). The

compounds were eluted by pumping the mobile phase at a flow rate of 0.450 ml/min. Under these conditions, typical standard retention times were 1.5 min for clonazepam and 1.6 min for diazepam, and back-pressure values of approximately 100 bars were observed. The temperature of the auto-sampler was maintained at $8 \pm 2^\circ\text{C}$ and the run time was 3.0 min.

The method has an additional time (0.5 min) to inject a new sample since the auto-sampler we employed took 0.5 min to inject a sample. This additional time was enough to finish the equilibrium between injections.

The mobile phase A was acetonitrile/water/formic acid (90/9/1; v/v/v) and the mobile phase B was water/formic acid (99.954/0.046; v/v). The gradients to this method were: 0.2–1.0 min, 50% of mobile phase A; 1.0–2.2 min, 90% of mobile phase A; and 2.2–2.8 min, 50% of mobile phase A.

Mass spectrometric conditions

The mass spectrometer (API 3000) operated in the positive electrospray ionization mode using a crossflow counter electrode (ES+) was set up for multiple reaction monitoring (MRM) to monitor the transitions $316.0 \rightarrow 270.0$ and $285.1 \rightarrow 193.2$, for clonazepam and the IS, respectively. Figure 1 shows the proposed fragmentation pathways for clonazepam and diazepam. Figure 2 shows the full-scan spectra (upper trace) and the product ion spectra (lower trace) obtained for clonazepam (panel A) and diazepam (panel B). To optimize all the MS parameters, a standard solution of the analyte and IS was infused into the mass spectrometer. For both clonazepam and diazepam, the following optimized

parameters were obtained: for clonazepam, the dwell time, cone voltage and collision energy were 300 ms, 31 V and 37 eV, respectively. The corresponding values for diazepam were 300 ms, 36 V and 45 eV, respectively. Data acquisition and analysis were performed using the software Analyst v (v 1.4) running in Windows XP on a Pentium IV PC.

Method development

Full-scan positive mass spectra of clonazepam and IS showed the protonated molecule $[M + H]^+$ of m/z 316.0 and 285.1, respectively. The most abundant ion in the product ion spectra was at m/z 270 for clonazepam and 193.2 for diazepam.

From these results, the mass spectrometer was set as follows: m/z 316.0 for clonazepam and 285.1 for diazepam as the precursor ions and m/z 270.0 and 193.2 as the respective product ions in the MRM mode. Linearity, precision and accuracy were determined to assess the performance of the method.

Linearity was determined to assess the performance of the method. A linear least-squares regression with a weighting index of $1/x^2$ was applied to the peak area ratios of clonazepam and IS versus the concentrations of the plasma standards of clonazepam in duplicate to generate a calibration curve.

The recovery was evaluated by dividing the extracted sample mean response by the unextracted (spiked blank plasma extract) sample mean of the corresponding concentration. The matrix effect experiments were carried out

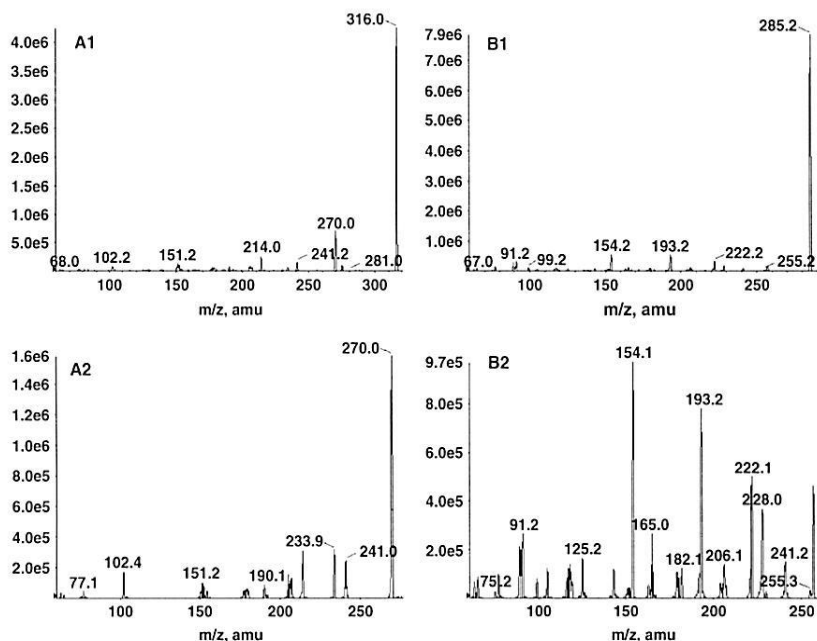


Figure 2. Full-scan mass spectra (1) and product ion spectra (2) of clonazepam panel (A) and diazepam panel (B).

using the ratio between spiked mobile phase solutions and unextracted samples, spiked on plasma residues.

Within- and between-run precisions were determined as the coefficient of variation (CV) (%) = $100(SD/M)$ and the accuracy (%) by $100(M/T)$, where M is the mean, SD is the standard deviation of M and T is the theoretical concentration.

Suppression of the MS signal ('ion suppression') can be caused by contaminants (e.g. salts, proteins, amino acids, etc.) in the LC eluant entering the MS. Thus, a non-specific extraction procedure may produce ion suppression that could interfere with the analysis of the samples. The effects of the sample preparation method on the variability of the electrospray ionization response should be determined.

To assess the effect of ion suppression on the MS/MS signal of the analyte, clonazepam and the IS (diazepam), the extraction procedure was evaluated. The experimental set-up consisted of an infusion pump connected to the system by a 'zero volume tee' before the split and the HPLC system pumping the mobile phase, which was the same as that used in the routine analysis of clonazepam. The infusion pump was set to transfer (10.0 μ l/min) a mixture of the analyte and IS in the mobile phase (both 10 μ g/ml).

Stability

To assess stability, quality control plasma samples (1.5, 9.0 and 45.0 ng/ml) were subjected to short-term (7 h) incubation at room temperature; four freeze/thaw (20 °C) cycles; 47 h in the auto-sampler (8 °C $\pm$ 2); and a long-term incubation (25 days). Subsequently, the clonazepam concentrations were measured and compared with freshly prepared samples.

Clinical protocol

The volunteers (18–55 years; body mass index 19–27) were selected for the study after an assessment of their state of health based on a clinical evaluation and laboratory tests. The study began with 40 volunteers; two volunteers dropped out of the study for personal reasons; one volunteer dropped out of the study on the basis of a decision by the principal investigator (positive response to the exclusion criteria; β -HCG+). Four volunteers were not enrolled in the study. Consequently, 33 volunteers were included in the bioequivalence evaluation.

The clinical protocol was approved by the Ethics Committee of the University of Campinas. Any major changes required approval from the Committee. The study was performed in accordance with the provisions of the Declaration of Helsinki (1964), as revised in Tokyo (1975), Venice (1983), Hong Kong (1989), Somerset West (1996) and Edinburgh (2000).

The study had a single dose, randomized, two-way crossover design, with a 21-day washout period between doses. The volunteers were hospitalized for two periods. After overnight fasting, they received (at approximately 07:00 A.M.) a single dose of clonazepam (2 mg of either tablet formulation) with water (240 ml). The volunteers then fasted for 2 h, after which a standard lunch was served, and an evening meal was provided 10 h after dosing. The

standard meal consisted of rice, beans, vegetables and fried chicken plus a fruit as dessert. No other food was permitted during the 'in-house' period, and liquid consumption was allowed *ad libitum* after lunch (with the exception of xanthine-containing drinks).

Formulations

The following formulations were used: Clonazepam (lot number 1391899, expiration date: March 2006) from Ranbaxy Laboratories Ltd, India as the test formulation, and Rivotril® (lot number RJ0233, expiration date: May 2007) from Roche Laboratórios Ltda, Brazil, as the standard reference.

Pharmacokinetics and statistical analysis

Bioequivalence between the two formulations was assessed by calculating individual test/reference ratios for the peak of concentration (C_{max}) and the area under the curve (AUC) of the plasma concentration until 72 h ($AUC_{0-72\text{ h}}$). The C_{max} and the time taken to achieve this concentration (T_{max}) were obtained directly from the curves. The $AUC_{0-72\text{ h}}$ and C_{max} data for the two formulations were analysed by ANOVA to determine whether the 90% CI of the ratios was within the 80–125% interval indicative of bioequivalence as proposed by the U.S. Food and Drug Administration.

The software used included WinNonLin Professional Network Edition (Scientific Consulting, v. 3.0), Microsoft Excel (v. 7.0) and GraphPad Prism (v. 3.02).

RESULTS AND DISCUSSION

Diazepam was selected as the IS because it has a suitable molecular similarity, easy availability and low cost. Deuterated standards are preferred instead of analogues; however, they are not always commercially available and they are generally substantially more expensive than the analogues. In case of patients taking both clonazepam and diazepam, one could use either the deuterated standard (if available) or choose a benzodiazepenic derivative as an IS.

In our laboratory, we normally optimize for the three more intense ions. For this reason, some ions (Fig. 2) appear only in the full-scan spectra, and the following values were obtained for clonazepam: m/z 270 (CE 37 eV), 241 (CE 51 eV), 233.9 (CE 25 eV) and 177.2 (CE 89 eV) and for diazepam: m/z 257 (CE 29 eV), 241 (CE 49 eV), 228 (CE 35 eV) and 193 (CE 43 eV). The efficiency of the radical formation depends on the molecular structure and the energy; for example, in clonazepam for the ion m/z 177.2 the optimized collision energy was 89 eV, more than double that for the formation of m/z 270.

The calibration curves were also prepared daily. The method was linear for clonazepam concentrations from 0.5 to 50.0 ng/ml (calibration curve $0.0554x + 0.00317$; $r^2 > 0.9965$, e.g.). A linear least-squares regression with a weighting index of $1/x^2$ was performed on the peak area ratios of clonazepam and the IS versus the clonazepam concentrations of the eight human plasma standards (in duplicate) to generate a calibration curve. No significant ion suppression was observed in the region where the analyte and the IS eluted (Fig. 3).

The recovery of clonazepam was $87.4 \pm 6.9\%$, $89.9 \pm 7.5\%$ and $86.2 \pm 2.5\%$ for the 1.5, 9.0 and 45.0 ng/ml standard

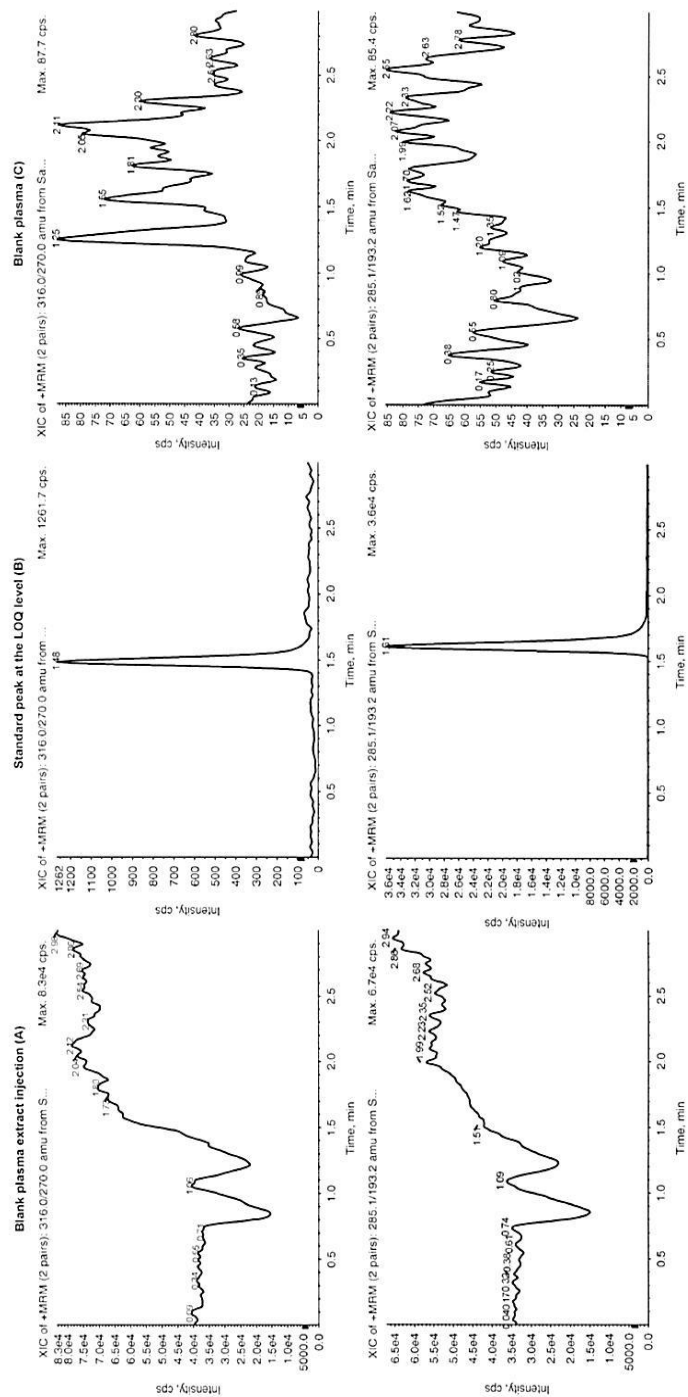


Figure 3. Ion suppression experiment (baseline profile after blank plasma extract injection (A); the standard peak at the LOQ level (B); and blank plasma (C)).

concentrations, respectively. The recovery of IS was $108.1 \pm 7.0\%$, $106.6 \pm 14.6\%$ and $110.5 \pm 12.3\%$ for the 1.5, 9.0 and 45.0 ng/ml standard concentrations, respectively. No significant matrix effect was observed. The lower recovery of clonazepam was probably due to its lower hydrophobicity than diazepam, which is due to the presence of the nitro group in the clonazepam molecule. The comparison with the unextracted samples spiked on plasma residues is done in order to eliminate matrix effects, giving a true recovery.

The limit of quantification (LOQ), defined as the lowest concentration at which both the precision and accuracy were lower than 20%, was 0.5 ng/ml. The stability tests indicated that no significant degradation occurred under the conditions described (Table 1). The within- and between-run precisions

and accuracy for the LOQ and QCs are summarized in Table 2.

No endogenous peak was observed in the mass chromatogram of blank plasma. Figure 3 shows a chromatogram for the standard LOQ sample, in which the retention times for clonazepam and the IS were 1.5 and 1.6 min, respectively.

Table 3 shows the values for $AUC_{(0-72h)}$, C_{max} and T_{max} . Additionally, Table 3 shows the power of the average bioequivalence test, the ratio of the geometric mean, confidence intervals (90%) and the intra-subject coefficients of variation. The mean plasma concentration of clonazepam versus time curves obtained after a single oral dose of each clonazepam formulation is shown in Fig. 4.

Clonazepam has been determined by methods such as GC-MS in plasma (LOQ 0.25 ng/ml; RT 5.13 min)⁴ and hair

Table 1. Stability tests for clonazepam

<i>Post-processing stability test</i>						
	Reference values	Values after 47 h	Reference values	Values after 47 h	Reference values	Values after 47 h
	Low sample		Medium sample		High sample	
Mean (ng/ml)	1.46	1.41	8.70	8.85	43.90	45.70
CV (%)	3.60	5.20	2.20	2.70	3.00	2.50
Variation (%)	-3.60		1.70		4.10	
<i>Freeze-and-thaw stability test</i>						
	Reference values	Values after 4 cycles	Reference values	Values after 4 cycles	Reference values	Values after 4 cycles
	Low sample		Medium sample		High sample	
Mean (ng/ml)	1.41	1.48	7.72	7.38	37.10	40.20
CV (%)	3.10	2.90	6.70	7.90	3.80	4.60
Variation (%)	4.50		-4.40		8.50	
<i>Short-term stability test</i>						
	Reference values	Values after 7 h	Reference values	Values after 7 h	Reference values	Values after 7 h
	Low sample		Medium sample		High sample	
Mean (ng/ml)	1.41	1.40	7.72	8.45	37.10	40.30
CV (%)	3.10	4.90	6.70	9.60	3.80	11.30
Variation (%)	-1.10		9.50		8.70	
<i>Long-term stability test</i>						
	Reference values	Values after 25 days	Reference values	Values after 25 days	Reference values	Values after 25 days
	Low sample		Medium sample		High sample	
Mean (ng/ml)	1.55	1.65	8.29	9.39	43.50	44.90
CV (%)	5.20	11.9	3.30	11.40	3.70	1.90
Variation (%)	4.00		2.00		-1.50	

Table 2. Accuracy and precision data for clonazepam from the pre-study validation in human plasma

Sample ID	LOQ (0.5 ng/ml)			LQC (1.5 ng/ml)			MQC (9.0 ng/ml)			HQC (45.0 ng/ml)		
Intra-batch mean; $n = 8$	0.45	0.51	0.56	1.50	1.54	1.65	9.09	8.47	9.79	44.09	39.91	49.26
Intra-batch precision (CV %)	9.0%	11.4%	12.1%	6.7%	8.1%	8.6%	9.6%	6.9%	5.2%	9.0%	11.9%	9.5%
Intra-batch accuracy (%)	90.8%	101.6%	112.2%	100.0%	102.4%	109.8%	101.0%	94.1%	108.8%	98.0%	88.7%	109.5%
Inter-batch mean; $n = 3$	0.51			1.56			9.12			44.42		
Inter-batch precision (CV %)	13.8%			8.6%			9.3%			13.0%		
Inter-batch accuracy (%)	101.5%			104.1%			101.3%			98.7%		

Table 3. Mean pharmacokinetic parameters and statistical analysis of the clonazepam. The study had a single dose, randomized, two-way crossover design with a 21-day washout period between doses

Clonazepam pharmacokinetic parameters						
Formulation	Rivotril			Clonazepam		
Variable	T_{max} (h)	C_{max}^a (ng/ml)	AUC_{0-72h} ([ng h]/ml)	T_{max} (h)	C_{max} (ng/ml)	AUC_{0-72h} ([ng h]/ml)
N	33					
Mean	1.72	15.87	405.96	1.90	15.90	408.73
SD	1.32	4.87	78.07	0.88	4.68	66.92
SE	0.23	0.85	13.59	0.15	0.81	11.65
Min	0.67	8.65	225.35	1.00	9.51	295.31
Max	6.00	31.80	622.80	3.67	25.70	540.86
Clonazepam statistical analysis						
Test/Reference	Power	%	Geom. mean	90% CI	Intra-subject	CV%
C_{max} ($n = 33$)	0.98		100.3	91.59–109.85		21.7
AUC_{0-72h} ($n = 33$)	1.00		101.1	97.60–104.72		8.3
C_{max} ($n = 14$) – Male	0.74		106.58	90.58–125.41		22.6
AUC_{0-72h} ($n = 14$) – Male	1.00		101.91	95.45–108.81		9.5
C_{max} ($n = 19$) – Female	0.94		95.86	85.32–107.69		21.5
AUC_{0-72h} ($n = 19$) – Female	1.00		99.61	96.07–103.29		6.4

^a C_{max} mean is the mean of the concentration maximum, and the Fig. 4 shows the mean concentration for each sample time.

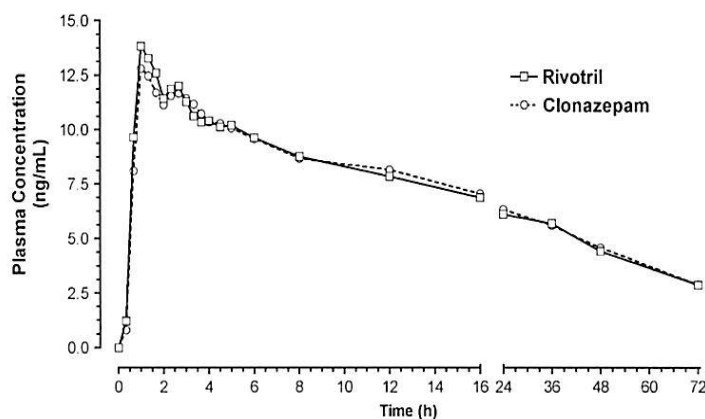


Figure 4. Mean plasma clonazepam concentrations versus time curves obtained after single oral administration of 2 mg of each clonazepam tablet formulation.

(20 pg/mg),⁶ HPLC in plasma (LOQ 5 ng/ml; RT 1.8 min)^{9,10} and LC-MS-MS in human hair (LOQ 0.12–2 pg/mg; RT 8–15 min),^{12,13} nail (LOQ 0.12 pg/mg; RT 8 min)¹³ and urine (LOQ 1 ng/ml; RT 15 min).¹² The method described here shows greater sensitivity (LOQ 0.5 ng/ml) and lower retention time 1.5 min for clonazepam (total run time of 3 min). Furthermore, this method involves a simple liquid–liquid extraction.

After oral administration of the clonazepam tablets to the volunteers, the peak plasma concentrations (C_{max}) of clonazepam and the time required to reach these (T_{max}) were similar to those reported in the literature² and equivalent between the formulations (Table 3). On the basis of an intra-subject CV of 21.7% for C_{max} and an intra-subject CV of 8.3% for AUC_{0-72h} , we proposed 22 volunteers for future studies. We demonstrate that it was possible to have bioequivalence

using 13–19 volunteers (Table 3), and that no difference between the genders was observed.

Since the 90% CI for C_{max} and AUC_{0-72h} ratios were all within the 80–125% interval proposed by the U.S. Food and Drug Administration Agency, it is concluded that the clonazepam test formulation effected by Ranbaxy Laboratories Ltd is bioequivalent to the Rivotril formulation for both the rate and the extent of absorption.^{14,15}

Acknowledgements

The bioequivalence trial was paid for by Ranbaxy Laboratories Ltd.

REFERENCES

1. Andre M, Boutroy MJ, Dubruc C, Thenot JP, Bianchetti G, Sola L, Vert P, Morselli PL. Clonazepam pharmacokinetics and

- therapeutic efficacy in neonatal seizures. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1986; **30**: 585.
2. Chauhan BL, Sane SP, Revankar SN, Rammamurthy L, Doshi B, Bhatt AD, Bhate VR, Kulkarni RD. Comparative bioavailability study of clonazepam after oral administration of two tablet formulations. *J. Assoc. Physicians, India* 2000; **48**: 985.
 3. Crevoisier C, Delisle MC, Joseph I, Foletti G. Comparative single-dose pharmacokinetics of clonazepam following intravenous, intramuscular and oral administration to healthy volunteers. *Eur. Neurol.* 2003; **49**: 173.
 4. Song D, Zhang S, Kohlhof K. Quantitative determination of clonazepam in plasma by gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B, Biomed. Appl.* 1996; **686**: 199.
 5. Badcock NR, Pollard AC. Micro-determination of clonazepam in plasma or serum by electron-capture gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1982; **230**: 353.
 6. Negrusz A, Bowen AM, Moore CM, Dowd SM, Strong MJ, Janicak PG. Deposition of 7-aminoclonazepam and clonazepam in hair following a single dose of Klonopin. *J. Anal. Toxicol.* 2002; **26**: 471.
 7. Salem AA, Barsoum BN, Izake EL. Spectrophotometric and fluorimetric determination of diazepam, bromazepam and clonazepam in pharmaceutical and urine samples. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 2004; **60**: 771.
 8. Maslanka A, Krzek J. Densitometric high performance thin-layer chromatography identification and quantitative analysis of psychotropic drugs. *J. AOAC Int.* 2005; **88**: 70.
 9. Bares IF, Pehourcq F, Jarry C. Development of a rapid RP-HPLC method for the determination of clonazepam in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004; **36**: 865.
 10. Nakamura M, Fukawa K, Sugiyama T, Katagiri Y. High-performance liquid chromatographic assay of clonazepam in human plasma using a non-porous silica column. *Biol. Pharm. Bull.* 2004; **27**: 893.
 11. Kronstrand R, Nystrom I, Josefsson M, Hodgins S. Segmental ion spray LC-MS-MS analysis of benzodiazepines in hair of psychiatric patients. *J. Anal. Toxicol.* 2002; **26**: 479.
 12. Cheze M, Villain M, Pepin G. Determination of bromazepam, clonazepam and metabolites after a single intake in urine and hair by LC-MS/MS. Application to forensic cases of drug facilitated crimes. *Forensic. Sci. Int.* 2004; **145**: 123.
 13. Irving RC, Dickson SJ. The detection of sedatives in hair and nail samples using tandem LC-MS-MS. *Forensic. Sci. Int.* 2006 (in press).
 14. Food and Drug Administration. In vivo bioequivalence guidances. *Pharmacopeial* 1993; **19**: 6501.
 15. Food and Drug Administration. Bioavailability and bioequivalence requirements; abbreviated applications; proposed revisions-FDA. Proposed rule. *Fed. Regist.* 1998; **63**: 64 222.