



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

**DETERMINAÇÃO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO
DE FÁRMACOS COM AÇÃO ANTI-HIPERTENSIVA
APLICADOS À CLÍNICA**

Roberto Fernandes Moreira

Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas - UNICAMP para
obtenção de título de Mestre em Clínica
Médica, área de concentração em
Ciências Básicas. Sob orientação do
Prof. Dr. Ney Carter do Carmo Borges.

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

M813d Moreira, Roberto Fernandes, 1979 -
 Determinação do perfil farmacocinético de fármacos
 com a ação anti-hipertensiva aplicados à clínica. /
 Roberto Fernandes Moreira. -- Campinas, SP : [s.n.],
 2011.

 Orientador : Ney Carter do Carmo Borges
 Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
 Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

 1. Losartan. 2. Hidroclorotiazida. 3.
 Farmacocinética. 4. Espectrometria de massa. 5.
 Bioequivalência. I. Borges, Ney Carter do Carmo. II.
 Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
 Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Determination of the pharmacokinetic profile of drugs with anti-hypertensive action applied to clinical

Palavra-chave em inglês:

Losartan

Hydrochlorothiazide

Mass spectrometry

Bioequivalence

Área de concentração: Ciências Básicas

Titulação: Mestre em Clínica Médica

Banca examinadora:

Ney Carter do Carmo Borges [Orientador]

Fabio Alessandro Proença Barros

Eduardo Arantes Nogueira

Data da defesa: 12-08-2011

Programa de Pós-Graduação: Faculdade de Ciências Médicas

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Roberto Fernandes Moreira

Orientador: Prof. Dr. Ney Carter do Carmo Borges

Membros:

1. Prof. Dr. Fabio Alessandro Proença Barros

2. Prof. Dr. Eduardo Arantes Nogueira

3. Prof. Dr. Ney Carter do Carmo Borges

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 12/08/2011

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação a minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e saúde para que eu pudesse realizar mais essa gratificante experiência.

Ao Dr. Ney Carter Carmo Borges, meu orientador, pelo crédito, oportunidade e orientação.

Aos membros da Banca examinadora, Prof. Dr. Fábio Alessandro Proença Barros e Prof. Dr. Eduardo Arantes Nogueira, pela presença e pelos ensinamentos compartilhados na defesa.

Aos meus queridos e amados pais Roberto Moreira e Teresa Fernandes Moreira, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida, pelo carinho, amor, dedicação, compreensão e principalmente pela educação recebida.

As Minhas irmãs Márcia Moreira Bergantin e Maira Moreira Araujo, por acreditarem e apoiarem o irmão caçula.

A minha esposa Daniela C. Z. Ferrari Moreira, pelo amor, paciência e ajuda nos momentos de dificuldades.

Aos meus sobrinhos Laíse, Hugo, Clara e Maria Luiza, por fazer um tio muito feliz.

Aos meus familiares, pelo incentivo e suporte.

A Synchronphar, em especial ao Dr. Ney Carter do Carmo Borges, Dr. Ronilson Agnaldo Moreno e Dr. Rogério Antonio de Oliveira e todos os demais membros da equipe pela receptividade e apoio.

A Chromanalysis, em especial a Dra. Maristela Andraus, Dra. Myriam Salvadori e Dra. Cristina Azevedo pelos conhecimentos compartilhados.

A todos os meus amigos, pelo companheirismo, força nos momentos difíceis e pelas risadas.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“A maior riqueza que um homem pode ter é o conhecimento”.

Roberto F. Moreira

RESUMO

O presente trabalho avaliou o perfil farmacocinético de dois medicamentos anti-hipertensivos, contendo associação de losartana 100 mg + hidroclorotiazida 25 mg na forma farmacêutica de comprimidos revestidos. Foi utilizado um método bioanalítico, apropriado e validado, de determinação simultânea de ambos fármacos para avaliação da biodisponibilidade relativa, de acordo com os critérios de bioequivalência. O estudo foi aberto, randomizado, cruzado, com dois tratamentos, duas seqüências e dois períodos. Os voluntários receberam, em cada período, a formulação teste ou a formulação referência. Vinte e oito voluntários adultos, sadios, de ambos os sexos foram incluídos. Amostras de sangue venoso foram coletadas em tempos pré-determinados. O plasma foi obtido por centrifugação a 3000 rpm por 10 min, e armazenado a -20 °C até a determinação das concentrações de losartana e hidroclorotiazida. O método bioanalítico utilizou a extração líquido-líquido, seguido pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massa (HPLC-MS-MS). Com base no intervalo de confiança de 90% dos índices individuais para C_{max} e ASC_{0-t} , estabelecidos pela ANVISA e FDA, concluiu-se que a formulação teste é bioequivalente a formulação referência Hyzaar[®] para extensão e taxa de absorção de losartana e hidroclorotiazida.

Palavras-chave: Losartana, Hidroclorotiazida, Farmacocinética, HPLC-MS-MS, Bioequivalência

ABSTRACT

This study evaluated the pharmacokinetic profile of two antihypertensive drugs containing a combination of 100mg losartan plus 25mg hydrochlorothiazide formulated in coated tablets. Appropriate and validated bioanalytical methods for simultaneous determination of both drugs were used to evaluate the relative bioavailability, based on the bioequivalence criteria. This was an open-label, randomized, crossover, two treatments, two sequences, two periods trial. The volunteers received in each period, either the test or the reference formulation. Twenty-eight healthy adults volunteers, of both sexes were enrolled. Venous blood samples were collected at predetermined times. The plasma was obtained by centrifugation at 3000 rpm for 10 min and stored at -20°C until the determination of concentrations of losartan and hydrochlorothiazide. The bioanalytical method used the liquid-liquid extraction, followed by High Performance Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry (HPLC-MS-MS). Based on the confidence interval of 90% of the individual indexes for C_{max} and AUC_{0-t} , established by ANVISA and FDA, it was concluded that the test formulation is bioequivalent to the reference formulation Hyzaar® for the extent and rate of absorption of losartan and hydrochlorothiazide.

Keywords: Losartan, Hidrochlorotiazide, Pharmacokinetics, HPLC-MS-MS, Bioequivalence

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação da pressão arterial de acordo com a medida casual no consultório	65
Tabela 2: Anti-hipertensivos comercialmente disponíveis no Brasil.	67
Tabela 3: Anti-hipertensivos comercialmente disponíveis no Brasil.	68
Tabela 4: Eventos adversos dos medicamentos – porcentagem das pessoas com um ou mais sintomas atribuídos ao tratamento*, de acordo com a classe e com a dose, em estudos clínicos.	71
Tabela 5: Definição da seqüência de tratamento dos voluntários.....	112
Tabela 6: Amostragem dos dados da histórica clínica pré-estudo.....	114
Tabela 7: Relação dos exames laboratoriais agregados ao processo de seleção dos voluntários.	115
Tabela 8: Cronograma das coletas das amostras.	121
Tabela 9: Equipamentos utilizados no estudo analítico.	123
Tabela 10: Padrões utilizados para validação e quantificação do estudo.....	123
Tabela 11: Reagentes utilizados para validação e quantificação do estudo.....	124
Tabela 12: Preparação dos calibradores em plasma (curva de calibração).	126
Tabela 13: Condições cromatográficas utilizadas na validação e quantificação do estudo.	127
Tabela 14: Condições de ionização utilizadas na metodologia analítica.	128
Tabela 15: Parâmetros da técnica bioanalítica definidos para metodologia empregada.	129
Tabela 16: Possíveis resultados do teste de supressão de íons e ações decorrentes.	131
Tabela 17: Dados estatísticos descritivos da população.	145
Tabela 18: Resumo de exames laboratoriais pré-estudo (análise bioquímica). .	147
Tabela 19: Resumo de exames laboratoriais pré-estudo (Análise Hematológica).	148
Tabela 20: Resumo de exames laboratoriais pré-estudo (análise parasitológica).	149

Tabela 21: Resumo de exames laboratoriais pré-estudo (análise sorológica)....	149
Tabela 22: Resumo de exames laboratoriais pré-estudo (análise de urina).....	150
Tabela 23: Resumo de exames laboratoriais pós-estudo (análise bioquímica)..	151
Tabela 24: Resumo de exames laboratoriais pós-estudo (análise hematológica).	152
Tabela 25: Resumo de exames laboratoriais pós-estudo (análise de urina).	153
Tabela 26: Histórico de confinamento dos voluntários.	154
Tabela 27: Administração da medicação.	155
Tabela 28: Eventos adversos.	156
Tabela 29: Principais resultados apresentados pela validação da metodologia analítica.	158
Tabela 30: Equações da curvas de calibração e do respectivo coeficiente de correlação linear (R).	167
Tabela 31: Equações da curvas de calibração e do respectivo coeficiente de correlação linear (R).	168
Tabela 32: Estabilidade dos analitos em matriz biológica.	174
Tabela 33: Parâmetros farmacocinéticos para o voluntário 05 da losartana.	175
Tabela 34: Parâmetros farmacocinéticos para o voluntário 02 da hidroclorotiazida.	176
Tabela 35: Média, IC (90%), e conclusão para a razão das médias de C_{max} , e ASC_{0-t} . Dados transformados em logaritmo natural, losartana.	178
Tabela 36: Média, IC (90%), e conclusão para a razão das médias de C_{max} , e ASC_{0-t} . Dados transformados em logaritmo natural, hidroclorotiazida.	178
Tabela 37: Atrasos de pontos de coleta.	180
Tabela 38: ANOVA para $\ln(C_{max})$ da losartana.	180
Tabela 39: ANOVA para $\ln(ASC_{0-t})$ da losartana.	181
Tabela 40: ANOVA para $\ln(C_{max})$ da hidroclorotiazida.	181
Tabela 41: ANOVA para $\ln(ASC_{0-t})$ da hidroclorotiazida.	181
Tabela 42: Médias e IC (90%) dos parâmetros farmacocinéticos para losartana.	182

Tabela 43: Médias e IC (90%) dos parâmetros farmacocinéticos para hidroclorotiazida.	183
--	-----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Curva farmacocinética de concentração plasmática <i>versus</i> tempo.....	52
Figura 2: Níveis plasmáticos médios de fenacetina, em voluntários sadios, após administração de comprimidos de doses idênticas fabricados com lotes de fenacetina com diâmetros médios de partícula distintos (1 - >250 μ ; 2 - 165 μ ; 3 - <75 μ ; 4 - < 75 μ + 0,1% Tween 80).....	56
Figura 3: Níveis plasmáticos médios de cloranfenicol, em voluntários sadios, após administração de doses iguais de suspensões que continham diferentes proporções dos polimorfos α e β (1 – 0% β e 100% α ; 2 – 50% β e 50% α ; 3 – 100% β e 0% α).....	57
Figura 4: Taxas de mortalidade por DCV e suas diferentes causas no Brasil, em 2007 (AVE = acidente vascular encefálico; DIC = doença isquêmica do coração; HAS = hipertensão arterial sistêmica)	64
Figura 5: Estrutura molecular da Losartana.	75
Figura 6: Componentes e os efeitos do sistema renina-angiotensina.	76
Figura 7: Estrutura molecular do Hidroclorotiazida.....	79
Figura 8: Ação dos tiazídicos no túbulo distal.	80
Figura 9: Princípio da extração líquido-líquido. No caso, A = fármaco, B = plasma, C = reagente orgânico.....	83
Figura 10: Injetor de Válvula de Amostragem (75).	85
Figura 11: Sistema cromatográfico utilizado para as análises, composto por um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) acoplado a um espectrômetro de massa (MS/MS).....	87
Figura 12: Esquema da espectrometria de massa acoplado a espectrometria de massa (sinônimos: espectrometria de massa em tandem EM-EM e EM2). Ilustra uma das formas de realização da técnica, neste caso empregando sistema de analisadores de massa em configuração.	88
Figura 13: Ionização por electrospray (ESI).	92
Figura 14: Parâmetros de validação para uma metodologia analítica.....	96
Figura 15: Gráfico da pressão arterial em função dos tempos de coleta.	157

Figura 16: Cromatogramas representativos para amostras de branco normais dos analitos e os seus respectivos padrões internos.....	160
Figura 17: Picos representativos para as soluções dos analitos e os seus respectivos padrões internos.....	161
Figura 18: Picos representativos de uma injeção da fase móvel, dos analitos e dos seus respectivos padrões internos.	162
Figura 19: Cromatogramas representativos do plasma branco que demonstra a ausência de coeluição de interferentes para o analito (losartana) e o padrão interno (valsartana).	163
Figura 20: Cromatogramas representativos do plasma branco demonstra a ausência de coeluição de interferentes para o analito (hidroclorotiazida) e o padrão interno (clortalidona).....	164
Figura 21: Cromatogramas representativos para o teste de <i>carry over</i> , sendo o primeiro referente à injeção da solução de losartana e seguido da injeção do branco.	165
Figura 22: Cromatogramas representativos para o teste de <i>carry over</i> , sendo o primeiro referente à injeção da solução de hidroclorotiazida e seguido da injeção do branco.	165
Figura 23: Representação gráfica das linearidades para losartana.	166
Figura 24: Representação gráfica das linearidades para hidroclorotiazida.	168
Figura 25: Resultados obtidos das análises intraensaio dos controlos de qualidade e do LQ para matriz biológica (plasma).....	169
Figura 26: Resultados obtidos das análises interensaio dos controlos de qualidade e do LQ para matriz biológica (plasma).....	170
Figura 27: Resultados obtidos das análises intraensaio dos controlos de qualidade e do LQ para matriz biológica (plasma).....	171
Figura 28: Resultados obtidos das análises interensaio dos controlos de qualidade e do LQ para matriz biológica (plasma).....	172
Figura 29: Resultados obtidos para a recuperação do fármaco e do padrão interno.	173

Figura 30: Resultados obtidos para a recuperação do fármaco e do padrão interno.	174
Figura 31: Gráfico de concentração <i>versus</i> tempo.	175
Figura 32: Gráfico de concentração <i>versus</i> tempo.	176
Figura 33: Curva média da concentração plasmática de dois medicamentos (teste e referência), baseada em 28 voluntários para losartana.	177
Figura 34: Curva média da concentração plasmática de dois medicamentos (teste e referência), baseada em 28 voluntários para hidroclorotiazida.	177

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Antagonistas dos Canais de Cálcio
ANOVA	Análise da Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização Química à Pressão Atmosférica
ARA II	Antagonistas do Receptor da Angiotensina II
ASC_{0-t}	Área sob a curva de <i>concentração vs. tempo</i> , do tempo 0 (zero) ao tempo da última concentração. Neste estudo, está expressa em ng/mL x h
ASC_{0-inf}	Área sob a curva de concentração da droga <i>versus</i> tempo do tempo 0 (zero) extrapolada ao infinito. Neste estudo, está expressa em ng/mL x h
AVC	Acidente Vascular Cerebral
AVE	Acidente Vascular Encefálico
BRA II	Bloqueadores do Receptor AT1 da Angiotensina II
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa

C_{max}	Maior concentração alcançada, com base nos dados experimentais. Neste estudo, está expressa em ng/ml;
CGAS-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa
CME	Concentração Média Experimental
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CQ	Controle de Qualidade
CRM	Modelo da Carga Residual
CT	Concentração Teórica
CV	Coeficiente de Variação
DATASUS	Departamento de Informática do SUS/MS
DCB	Denominação Comum Brasileira
DCV	Doenças Cardiovasculares
DIC	Doença Isquêmica do Coração
DP	Desvio padrão

ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ESI	Ionização por <i>Electrospray</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HCTZ	Hidroclorotiazida
HPLC-MS-MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massa
IC	Intervalo de Confiança
ICH	Conferência Internacional de Harmonização
IECA	Inibidores da Enzima Conversora da Angiotensina
IEM	Modelo da Evaporação do Íon
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LD	Limite de Detecção
LLE	Extração Líquido-Líquido

LQ	Limite de Quantificação
LOS	Losartan
MS	Ministério da Saúde
OMC	Organização Mundial do Comércio
PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão Arterial Distólica
PAS	Pressão Arterial Sistólica
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RF	Radio Frequência
SRA	Sistema Renina - Angiotensina
SUS	Sistema Único de Saúde
TGI	Trato Gastro Intestinal
T $\frac{1}{2}$	Meia-vida de eliminação, calculada com $\ln(2)/k_e$
T_{max}	Tempo correspondente à C _{max}

TRIPS*Trade-Related Aspects of Intellectual Property Rights*

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE FIGURAS	xxi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xxvii
1. INTRODUÇÃO	47
1.1 Biodisponibilidade.....	50
1.2 Bioequivalência e equivalência farmacêutica	54
1.3 Genéricos	58
1.4 Hipertensão	62
1.4.1 Medicamentos anti-hipertensivos	66
1.5 Fármacos de interesse no presente trabalho	74
1.5.1 Losartana.....	74
1.5.1.1 Mecanismo de ação	75
1.5.1.2 Farmacocinética	77
1.5.1.3 Indicações e contra-indicações	78
1.5.2 Hidroclorotiazida	78
1.5.2.1 Mecanismo de ação	79
1.5.2.2 Farmacocinética	80
1.5.2.3 Indicação e contra-indicação	81
1.6 Extração de fármacos de matriz biológica	82
1.7 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	84
1.8 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de espectrometria de massa (LC-MS/MS)	86
1.9 Ionização por electrospray (ESI)	91
1.10 Efeito Residual (<i>Carry Over</i>).....	94
1.11 Efeito de matriz (supressão iônica)	93
1.12 Validação do método analítico.....	93

1.12.1 Seletividade / especificidade.....	96
1.12.2 Linearidade	97
1.12.3 Sensibilidade	98
1.12.4 Precisão.....	99
1.12.5 Exatidão.....	100
1.12.6 Recuperação	101
1.12.7 Robustez.....	101
1.13 Etapa estatística	102
1.13.1 Desenhos experimentais para estudos de biodisponibilidade relativa / bioequivalência	103
1.3.1.1 Delineamento cruzado (<i>crossover</i>)	103
2. OBJETIVO	105
3. MATERIAIS E MÉTODOS	109
3.1 Descrição do desenho do estudo	111
3.2 Equivalência farmacêutica.....	113
3.3 Etapa clínica	113
3.3.1 População do estudo e dados clínicos para seleção e recrutamento	114
3.3.2 Critérios de inclusão do voluntário	115
3.3.3 Critérios de exclusão do voluntário.....	116
3.3.3.1 Problemas relacionados com a droga.....	116
3.3.3.2 Doenças ou problemas de saúde.....	116
3.3.3.3 Hábitos e dependências.....	117
3.3.3.4 Condições encontradas nos dias ou meses que antecedem o estudo:.....	117
3.3.3.5 Outras condições	118

3.3.4 Critérios de retirada do voluntário	118
3.3.5 Coleta de amostras.....	120
3.4 Etapa analítica.....	122
3.4.1 Equipamentos e acessórios.....	123
3.4.2 Padrões	123
3.4.3 Reagentes	124
3.4.4 Amostras biológicas.....	124
3.4.5 Preparo das soluções	124
3.4.5.1 Soluções-padrão estoque	124
3.4.5.2 Soluções-padrão de uso	124
3.4.5.3 Fase móvel	125
3.4.6 Preparo dos calibradores em plasma	125
3.4.7 Procedimento de extração	126
3.4.8 Condições cromatográficas	127
3.4.9 Condições de ionização	127
3.4.10 Critérios de aceitação da corrida analítica.....	128
3.4.11 Método bioanalítico.....	129
3.4.12 Validação da Metodologia Analítica.....	129
3.4.12.1 Parâmetros a serem validados.....	129
3.4.12.2 Procedimentos da validação analítica.....	130
3.4.12.2.1 Especificidade	130
3.4.12.2.2 Supressão iônica.....	131
3.4.12.2.3 Contaminação entre amostras ou arraste (<i>carry over</i>)	
.....	132
3.4.12.2.4 Linearidade	132
3.4.12.2.5 Precisão e exatidão	133
3.4.12.2.7 Limite de quantificação	133
3.4.12.2.8 Recuperação	134
3.4.12.3 Estabilidade.....	135

3.4.12.3.1 Preparo das amostras do teste de estabilidade e dos CQ's controle (CQ-Ctrl)	135
3.4.12.3.2 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento (CQ-CCD)	136
3.4.12.3.3 Estabilidade de curta duração (CQ-CD)	136
3.4.12.3.4 Estabilidade de longa duração (CQ-LD)	137
3.4.12.3.5 Estabilidade pós-processamento na bandeja do injetor (CQ-PP)	137
3.4.12.3.6 Estabilidade das soluções padrão do analito e do PI	138
3.4.12.3.7 Análise dos resultados.....	138
3.4.12.4 Quantificação das amostras.....	138
3.4.12.5 Validação das corridas analíticas.....	139
3.4.12.5.1 Critérios de aceitação	139
3.5 Etapa estatística	139
3.5.1 Critérios de decisão de bioequivalência	140
3.5.2 Análise de variância.....	140
3.5.3 Poder	141
3.5.4 Intervalo de Confiança de 90%.....	141
4. RESULTADOS	143
4.1 Etapa clínica	145
4.1.1 Pressão sistólica e diastólica.....	157
4.2 Etapa analítica.....	157
4.2.1 Validação da Metodologia Analítica.....	159
4.2.1.1 Especificidade	159
4.2.1.1.1 Supressão iônica	162
4.2.1.1.2 Carry over.....	165
4.2.1.2 Linearidade	166
4.2.1.2.1 Losartana.....	166
4.2.1.2.2 Hidroclorotiazida	167
4.2.1.3 Precisão e Exatidão	169

4.2.1.3.1 Losartana.....	169
4.2.1.3.2 Hidroclorotiazida	170
4.2.1.4 Recuperação.....	172
4.2.1.4.1 Losartana.....	172
4.2.1.4.2 Hidroclorotiazida	173
4.2.1.5 Estabilidades.....	174
4.2.2 Quantificação das amostras	175
4.3 Etapa estatística	178
4.3.1 Teste de variabilidade – Pitman-Morgan’s Adjusted F Test	179
4.3.1.1 Teste para $\ln(C_{\max})$ de Losartana.....	179
4.3.2 Amostragem	180
4.3.3 Análise de variância.....	180
4.3.4 Parâmetros Farmacocinéticos	182
5. DISCUSSÃO	185
6. CONCLUSÃO	195
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	199
8. ANEXOS	215

1. INTRODUÇÃO

O perfil farmacocinético de medicamentos, também chamado de estudo de biodisponibilidade, é um estudo que avalia a quantidade de fármaco, contida em uma fórmula farmacêutica, que chega à circulação sistêmica e da velocidade na qual ocorre esse processo. Na literatura, os primeiros estudos sobre absorção de compostos exógenos começaram a ser publicados no início do século XX, em 1945 foram descritos dados importantes sobre a absorção de vitaminas a partir de formas farmacêuticas. Tais estudos deram origem aos termos disponibilidade fisiológica, ou biodisponibilidade, referindo-se a quantidade de fármaco disponível no organismo para gerar efeito terapêutico (1).

Especialmente nas décadas de 1960 e 1970, foram constatados vários casos de ineficácia clínica e intoxicações com o uso de medicamentos em humanos, o que deu origem a estudos envolvendo universidades e autoridades sanitárias para o estabelecimento de novos critérios para o registro de medicamentos, incluindo-se estudos de perfis farmacológicos. Estes estudos são empregados principalmente para determinação da biodisponibilidade absoluta de medicamentos inovadores, avaliação de bioequivalência entre medicamentos, alterações nas formulações de medicamentos e desenvolvimento de medicamentos com liberação modificada (2).

Para regulamentação dos estudos envolvendo seres humanos, o primeiro documento internacional que trata de princípios éticos a serem observados durante a execução de uma pesquisa clínica é o Código de Nuremberg, de 1947, segundo o qual “O consentimento voluntário do ser humano é absolutamente essencial” (3).

Em 1964, a Associação Médica Mundial, aprovou em Helsinque, um documento com princípios para proteção de indivíduos em pesquisa biomédica. Foram introduzidos conceitos de responsabilidades do investigador, comitês de ética e consentimento livre e esclarecido. Com revisões periódicas posteriores (1975, 1983, 1989, 1996, 2000 e 2008), a Declaração de Helsinque constitui-se, atualmente, no documento universal que estabelece diretrizes para a realização de estudos com vistas ao desenvolvimento científico e tecnológico envolvendo seres humanos. No centro da declaração está a afirmação de que "o bem estar do ser humano deve ter

prioridade sobre os interesses da ciência e da sociedade". Também fornece atenção especial à importância do consentimento livre e esclarecido por escrito (4).

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

No Brasil, a implantação de normas definindo a pesquisa em seres humanos é proveniente da Resolução nº 01/88. Em outubro de 1996, esta foi revogada pela resolução nº 196/MS/CNS, sendo posteriormente concluída pela Resolução nº 251/97. Por meio destas Resoluções, o Ministério da Saúde define diretrizes e normas objetivando promover a proteção de sujeito de pesquisas envolvendo seres humanos. A Resolução 196/96 - Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos, é fundamentada nos quatro referenciais básicos da bioética, autonomia, não maleficência, beneficência e justiça, e traz à comunidade científica, bem como à sociedade brasileira, reflexões sobre os aspectos éticos da pesquisa envolvendo seres humanos e estabelece as diretrizes para a implantação de um sistema de revisão ética em pesquisa, composto por Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), do Conselho Nacional de Saúde. Assim, a Resolução 196/96, bem como as demais que a complementam, traz ao pesquisador as orientações para que o mesmo possa desenvolver, de forma ética, pesquisas envolvendo seres humanos (5).

1.1 Biodisponibilidade

O termo biodisponibilidade refere-se à velocidade e a extensão na qual uma molécula ativa é absorvida e torna-se disponível no seu sítio de ação da droga. A determinação da biodisponibilidade é realizada, empregando-se estudos farmacocinéticos, que compreendem a administração do medicamento ao sujeito de pesquisa e a coleta de fluidos biológicos em tempos predeterminados, com posterior

quantificação do fármaco empregando método bioanalítico desenvolvido e validado para esta finalidade (6, 7).

Na maioria dos casos, os estudos de biodisponibilidade, são utilizados empregando-se a determinação quantitativa do fármaco e/ou metabólito em sangue total, plasma, soro ou urina, em função do tempo, modalidade considerada mais adequada, precisa e exata (1, 8).

A biodisponibilidade é definida como a extensão do fármaco absorvido e a velocidade do processo de absorção. O cálculo da biodisponibilidade é realizado utilizando-se os seguintes parâmetros farmacocinéticos:

A área sob a curva da concentração plasmática *versus* tempo (ASC_{0-t}) corresponde ao principal parâmetro relativo à biodisponibilidade, e relaciona-se com a quantidade do fármaco absorvida do tempo zero ao tempo t , onde t é a última coleta determinada experimentalmente. Esta é uma medida da extensão da absorção ou da exposição do organismo ao fármaco após a administração da dose.

A concentração máxima atingida no plasma (C_{max}) representa concentração mais elevada do fármaco, atingido na circulação sangüínea após administração de um fármaco. Relaciona-se a intensidade da resposta farmacológica. O C_{max} ideal deve estar dentro da janela terapêutica (faixa plasmática aceitável na qual os resultados terapêuticos são positivos). O tempo correspondente à concentração máxima atingida no plasma (T_{max}): é tempo correspondente para que o fármaco atinja a concentração máxima (C_{max}). A meia vida de eliminação do fármaco ($t_{1/2}$) representa o tempo em que a concentração do fármaco no plasma é reduzida à metade.

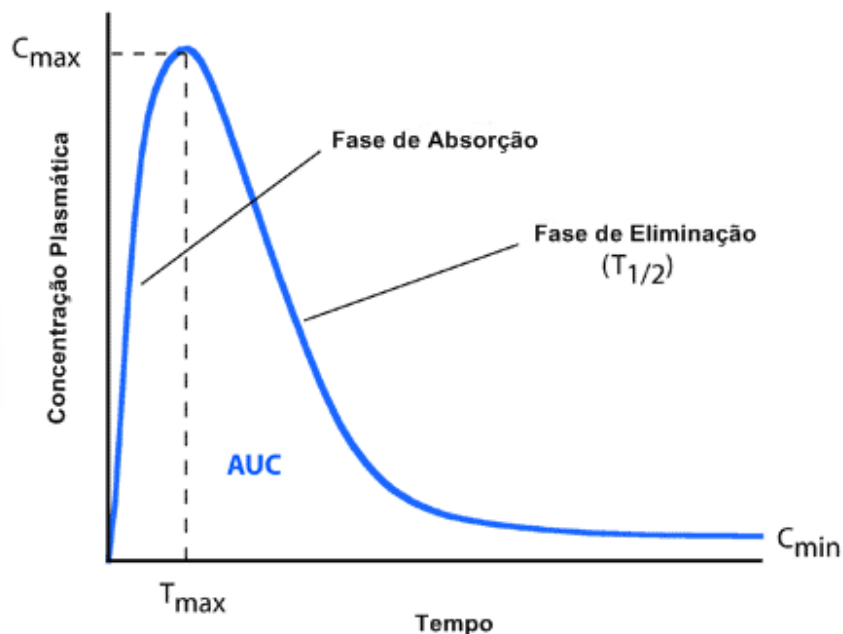


Figura 1: Curva farmacocinética de concentração plasmática *versus* tempo.

Por definição, a biodisponibilidade de um medicamento administrado sob a forma de solução injetável intravenosa é total ou 100%, uma vez que toda a dose administrada está disponível para exercer o efeito, enquanto a administração de um medicamento por qualquer outra via implica em barreiras potenciais que podem comprometer o aproveitamento total da dose. Dessa forma, medicamentos inovadores desenvolvidos para administração extravascular, requerem a realização de um ensaio para determinação de sua biodisponibilidade absoluta, ou fração efetivamente absorvida, adotando-se como referência, quando possível, o medicamento na mesma dose, administrado pela via intravascular (9).

A biodisponibilidade relativa corresponde à comparação da biodisponibilidade dos medicamentos administrados por via extravascular. Durante a década de 1960, o desenvolvimento de técnicas analíticas possibilitou a elaboração de métodos sensíveis o suficiente para a quantificação de drogas ou metabólitos, inicialmente na urina, e posteriormente no plasma, o que permitiu a avaliação e comparação de biodisponibilidade de diferentes formulações em voluntários, bem como a demonstração de que diferenças significativas entre estas podem ocorrer (2, 8).

Ensaio de biodisponibilidade relativa são requeridos para o registro de medicamentos genéricos, empregando-se o critério de aceitação de bioequivalência. Além disso, podem ser solicitado pelo órgão sanitário, mediante significativa alteração na fórmula e ou processo de fabricação do produto registrado (10, 11, 12).

Entretanto, quando uma indústria farmacêutica pretende, lançar no mercado, um medicamento genérico de um inovador já comercializado, após o vencimento dos direitos relativos à patente, deve-se realizar inicialmente o desenvolvimento farmacotécnico, que possa comprovar sua equivalência farmacêutica (*in vitro*), antes de submeter o medicamento ao teste de bioequivalência. (10, 13).

A biodisponibilidade de uma formulação farmacêutica pode ser influenciada por fatores como (14, 15, 16):

- Relacionados ao indivíduo: idade, sexo, peso corporal e fatores fisiológicos associados.
- Relacionados ao medicamento (fármaco, excipientes e técnica de fabricação): tamanho de partícula, forma polimórfica, presença de solvato ou hidrato, natureza química, solubilidade, tipo e quantidade de excipientes, método de preparação, tipo de granulação, tempo de mistura ou agitação, condições de secagem, velocidade de compressão e instabilidade.

No caso dos fatores relacionados ao indivíduo, a máxima redução de sua influência é obtida através do bom planejamento e execução do ensaio de biodisponibilidade, ou seja, por meio de critérios de inclusão e exclusão bem definidos, seleção de um grupo homogêneo de voluntários para o estudo e emprego de um desenho experimental adequado.

Já para os fatores relacionados ao medicamento, é indispensável à realização de estudos de pré-formulação e aumento de escala para obtenção de uma formulação estável, a ser administrada através de uma forma farmacêutica (ex: comprimidos, cápsulas, etc.) e uma via adequada ao objetivo terapêutico. Assim o profissional envolvido no desenvolvimento farmacotécnico, deve conhecer amplamente as características físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas

do fármaco, selecionando os adjuvantes farmacotécnicos mais adequados, além das melhores possibilidades para as operações unitárias envolvidas na fabricação (17).

1.2 Bioequivalência e equivalência farmacêutica

Os centros de bioequivalência e equivalência farmacêutica são laboratórios analíticos voltados à realização de estudos de determinação de biodisponibilidade, bioequivalência e equivalência farmacêutica entre medicamentos de referência e produtos candidatos ao registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária, nas categorias de medicamento genérico ou medicamento similar. (18).

A introdução dessas categorias de medicamentos no arsenal nacional veio acompanhada de uma lei que regulamenta o controle de qualidade desses medicamentos, estabelecendo a comprovação da equivalência farmacêutica e bioequivalência entre o medicamento teste e o medicamento referência, por meio de um laudo técnico expedido por um laboratório habilitado pela ANVISA (19).

A equivalência farmacêutica – estudo *in vitro* – consiste na comparação empírica do medicamento teste com o medicamento referência avaliando qualitativamente e quantitativamente a concentração, o princípio ativo, a forma farmacêutica, a indicação e a via de administração dos mesmos. Entretanto, a equivalência farmacêutica não comprova, necessariamente, equivalência terapêutica, tendo em vista que as diferenças nos excipientes ou nos processos de fabricação podem conduzir às diferenças de desempenho do produto (18).

A biodisponibilidade está relacionada à velocidade e à extensão de absorção de um princípio ativo administrado por via extravascular, a um indivíduo, envolvendo também a eficácia clínica do medicamento (20).

A bioequivalência – estudo *in vivo* – consiste em comparações qualitativas e quantitativas do desempenho de medicamentos teste e referência, quanto ao princípio ativo e biodisponibilidade, quando estudados sobre um mesmo desenho experimental. São considerados bioequivalentes os medicamentos que ao serem administrados na mesma concentração molar e condições experimentais, não

apresentarem diferença estatisticamente significativas em relação à biodisponibilidade (20). Os ensaios clínicos seguem princípios éticos e científicos de experimentação, e são os responsáveis pela eficácia e segurança dos fármacos e medicamentos (21).

Para avaliação da bioequivalência, é necessário calcular as razões dos parâmetros relacionados à extensão e a velocidade de absorção, representados como se segue:

- ✓ Extensão ou quantidade absorvida: $ASC_{0-t \text{ (teste)}} / ASC_{0-t \text{ (referencia)}}$;
- ✓ Velocidade da absorção: $C_{m\acute{a}x \text{ (teste)}} / C_{m\acute{a}x \text{ (referencia)}}$.

Sobre essas razões são calculados os intervalos de confiança 90% (IC 90%).

Dois medicamentos são considerados bioequivalentes, quando os intervalos de confiança 90% (IC 90%) das razões $\log ASC_{0-t \text{ (teste)}} / \log ASC_{0-t \text{ (referencia)}}$ e $\log C_{m\acute{a}x \text{ (teste)}} / \log C_{m\acute{a}x \text{ (referencia)}}$ encontram-se entre 80 e 125%.

Esse critério é adotado internacionalmente para aceitação da bioequivalência, e evoluiu a partir de regras mais simplificadas, que não incluíam a construção de um intervalo de confiança a partir dos resultados obtidos (7, 11, 22).

Tanto no Brasil como nos Estados Unidos, tal critério é adotado para o registro de genéricos de todas as classes terapêuticas, inclusive os medicamentos de estreita faixa terapêutica. No Canadá, o critério para registro de genéricos de fármacos críticos é mais exigente, uma vez que em certos casos adota o IC 95% ou faixa de variação menos ampla (90 a 111%, por exemplo). Países europeus também podem adotar critérios diferenciados em alguns casos (7, 11, 23, 24).

Entretanto, a empresa inovadora também realiza estudos de biodisponibilidade relativa com critérios de aceitação de bioequivalência, para definir características finais do medicamento durante o processo de desenvolvimento farmacotécnico e avaliação da eficácia clínica e de segurança. No início do desenvolvimento, quando não há evidências clínicas suficientes, normalmente utiliza-se uma formulação e uma forma farmacêutica que serão posteriormente ajustadas. Por exemplo, é possível que uma empresa realize os estudos clínicos iniciais com uma formulação em cápsula, mas que posteriormente produza a forma farmacêutica

comprimido, por questões de estabilidade físico-química. Assim, será necessário realizar um teste de bioequivalência entre as duas formulações/formas farmacêuticas (inicial e final) para estabelecer as especificações definitivas do produto. (8, 25)

A importância da realização de ensaios de bioequivalência, para verificação da equivalência terapêutica entre formulações farmacêuticas, é facilmente elucidada por alguns exemplos, mostrados através das Figuras 2 e 3 a seguir, que comprovam a influência dos fatores relacionados à forma farmacêutica na biodisponibilidade do fármaco, o que pode resultar em diferenças clinicamente significativas, de eficácia e segurança entre medicamentos com a mesma indicação terapêutica e mesmo regime de dosagem, que não possuem testes clínicos comparativos (14).

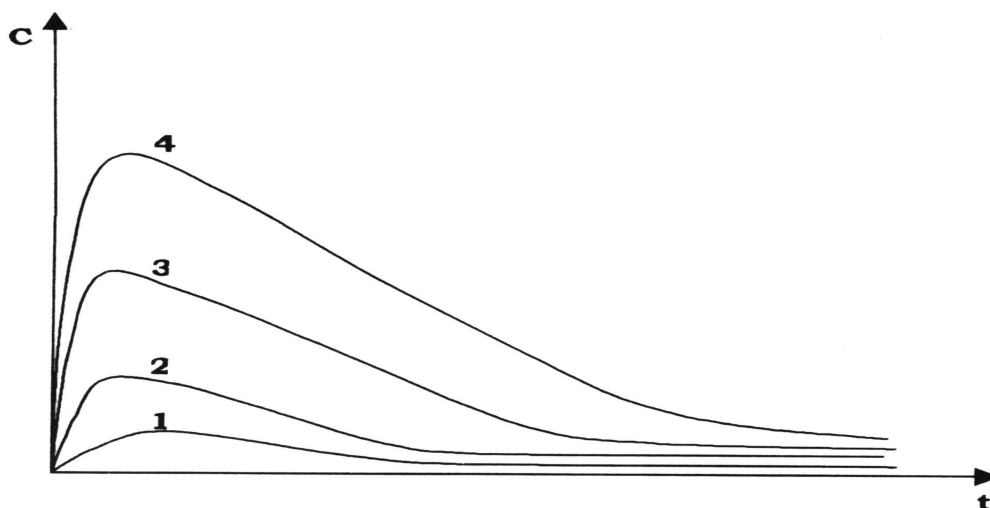


Figura 2: Níveis plasmáticos médios de fenacetina, em voluntários sadios, após administração de comprimidos de doses idênticas fabricados com lotes de fenacetina com diâmetros médios de partícula distintos (1 - $>250\mu$; 2 - 165μ ; 3 - $<75\mu$; 4 - $<75\mu$ + 0,1% Tween 80).

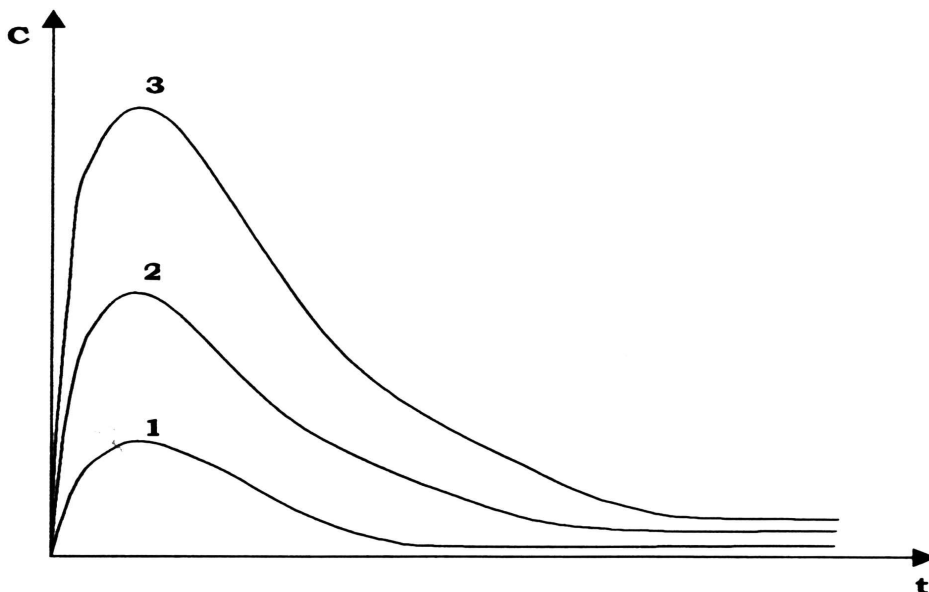


Figura 3: Níveis plasmáticos médios de cloranfenicol, em voluntários sadios, após administração de doses iguais de suspensões que continham diferentes proporções dos polímeros α e β (1 – 0% β e 100% α ; 2 – 50% β e 50% α ; 3 – 100% β e 0% α).

O estudo da dissolução de fármacos, é utilizado para verificar a velocidade pela qual o fármaco é liberado e solubilizado nas condições experimentais definidas (pH, agitação, temperatura), em intervalos de tempo pré – estabelecidos.

A absorção do fármaco, não consiste apenas da etapa de dissolução, depende também da permeabilidade do mesmo na mucosa gastrointestinal. Esta última característica não é avaliada em um estudo de dissolução *in vitro*. A questão é ainda mais crítica para fármacos, onde o fator limitante da absorção é a permeabilidade. Além disso, estudos de permeabilidade *in vitro* de fármacos, ainda são limitados e a maioria deles baseia-se na sua biodisponibilidade *in vivo* (26).

Segue abaixo, algumas das limitações do perfil de dissolução como ferramenta para prever o desempenho do medicamento *in vivo*:

- ✓ Os tampões utilizados como meios de dissolução nos estudos de perfis de dissolução não são fiéis em relação à reprodutibilidade das condições do trato gastrointestinal (TGI) *in vivo*. Fatores relevantes a considerar são: pH,

enzimas digestivas, variabilidade inter-individual, presença de alimentos, cada local do TGI possui um pH diferente (impossível de reproduzir *in vitro*);

- ✓ Não analisa a permeabilidade do fármaco na mucosa gastrointestinal;
- ✓ Não reproduz os movimentos peristálticos;
- ✓ Não considera variabilidade intra e inter-individual.

1.3 Genéricos

Os medicamentos genéricos surgiram, inicialmente, nos países onde existiam leis de patentes para medicamentos.

No Canadá em 1970, o “*Drugs Directorate*” do “*Canadian Federal Department of Health and Welfare*” começou a utilizar bioequivalência como uma medida para aprovar o registro de um medicamento genérico.

Nos Estados Unidos, em 1977, o *Food and Drug Administration* (FDA) foi o primeiro órgão regulador a editar as primeiras diretrizes para a realização de estudos de bioequivalência. Em 1984, normas foram estabelecidas pelo “*Drug Price Competition and Patent Restoration Act*”, conhecido com “*Hatch-Waxman Act*”, que estabeleceu mecanismos mais simples de registro para versões genéricas de todos os medicamentos aprovados até 1962, com a imposição de que apresentassem informações sobre sua bioequivalência e processo produtivo, entre outras. Esta legislação também permitiu que os fabricantes de medicamentos inovadores ampliassem sua proteção de patente, para um máximo de cinco anos para novos produtos. Isto significava que estes fabricantes poderiam compensar o tempo perdido, enquanto os produtos estavam sendo analisados para aprovação pelo FDA (27).

Nos Estados Unidos, Canadá, Inglaterra e Alemanha, os genéricos hoje representam mais de 60% do mercado de medicamentos. Na América Latina, esse processo é mais recente devido, grande parte dos países, não ter incluído patentes de medicamentos em suas legislações até 1994, quando foi aprovado o acordo

Trade-Related Aspects of Intellectual Property Rights (TRIPS) na Organização Mundial do Comércio (OMC) (28).

A obrigatoriedade da utilização da denominação genérica do princípio ativo, nas embalagens de medicamentos, segundo a Denominação Comum Brasileira (DCB), além da marca comercial (nome fantasia ou marca registrada) existe no Brasil desde o início da década de 1980 (14).

Em 5 de abril de 1993, a publicação do decreto 793/93 estabeleceu a obrigatoriedade da utilização da denominação genérica, na embalagem do medicamento, empregando letras com tamanho três vezes superior ao das utilizadas para a marca comercial. Esse decreto tinha como objetivo central o estímulo à competição no mercado de medicamentos, com conseqüente redução de preços. No entanto, alguns pontos eram bastante polêmicos, como a intercambialidade entre os genéricos e os produtos de nome/marca, sem exigir a comparação da equivalência terapêutica, a autorização das farmácias a fracionar medicamentos, desde que garantida à qualidade e a eficácia terapêutica originais dos produtos, e autorização de técnicos de farmácia a assumirem a responsabilidade técnica de estabelecimentos de dispensação de medicamentos. Devido à falta de embasamento técnico e apoio político, essa regulamentação não foi implementada efetivamente (29).

Em 14 de maio de 1996, foi promulgada a lei 9.279, que regulamenta os direitos e obrigações relativas à propriedade industrial, uma vez que, desde 1976 não havia proteção patentária para medicamentos no país, o que permitia o registro de medicamentos apenas por similaridade. Criou-se, assim, um ambiente favorável para o desenvolvimento de uma política de medicamentos genéricos, baseada em critérios internacionalmente aceitos (30).

A política de medicamentos genéricos instituída no Brasil em 1999, logo após a criação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), está inserida nas diretrizes e prioridades da Política Nacional de Medicamentos, sendo que o registro e o uso desses medicamentos deveriam ser progressivamente levados a efeito, respaldados pelos seguintes itens: estabelecimento dos requisitos nacionais para a

demonstração de equivalência terapêutica, principalmente em relação a biodisponibilidade, levantamento e utilização da infraestrutura e da capacidade do país para a realização de estudos de bioequivalência disponível na rede de laboratórios, identificação de mecanismos de incentivo a produção de medicamentos genéricos, estabelecimento de regulamentação referente a comercialização, prescrição e dispensação de medicamentos genéricos em todo território nacional (31).

Em 10 de fevereiro de 1999, a lei 9.787, alterou a lei 6.360/76 sobre a vigilância sanitária, estabeleceu o medicamento genérico e dispôs sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos. Estabeleceu 90 dias para que a Anvisa regulamentasse os seguintes itens: os critérios e condições para o registro e controle de qualidade dos medicamentos genéricos, os critérios para as provas de biodisponibilidade de produtos farmacêuticos em geral, os critérios para a aferição da equivalência terapêutica, mediante as provas de bioequivalência de medicamentos genéricos, para a caracterização de sua intercambialidade, os critérios para a dispensação de medicamentos genéricos nos serviços farmacêuticos governamentais e privados, respeitando a decisão expressa de não intercambialidade do profissional prescritor.

Seguindo o disposto na lei 9.787/99, a Anvisa, por meio de uma portaria, formou um grupo técnico de especialistas brasileiros nas áreas de controle de qualidade, farmacologia e farmacotécnica com o objetivo de elaborar a regulamentação técnica para o registro de medicamentos genéricos no Brasil, sendo sua versão final avaliada por um consultor da Universidade do Texas, especialista em bioequivalência de medicamentos (10).

Em 9 de agosto de 1999, foi publicada a primeira regulamentação técnica para o registro de medicamento genérico - Resolução RDC 391, trazendo seis anexos em formato de Guias Técnicos (32).

Com o objetivo de acelerar a implementação da política de medicamentos genéricos, em atendimento ao artigo 4º da Lei 9.787, de 10 de fevereiro de 1999, e a

uma das prioridades da Política Nacional de Medicamentos, foram tomadas várias ações, a saber:

1. Extinção do similar sem marca, ou similar com denominação genérica. Com a implementação dos genéricos, muitas indústrias produtoras de medicamentos similares, incentivaram balconistas a confundir a população dispensando similares de denominação genérica ao invés de medicamentos genéricos, mesmo estes sendo identificados nas embalagens como medicamentos genéricos de acordo com a lei 9.787/99.
2. Criação da tarja amarela com a letra G em azul e o termo “Medicamentos Genéricos” nas embalagens de genéricos.
3. Campanha na televisão para a população sobre a existência de genéricos de várias classes terapêuticas, nas farmácias e drogarias, *outdoors* com a divulgação da nova embalagem e distribuição de cartilhas educativas na rede pública de saúde.
4. Informação à classe médica, buscando seu engajamento com a prescrição do medicamento genérico.
5. Criação do programa nacional de monitoramento dos medicamentos genéricos, coordenado pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.
6. Criação de linha de financiamento especial para, empresas de genéricos, pelo Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social.
7. Publicação do decreto 3.675 de 28/11/00 (publicado com nova redação como decreto 3.841 de 11/05/01). Tal decreto estabeleceu condições especiais de registro de medicamentos já registrados, como genéricos nos Estados Unidos, no Canadá e em alguns países da Europa com legislação semelhante à brasileira. Esse registro tinha validade de um ano, e durante esse período, a empresa deveria apresentar o estudo de bioequivalência de acordo com a legislação brasileira. Como forma de garantir a disponibilidade dos medicamentos no mercado, em um prazo de 45 dias úteis, o decreto de concessão de registro especial definiu regras para as empresas importadoras

comprovarem, na Anvisa, a distribuição de seus produtos ao comércio. Após oito meses da concessão desse registro, o laboratório deveria comprovar que foram tomadas as providências da produção.

A Anvisa também estimulou e financiou a criação de centros de equivalência farmacêutica e de bioequivalência no país, que passaram a ser habilitados e certificados por equipe de técnicos especializados da Anvisa.

A redução mínima do preço do genérico em relação ao medicamento referência é de 35%, observando-se maior impacto no tratamento de doenças crônicas.

Os primeiros registros de medicamentos genéricos foram publicados em fevereiro de 2000. Correspondiam às formas farmacêuticas isentas de bioequivalência (cremes, soluções) e a outros produtos, cujos fabricantes apresentaram estudos de bioequivalência realizados inicialmente, para efeitos de *marketing*. Em setembro de 2000, já totalizavam 642 registros de medicamentos genéricos, sendo predominantes as formas farmacêuticas isentas do teste de bioequivalência (28).

Atualmente, o registro de medicamentos genéricos no Brasil segue normas internacionalmente aceitas e se baseia na comprovação da equivalência farmacêutica, da bioequivalência e das boas práticas de fabricação e controle de qualidade. A ANVISA concede o registro, após análise do dossiê submetido pela empresa, que reúne os resultados de estudos de estabilidade do medicamento, bem como aspectos ligados a formulação e ao processo de fabricação, além dos relatórios técnicos sobre a comprovação da equivalência farmacêutica e bioequivalência (33).

1.4 Hipertensão

A primeira mensuração da pressão arterial, data da metade do século XVIII, feita por Stephen Halles, na Inglaterra, que usou uma coluna de vidro conectada a uma artéria de um cavalo, sendo observada a elevação da coluna de sangue no tubo

e a oscilação do pulso. A invenção do esfigmomanômetro de coluna de mercúrio data de 1896, pelo italiano Scipione Riva - Rocci, em Turim. Em seu trabalho, foi descrita a pressão arterial sistólica, definida pelo desaparecimento da oscilação de pulso à insuflação de um manguito (34). Até a década de 40, a importância clínica da pressão arterial elevada, gerava controvérsia, e muitos duvidavam inclusive da necessidade do tratamento.

Em relação ao uso de fármacos anti-hipertensivos, existia uma defasagem entre a descoberta das primeiras drogas com ação anti-hipertensiva, seu uso eficaz e o estudo científico de seus efeitos. A falta de critérios rígidos em pesquisas naquela época, associado ao fato da hipertensão não ter sua importância valorizada, foram contribuintes importantes para esse fenômeno (35, 36).

Em 1964 foi publicado, o primeiro estudo com o propranolol e a classe se desenvolveu rapidamente na década de 70. Nesta mesma década, foram descobertas as propriedades de inibição da enzima conversora da angiotensina, a partir de peptídeos do veneno da jararaca. Essa pesquisa brasileira resultou no desenvolvimento de uma nova classe de drogas, com a síntese do captopril. A ação hipotensora dos bloqueadores dos canais de cálcio já era conhecida desde a década de 60, mas apenas na década de 80 foi comercializada e utilizada como droga de primeira linha para a hipertensão. Os bloqueadores AT1 surgiram na década de 90. Desde então, várias pesquisas com novas classes de drogas tem sido pesquisadas no intuito de evoluir o tratamento da hipertensão, mas até o momento nenhuma nova droga surgiu com a capacidade de ocupar um lugar junto com as drogas já estabelecidas, como de primeira linha, daquela época (36).

A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) tem alta prevalência e baixas taxas de controle. É considerado um dos principais fatores de risco modificáveis e um dos mais importantes problemas de saúde pública. A mortalidade por doença cardiovascular (DCV), aumenta progressivamente com a elevação da pressão arterial, a partir de 115/75 mmHg de forma linear, continua e independente. Em 2001, cerca de 7,6 milhões de mortes no mundo foram atribuídas à elevação da pressão arterial (54% por acidente vascular encefálico [AVE] e 47% por doença isquêmica do

coração [DIC]), sendo a maioria em países de baixo e médio desenvolvimento econômico e mais da metade em indivíduos entre 45 e 69 anos. No Brasil, as DCV tem sido a principal causa de morte. Em 2007, ocorreram 308.466 óbitos por doenças do aparelho circulatório. Entre 1990 e 2006, observou-se uma tendência lenta e constante de redução das taxas de mortalidade cardiovascular. As DCV são ainda responsáveis por alta frequência de internações, ocasionando custos médicos e socioeconômicos elevados. Como exemplo, em 2007 foram registradas 1.157.509 internações por DCV no Sistema Único de Saúde (SUS). Em relação aos custos, em novembro de 2009 ocorreram 91.970 internações por DCV, resultando em um custo de R\$ 165.461.644,33 (DATASUS). A doença renal terminal, outra condição frequentemente na HAS, ocasionou a inclusão de 94.282 indivíduos em programa de diálise no SUS e 9.486 óbitos em 2007 (37).

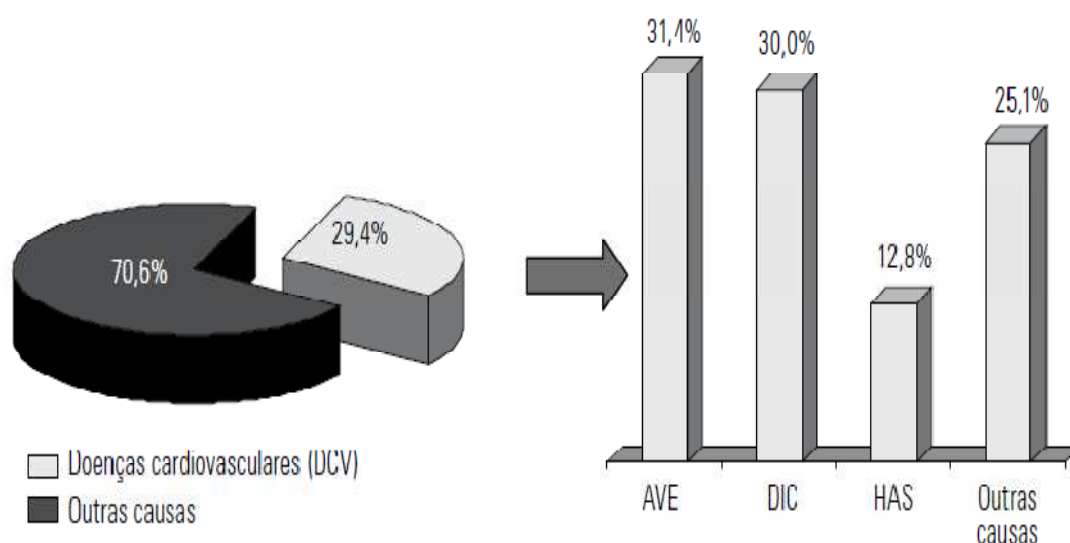


Figura 4: Taxas de mortalidade por DCV e suas diferentes causas no Brasil, em 2007 (AVE = acidente vascular encefálico; DIC = doença isquêmica do coração; HAS = hipertensão arterial sistêmica). **Fonte:** VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão arterial.

Inquéritos populacionais em cidades brasileiras nos últimos 20 anos apontaram uma prevalência de HAS acima de 30%. Considerando-se valores de PA

>140/90 mmHg, 22 estudos encontraram prevalências entre 22,3% e 43,9% (média de 32,5%), com mais de 50% entre 60 e 69 anos e 75% acima de 70 anos. Entre os gêneros, a prevalência foi de 35,8% nos homens e de 30% em mulheres, semelhante à de outros países. Revisão sistemática quantitativa de 2003 a 2008, de 44 estudos em 35 países, revelou uma prevalência global de 37,8% em homens e 32,1% em mulheres (37).

Os valores que permitem classificar os indivíduos adultos acima de 18 anos, de acordo com os níveis de pressão arterial (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação da pressão arterial de acordo com a medida casual no consultório.

Classificação	Pressão sistólica (mmHg)	Pressão diastólica (mmHg)
Ótima	<120	<80
Normal	<130	<85
Limítrofe	130-139	85-89
Hipertensão estágio 1	140-159	90-99
Hipertensão estágio 2	160-179	100-109
Hipertensão estágio 3	≥180	≥110
Hipertensão sistólica isolada	≥140	<90

Fonte: VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial.

O aumento da pressão arterial dá-se basicamente, por três mecanismos: aumento da resistência vascular periférica, aumento da contratilidade cardíaca e

aumento do volume plasmático. As estratégias para o tratamento da hipertensão incluem tratamento não farmacológico (dieta, exercício, abstinência de álcool e nicotina, dentre outros) e tratamento farmacológico.

1.4.1 Medicamentos anti-hipertensivos

Os atuais medicamentos para tratamento da hipertensão arterial (Tabela 2 e 3) são os diuréticos, betabloqueadores, inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA), antagonistas dos canais de cálcio (ACC), bloqueadores do receptor AT1 da angiotensina II (BRA II) (37). Qualquer medicamento dos grupos de anti-hipertensivos comercialmente disponíveis, desde que resguardadas as indicações e contra-indicações específicas, pode ser utilizado para o tratamento da hipertensão arterial.

Tabela 2: Anti-hipertensivos comercialmente disponíveis no Brasil.

Medicamentos	Posologia (mg)		Número de tomadas/dia
	Mínima e Máxima		
Diuréticos			
Tiazídicos			
Clortalidona	12,5	25	1
Hidroclorotiazida	12,5	25	1
Indapamida	2,5	5	1
Indapamida SR*** Alça	1,5	5	1
Bumetanida	0,5	**	1-2
Furosemida	20	**	1-2
Piretanida			1
Poupadores de potássio	6	12	
Amilorida*	2,5	10	1
Espironolactona	25	100	1-2
Triantereno*	50	100	1
Inibidores adrenérgicos			
Ação central			
Alfametildopa	500	1500	2-3
Clonidina	0,2	0,6	2-3
Guanabenz	4	12	2-3
Moxonidina	0,2	0,6	1
Rilmenidina	1	2	1
Reserpina*			1-2
Betabloqueadores	12,5	25	
Atenolol	25	100	1-2
Bisoprolol	2,5	10	1-2
Carvedilol+	12,5	50	1-2
Metoprolol e Metoprolol (ZOK)***	50	200	1-2
Nadolol	40	120	1
Nebivolol++	5	10	1
Propranolol**/Propranolol (LA)***	40/80	240/160	2-3/1-2
Pindolol			1-2
Alfabloqueadores	10	40	
Doxazosina	1	16	1
Prazosina	1	20	2-3
Prazosina XL***	4	8	1
Terazosina	1	20	1-2
Vasodilatadores diretos			
Hidralazina	50	150	2-3
Minoxidil	2,5	80	2-3

* Medicamentos comercializados apenas em associações a outros anti-hipertensivos.

** Dose máxima variável de acordo com a indicação médica.

*** Retard, SR, ZOK, Oros, XL, LA, AP, SR e CD: formas farmacêuticas de liberação prolongada ou controlada.

+ Alfa-1 e betabloqueador adrenérgico.

++ Betabloqueador e liberador de óxido nítrico.

Fonte: VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial.

Tabela 3: Anti-hipertensivos comercialmente disponíveis no Brasil.

Medicamentos	Posologia (mg)		Número de tomadas/dia
	Mínima	Máxima	
Bloqueadores dos canais de cálcio Fenilalquilaminas			
Verapamil Retard*** Benzotiazepinas	120	480	1-2
Diltiazem AP, SR ou CD*** Diidropiridinas	180	480	1-2
Anlodipino	2,5	10	1
Felodipino	5	20	1-2
Isradipino	2,5	20	2
Lacidipino	2	8	1
Lercanidipino	10	30	1
Manidipino	10	20	1
Nifedipino Oros***	30	60	1
Nifedipino Retard***	20	60	2-3
Nisoldipino	5	40	1-2
Nitrendipino	10	40	2-3
Inibidores da enzima conversora de angiotensina			
Benazepril	5	20	1
Captopril	25	150	2-3
Cilazapril	2,5	5	1
Delapril	15	30	1-2
Enalapril	5	40	1-2
Fosinopril	10	20	1
Lisinopril	5	20	1
Perindopril	4	8	1
Quinapril	10	20	1
Ramipril	2,5	10	1
Trandolapril	2	4	1
Bloqueadores do receptor AT1			
Candesartana	8	32	1
Irbesartana	150	300	1
Losartana	25	100	1
Olmesartana	20	40	1
Telmisartana	40	160	1
Valsartana	80	320	1
Inibidor direto da renina			
Alisquireno	150	300	1

* Medicamentos comercializados apenas em associações a outros anti-hipertensivos.

** Dose máxima variável de acordo com a indicação médica.

*** Retard, SR, ZOK, Oros, XL, LA, AP, SR e CD: formas farmacêuticas de liberação prolongada ou controlada.

+ Alfa-1 e betabloqueador adrenérgico.

++ Betabloqueador e liberador de óxido nítrico.

Fonte: VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial.

A adesão ao tratamento é definida como o grau de obediência do paciente à prescrição e às instruções médicas, ou seja, como o paciente cumpre as recomendações médicas, toma as medicações prescritas, realiza mudanças no estilo de vida, etc. Outro aspecto da adesão é a persistência com foco o tratamento continuado e de longo prazo (38, 39).

Os principais fatores que afetam a adesão estão relacionados à complexidade do regime terapêutico, como número de doses, comprimidos e horário das administrações, duração do tratamento, falha de tratamentos anteriores, mudanças freqüentes no tratamento e influência na qualidade de vida (40). A adesão ao tratamento é melhor em indivíduos que nunca mudaram de esquema terapêutico e que tomam apenas um comprimido por dia (41). Mion et al.(42) verificaram em estudo realizado com 353 hipertensos, que 56% tinham preferência por tratamento farmacológico, por via oral (84%), em comprimidos (60%), uma vez ao dia (81%) e pela manhã (65%), aspectos esses que devem ser considerados na prescrição do tratamento. Dessa maneira a utilização de fármacos associados, na forma de comprimidos se torna uma excelente ferramenta para adesão ao tratamento da HAS.

O tratamento através de monoterapia, aumentando as doses até níveis máximos antes de substituir ou associar outras medicações, foi o preconizado até pouco tempo atrás. O intuito era obter um regime terapêutico simples, que possibilitasse uma melhor aderência do paciente ao tratamento farmacológico. No entanto, a maioria dos pacientes, principalmente os portadores de hipertensão de grau 2, não conseguem uma estabilização da pressão arterial PA com apenas uma formulação. Assim, atualmente recomenda-se o uso da terapia combinada de fármacos de forma precoce nessa população, de 2 ou até 3 substâncias.

A justificativa para usar a terapia da combinação em dose fixa, é obter o controle da pressão arterial aumentada empregando dois agentes anti-hipertensivos com diferentes modos de ação e facilitar a adesão através de um único comprimido com administração uma ou duas vezes ao dia, usando baixas doses de dois tipos diferentes de medicamentos (43). Estas vantagens potenciais são tais que alguns pesquisadores têm recomendado usar a terapia da combinação de anti-hipertensivos

como terapia inicial, principalmente em pacientes com danos em órgãos-alvo ou em casos iniciais com elevados níveis de hipertensão (44, 45).

O uso criterioso de formulações existentes no mercado com essas combinações pode facilitar o esquema posológico e a aderência do paciente ao tratamento. Também há evidências atuais que, o uso de ácido acetilsalicílico, em baixas doses nos pacientes com HAS controlada, diminui a ocorrência de complicações cardiovasculares na ausência de contraindicações a esta substância (46).

Uma das mais importantes evidências para o uso de associações de medicamentos hipotensores é a revisão sistemática publicada recentemente por Law et al. (47). Foram analisados 354 estudos clínicos aleatorizados e controlados por placebo, envolvendo um total de 40 mil pacientes tratados com as cinco principais classes de agentes anti-hipertensivos, ou seja, diuréticos tiazídicos, betabloqueadores, antagonistas do cálcio, inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA) e antagonistas do receptor da angiotensina II (ARA II). Concluiu-se que a associação de baixas doses pode concorrer para o dobro da ação anti-hipertensiva das medicações empregadas isoladamente. Assim, em decorrência dessa avaliação pode-se chegar aos resultados abaixo apresentados com relação ao uso isolado de monoterapia e da associação fixa de substâncias.

Tabela 4: Eventos adversos dos medicamentos – porcentagem das pessoas com um ou mais sintomas atribuídos ao tratamento*, de acordo com a classe e com a dose, em estudos clínicos.

Classe do medicamento	Nº de estudos	% (IC 95%) com sintomas (tratado vs. placebo)		
		½ dose-padrão	Dose-padrão	Dobro da dose-padrão
Tiazídicos	59	2,0 (-2,2 a 6,3)	9,9 (6,6 a 13,2)	17,8 (11,5 a 24,2)
Beta bloqueadores	62	5,5 (0,3 a 10,7)	7,5 (4,0 a 10,9)	9,4 (3,6 a 15,2)
IECA	96	3,9 (-3,7 a 11,6)	3,9 (-0,5 a 8,3)	3,9 (-0,2 a 8,0)
ARA II	44	-1,8 (-10,2 a 6,5)	0 (-5,4 a 5,4)	1,9 (-5,6 a 9,3)
ACC	96	1,6 (-3,5 a 6,7)	8,3 (4,8 a 11,8)	14,9 (9,8 a 20,1)

IECA: inibidor da enzima conversora da angiotensina II; **ARA II:** antagonista do receptor da angiotensina II. Calculada como a diferença entre o grupo placebo e tratado como proporção de pacientes que apresentavam sintomas, excluindo cefaléia, a qual foi menos comum no grupo que recebeu tratamento. Sintomas mais comuns: tiazídico: tonturas, impotência sexual, náuseas, câimbras; β-bloqueador: extremidades frias, fadiga, náuseas; IECA: tosse; antagonistas do cálcio: edema de tornozelo, tontura e rubor.

Fonte: (47).

Com monoterapia, há uma redução de 4% a 8% no valor da pressão:

PA de 160 x 95 mmHg

PAS = - 7 a 13 mmHg

PAD = - 4 a 8 mmHg

Com associação: 8% a 15% de redução no valor da pressão:

PA de 160 x 95 mmHg

PAS = - 12 a 22 mmHg

PAD = - 7 a 14 mmHg

De acordo com as orientações mais recentes (37, 48), o início da terapêutica anti-hipertensiva deve ser feito considerando-se a possibilidade de uso de baixas doses de um único agente ou com a associação fixa, também em baixas doses, de dois agentes anti-hipertensivos. Iniciar o tratamento com uma associação fixa de

duas medicações em baixas doses pode resultar em benefícios e também desvantagens. O racional para um possível benefício da associação fixa de medicamentos anti-hipertensivos como, primeira escolha, estaria fundamentado no fato de que boa parte dos pacientes, como já anteriormente reportado, não responderia a uma única medicação. Nesse contexto, com esses indivíduos, poder-se-ia ter duas condutas: o aumento de dose da medicação inicialmente prescrita – usualmente com maior probabilidade de efeitos adversos – ou a associação de outra medicação de classe terapêutica diferente.

Se a terapêutica inicial já foi feita com uma associação de princípios terapêuticos diferentes, é muito provável que um melhor impacto na relação médico - paciente, ao se conseguir o adequado controle da pressão arterial do que ter a necessidade posterior de prescrever uma nova medicação.

A vantagem do início do tratamento com monoterapia de baixa dose, é que, caso o agente não seja bem tolerado, pode-se substituí-lo com a identificação clara de que foi essa medicação a causadora da intolerância. Uma óbvia desvantagem de iniciar com duas drogas, mesmo em baixas doses, é que se pode submeter o paciente a uma excessiva e desnecessária utilização de medicamentos.

Por outro lado, outras vantagens seriam fundamentadas nos seguintes aspectos, como:

- ✓ Maximização da eficácia

Ao combinar mecanismos anti-hipertensivos diferentes, procura-se aumentar a probabilidade de obter um controle pressórico mais rapidamente e sair da faixa de 30% a 40% de normalização com monoterapia para 70% a 80%. Na associação, deve-se escolher o medicamento que complementa a ação anti-hipertensiva ao outro medicamento. Exemplo clássico está na combinação de um diurético, que tem sua ação anti-hipertensiva, limitada pela ativação do sistema renina-angiotensina, com um inibidor da enzima conversora da angiotensina (IECA) ou um bloqueador dos receptores da angiotensina II (BRA II).

- ✓ Minimização ou anulação dos efeitos colaterais

Ao utilizar associações, pode-se obter melhor controle pressórico com doses menores, provocando menos efeitos colaterais. Além disso, um dos componentes pode minimizar os efeitos colaterais do outro: por exemplo, um betabloqueador, pode diminuir a taquicardia de um antagonista de cálcio.

- ✓ Facilitação da adesão ao tratamento

Com dois fármacos em um único comprimido, facilitamos a adesão ao tratamento. Conforme se sabe, o número de ingestão é um grande limitante da adesão ao tratamento. Tendo em vista os mecanismos de ação sinérgicos e os resultados favoráveis obtidos de vários estudos, as associações reconhecidamente eficazes que trazem benefício aos pacientes hipertensos são (37):

- ✓ Diuréticos com outros diuréticos de diferentes mecanismos de ação;
- ✓ Diuréticos com simpatolíticos de ação central;
- ✓ Diuréticos com betabloqueadores;
- ✓ Diuréticos com inibidores da enzima conversora de angiotensina;
- ✓ Diuréticos com bloqueadores do receptor AT1 da angiotensina II;
- ✓ Diuréticos com inibidor direto da renina;
- ✓ Diuréticos com bloqueadores dos canais de cálcio;
- ✓ Bloqueadores dos canais de cálcio com betabloqueadores;
- ✓ Bloqueadores dos canais de cálcio com inibidores da enzima conversora da angiotensina;
- ✓ Bloqueadores dos canais de cálcio com bloqueadores do receptor AT;
- ✓ Bloqueadores dos canais de cálcio com inibidor direto da renina.

1.5 Fármacos de interesse no presente trabalho

1.5.1 Losartana

A losartana (LOS) é um antagonista do receptor AT1 da angiotensina II, aprovado para uso humano como anti-hipertensivo, inicialmente nos Estados Unidos em 1995 (49).

A losartana é um sal associado ao íon potássio, pertencente a uma série de compostos imidazólicos com substituição pelo bifenil. Dois imidazólicos simples, com substituição pelo benzil foram identificados como fracos antagonistas da angiotensina II sem atividade agonista. Essas substâncias foram modificadas sinteticamente para produzir um composto (EX6803) com afinidade de ligação e potência dez vezes maiores do que as de seus predecessores. A eficácia por via oral foi conseguida com o desenvolvimento de outro composto (EX7711) e, uma série de progressos na atividade por via oral, através de estudos com animais, resultou na losartana no ano de 1990 (50, 51).

Apresenta como fórmula molecular $C_{22}H_{23}ClN_6O$ e como nomenclatura 2-*n*-butil-4-cloro-5-hidroximetil-1-[(2'-(1*H*-tetrazol-5-il)-bifenil-4-il)metil]imidazol. Quando associado ao potássio, sua fórmula é $C_{22}H_{22}ClKN_6O$, com peso molecular de 461,01. É uma molécula sintética, ativa por via oral, não-peptídica. Apresenta-se, na forma de pó cristalino branco a praticamente branco. É muito solúvel em água, solúvel em álcoois, e pouco solúvel em solventes orgânicos comuns, tais como acetona e metiletilcetona (49, 52, 53).

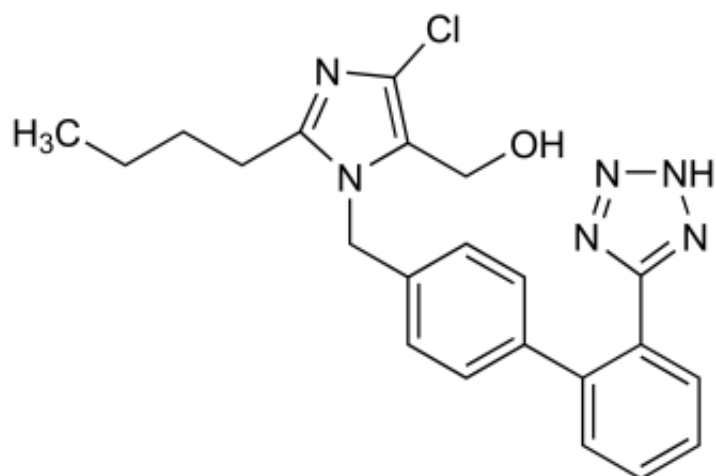


Figura 5: Estrutura molecular da Losartana.

1.5.1.1 Mecanismo de ação

O sistema renina - angiotensina (SRA) corresponde a um complexo sistema hormonal, cujo papel fundamental está relacionado com a homeostasia hidroeletrolítica do organismo e o controle da pressão arterial.

A angiotensina II, um potente vasoconstritor, é o principal hormônio ativo do sistema renina-angiotensina e o maior determinante da fisiopatologia da hipertensão. A angiotensina II liga-se ao receptor AT1, encontrado em muitos tecidos (por exemplo, músculo vascular liso, glândulas adrenais, rins e coração) e desencadeia várias ações biológicas importantes, incluindo vasoconstrição e liberação de aldosterona. A angiotensina II também estimula a proliferação de células da musculatura lisa (51, 54).

A losartana e seu principal metabólito ativo bloqueiam os efeitos vasoconstritores e secretores de aldosterona da angiotensina II, através do bloqueio seletivo da ligação da angiotensina II para o receptor AT1. Tanto a losartana e o seu principal metabólito ativo, não apresenta qualquer atividade agonista parcial no receptor AT1, e tem afinidade muito maior (cerca de 1000 vezes) para o receptor AT1 do que para o receptor AT2. *In vitro* os estudos indicam que a ligação losartana, é um inibidor reversível competitivo do receptor AT1. Tanto a losartana, quanto o seu

metabólito ativo não inibe a ECA (cininase II, a enzima que converte a angiotensina I em angiotensina II e degrada a bradicinina), além de não se ligarem nem bloquearem outros receptores hormonais ou canais iônicos reconhecidamente importantes na regulação cardiovascular (Figura 6). O bloqueio farmacológico dos componentes dessa via reduzirá a pressão arterial e produzirá efeitos hipotensores. (49, 55, 56, 57).

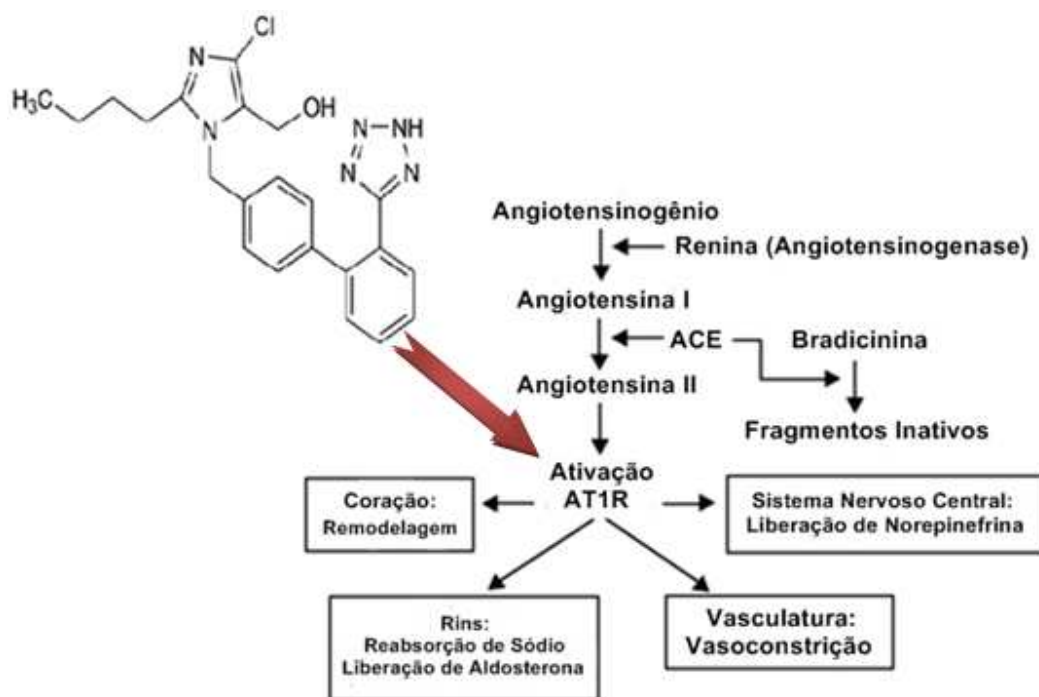


Figura 6: Componentes e os efeitos do sistema renina-angiotensina.

A losartana sofre metabolismo de primeira passagem pelas enzimas do citocromo P450. Seus produtos de biotransformação originam o metabólito ativo EXP3174, que é de 10 a 40 vezes mais potente que a losartana. Este metabólito ácido é responsável pela maior parte do antagonismo dos receptores da angiotensina II (49, 58).

1.5.1.2 Farmacocinética

A losartana é um agente ativo por via oral, que sofre metabolismo de primeira passagem importante pelas enzimas do citocromo P450. Ele é convertido, em parte, a um metabólito ativo do ácido carboxílico (EXP3174) que apresenta potencia 10 a 40 vezes maior que a losartana, sendo responsável pela maior parte do antagonismo dos receptores da angiotensina II (49, 52, 53, 58).

A meia vida de losartana é de cerca de 2 horas e de seu metabólito ativo, é de cerca de seis a nove horas. A farmacocinética da losartana e seu metabólito ativo são lineares com doses de losartana orais até 200 mg e não mudam ao longo do tempo (49, 53).

Após a administração oral, a losartana é bem absorvida (com base na absorção de losartana *radiolabeled*) e sofre considerável metabolismo de primeira passagem, a biodisponibilidade sistêmica de losartana é de aproximadamente 33%. Cerca de 14% da dose administrada por via oral de losartana é convertido para o metabólito ativo. Concentrações de losartana e seu metabólito ativo são atingidas em 1 hora e em 3-4 horas, respectivamente (53, 57, 58).

O volume de distribuição de losartana e do metabólito ativo, é de cerca de 34 L e 12 L, respectivamente. A depuração plasmática total de losartana e do metabólito ativo é de cerca de 600 ml / min e 50 ml / min, respectivamente, com a depuração renal de cerca de 75 ml / min e 25 ml / min, respectivamente. Após doses únicas de losartana administrada por via oral, cerca de 4% da dose é excretada na urina e cerca de 6% é excretada na urina como metabólito ativo, excreção biliar contribui para a eliminação de losartana e seus metabólitos (52, 53).

Tanto losartana quanto seu metabólito é, altamente ligado às proteínas plasmáticas: 98,6-98,8% e 99,7%, respectivamente, no intervalo de concentração de 0,5-5 mg / mL (59, 60).

1.5.1.3 Indicações e contra-indicações

A losartana é indicada no tratamento da hipertensão arterial, especialmente em populações de alto risco cardiovascular ou com morbidades, proporcionando redução de morbidade e de mortalidade cardiovasculares. Estudos também comprovam seu efeito benéfico em insuficiência cardíaca congestiva e são úteis na prevenção do acidente vascular cerebral (61, 62).

Para tratamento de hipertensão pode ser utilizado sozinho ou em combinação com outros agentes anti-hipertensivos, inclusive diuréticos (53).

As contra-indicações são a hipersensibilidade aos componentes do produto e na gravidez, quando utilizado durante o segundo e terceiro trimestres, as drogas que atuam diretamente no sistema renina-angiotensina podem causar danos e até morte do feto em desenvolvimento. A perfusão renal fetal, que depende do sistema renina-angiotensina, começa no segundo trimestre; assim o risco para o feto, aumenta se a losartana for administrado durante esse período. Quando houver gravidez a losartana deve ser descontinuado.

1.5.2 Hidroclorotiazida

A hidroclorotiazida (HCTZ) é um diurético tiazídico, aprovado para uso humano nos Estados Unidos em 1963.

A hidroclorotiazida é um 3,4-diidro derivado da chlorothiazide, que apresenta o nomenclatura de 6-cloro-3,4-diidro-2H-1,2,4-benzotiadiazina-7-sulfonamida 1,1-dioxido. É uma molécula sintética, sua fórmula é $C_7H_8ClN_3O_4S_2$ e seu peso molecular é de 297,75. É um diurético da classe dos benzotiazídicos, derivado sulfonamídico, comumente conhecido como tiazidas. Foi descoberto quando da pesquisa de potentes inibidores da anidrase carbônica. Apresenta-se na forma de pó cristalino branco, praticamente branco, ligeiramente solúvel em água e solúvel em solução de hidróxido de sódio (51, 53).

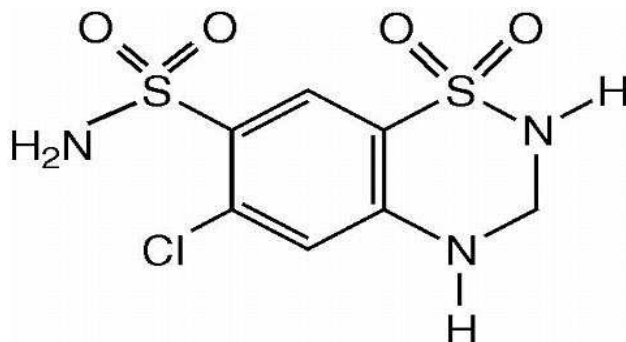


Figura 7: Estrutura molecular do Hidroclorotiazida.

1.5.2.1 Mecanismo de ação

Muitos tiazídicos apresentam atividade inibidora da anidrase carbônica. A HCTZ apresenta atividade diurética, devido a essa ação sobre a anidrase no túbulo proximal resultando na diminuição da reabsorção renal de sódio e de bicarbonato. No entanto, sua principal ação diurética é decorrente de uma inibição mais específica da reabsorção de sódio e cloro na parte proximal do túbulo distal e sistema coletor. O mecanismo de ação é ainda desconhecido, mas deve incluir: 1) inibição da enzima fosfodiesterase; 2) diminuição do metabolismo celular renal; e 3) inibição de prostaglandinas. Outro mecanismo de ação direta inibitória sobre um transportador eletroneuronal ligado ao sódio-cloro na membrana luminal do néfron distal tem sido avaliada (63).

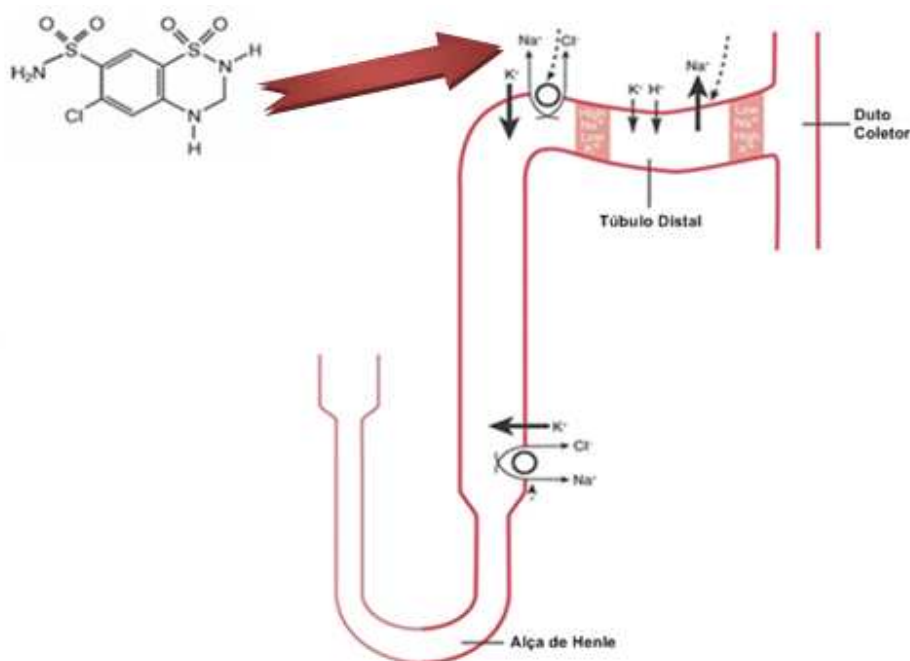


Figura 8: Ação dos tiazídicos no túbulo distal.

A hidroclorotiazida deve reduzir a taxa de filtração glomerular, mas somente é relevante em pacientes com função renal diminuída. A droga aumenta a concentração plasmática de urato, devido a um aumento da reabsorção do urato no túbulo proximal e a uma diminuição na secreção do mesmo pelas células tubulares. A relação dose-resposta para HCTZ - tanto para seu efeito diurético como para o efeito anti-hipertensivo, ainda não está completamente estabelecido. A hidroclorotiazida é efetiva em baixar os níveis pressóricos, mas o mecanismo de atividade anti-hipertensiva ainda não está claro. Provavelmente envolve contração do volume extracelular, redução do trabalho cardíaco e/ou da resistência periférica vascular (53).

1.5.2.2 Farmacocinética

Após uma dose oral, a maioria da droga é absorvida no duodeno e no jejuno (pouco é absorvido no estômago), sendo em torno de 70% a sua absorção total. Quando administrada com alimentos, sua biodisponibilidade é reduzida em 10%. A

absorção é aumentada com o uso de drogas anticolinérgicas, que diminuem o trânsito intestinal e o esvaziamento gástrico. A eficácia da absorção não é dependente da dose. Embora níveis plasmáticos e a excreção urinária sejam dependentes da dose administrada, o pico de excreção da droga é independente da dose quando estiver entre 25 a 200mg (dose administrada). O pico plasmático ocorre após 2 a 4 horas da administração oral. A ligação plasmática da droga é de 40 a 64%. O volume de distribuição varia de 0.83 e 3.0l/kg. Níveis muito baixos da droga podem ser encontrados no leite materno. A hidroclorotiazida apresenta uma curva de eliminação bifásica, sendo o primeiro pico em 2.5 horas e o segundo em 8-12 horas. A droga não é metabolizada no ser humano e é excretada sem alterações através da urina. Como é pouco fraca, aumentando o pH urinário irá aumentar a sua excreção. Por não ser metabolizada e sendo a sua eliminação essencialmente renal, sua meia-vida plasmática estará aumentada em pacientes com função renal diminuída, além de pacientes com insuficiência cardíaca congestiva (51, 52, 53, 63, 64).

1.5.2.3 Indicação e contra-indicação

Hidroclorotiazida é indicado no tratamento da hipertensão arterial, quer isoladamente ou em associação a outros fármacos anti-hipertensivos, nos casos mais graves de hipertensão. Está indicado também no tratamento de edema associado à insuficiência cardíaca congestiva, cirrose hepática e terapia com corticosteróides ou estrógenos. Também é eficaz no edema relacionado a várias formas de disfunção renal, como síndrome nefrótica, glomerulonefrite aguda e insuficiência renal crônica.

As contraindicações são anúria, gestação e alergia a sulfonamídicos. Casos que necessitam precaução na sua utilização são: função renal diminuída, doença hepática, diabetes mellitus, gota e/ou hiperuricemia e hiperlipidemia.

1.6 Extração de fármacos de matriz biológica

Para que haja a separação dos componentes de interesse presente da matriz biológica, é necessário preparar a amostra isentando-a de compostos que poderão interferir na determinação analítica. A amostragem é considerada uma etapa de suma importância para o procedimento analítico, tendo em vista que a seleção incorreta do material a ser analisado inviabiliza quaisquer correções posteriores (65).

No processo de análise de fármacos em fluidos biológicos a presença de proteínas, macromoléculas e substâncias menores, podem interferir de maneiras variáveis, devido ao fato de que essas matrizes contêm diversos compostos químicos em concentrações superiores à do fármaco, dificultando a sua determinação qualitativa e quantitativa (65).

A etapa de extração é o item mais complexo no preparo de amostras, podendo ser associada à concentração do analito, derivatização, entre várias técnicas, dependendo do estado físico, químico e da complexidade da amostra (65).

A precipitação de proteínas ou desproteínização do plasma é um tipo de extração que propicia a eliminação das proteínas plasmáticas por precipitação, ocasionada pela adição de um solvente orgânico (como acetonitrila ou metanol) ou um ácido (ácido perclórico, tricloroacético). A adição do solvente orgânico promoverá a desproteínização do plasma, ou seja, o fármaco que se encontra agregado às proteínas do plasma é separado, deslocando-se para o solvente. Posteriormente submete-se a amostra à centrifugação para a separação do sobrenadante. O solvente utilizado na desproteínização deve possuir afinidade com a droga e ser injetado diretamente no equipamento sem causar maiores danos. Porém, no caso da adição de ácidos é necessário promover etapas extras como, filtração, evaporação e ressuspensão do produto, que será utilizado na análise, pois o ácido (dependendo de sua concentração) pode danificar o equipamento de detecção.

A precipitação de proteínas é um procedimento simples, de baixo custo e rápido, porém, pouco eficiente na eliminação de interferentes (66, 67, 68).

A extração líquido-líquido (LLE, “*liquid-liquid extraction*”) segue a propriedade da miscibilidade de líquidos, que ocorre basicamente entre duas fases imiscíveis, no qual a fase A contém o soluto de interesse B, e uma fase C é colocada em contato com ela. Assim o soluto B será distribuído entre as duas fases (Figura 9) (65).

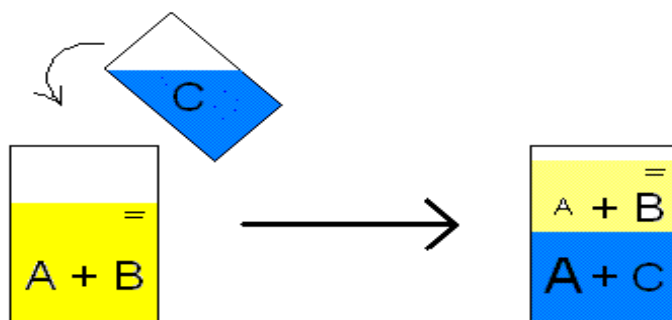


Figura 9: Princípio da extração líquido-líquido. No caso, A = fármaco, B = plasma, C = reagente orgânico.

Genericamente, na extração líquido-líquido são adicionados solventes orgânicos (diclorometano, éter dietílico, acetato de etila, hexano, entre outros), no intuito de extrair a forma não ionizada do fármaco de interesse. É crucial o ajuste do pH da amostra conforme as características do fármaco, pois desta forma garante-se que o fármaco encontra-se predominantemente na forma não ionizada. Resumidamente, o procedimento para a extração líquido-líquido compreende o ajuste do pH da amostra e a adição de solvente orgânico, para posterior agitação e centrifugação promovendo a separação das fases orgânica e aquosa. A fase aquosa é desprezada enquanto a fase orgânica é submetida à secagem e ressuspensão do produto para análise de quantificação do fármaco. Esse método apresenta certas dificuldades, porém, estas são compensadas pelos excelentes resultados em termos de purificação da amostra (69).

A extração por fase sólida emprega os princípios da cromatografia para remover interferentes de amostras biológicas. Pequenas colunas descartáveis, ou cartuchos, contendo partículas revestidas de fase estacionária são usadas para eluir e separar o fármaco de outras substâncias presentes na amostra (70).

Atualmente, diversos tipos de cartuchos para extração por fase sólida estão disponíveis no mercado, variando em seu tamanho, formato e tipo de fase estacionária.

1.7 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A principal técnica de quantificação empregada na análise de estudos de biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos é a cromatografia líquida de alta eficiência (71). Esta define-se como um método físico-químico de separação, no qual os constituintes da amostra a serem isolados são particionados entre duas fases, uma estacionária, geralmente de grande área, e a outra um fluido insolúvel na fase estacionária, que percola através da primeira (72).

A cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance liquid chromatography* – HPLC) é uma técnica de ultra-microanálise capaz de quantificar massa de componentes inferiores a 10^{-18} g, dependendo do detector empregado. Essa técnica supre a necessidade de operações com partículas extremamente pequenas de fase estacionária, inferiores a 10 micra de diâmetro, porém, para a realização desse processo, algumas exigências básicas devem ser consideradas, como o uso de solventes especiais e ultra puros, o uso de detectores adequados, ou seja, detectores seletivos e super sensíveis com o tamanho de célula de detecção inferior a 10 microlitros, o emprego de bombas para líquidos de alta precisão e exatidão para operações a pressão de até 500 atm e baixas vazões de 0,010 até 2-3 mililitros por minutos em operações analíticas (72).

A HPLC é uma técnica que utiliza uma pressão alta para fazer com que o composto em análise atravesse mais rapidamente pela coluna contendo partículas muito finas que proporcionam separações muito eficientes (73).

Esta técnica consiste em um sistema de distribuição de solvente, uma válvula de injeção de amostra, uma coluna de alta pressão, um detector e um computador para monitorar o sistema e apresentar os resultados (73).

A bomba permite a eluição adequada da fase móvel, através de um sistema de vazão contínua sem pulsos e de alta reprodutibilidade, cujo fluxo é constante. No entanto, existem dois tipos de bombas: a bomba pneumática, que produz fluxo variável, porém com uma pressão constante e o segundo tipo que atua de forma antagônica, com fluxo constante a uma pressão variável (74).

A eluição é o desenvolvimento da amostra no sistema cromatográfico, que pode manter a mesma proporção da fase móvel ao longo da análise (isocrático) ou variar sua composição durante a eluição (gradiente), este último é mais utilizado na separação de substâncias complexas com diferentes funções químicas.

Em HPLC, a injeção da amostra é realizada com auxílio de válvulas especiais que permitem a introdução com precisão e exatidão de volumes que variam, em geral, de 5 a 20 μl . A Figura 10 abaixo mostra um esquema de uma válvula típica nas posições de carga e injeção.

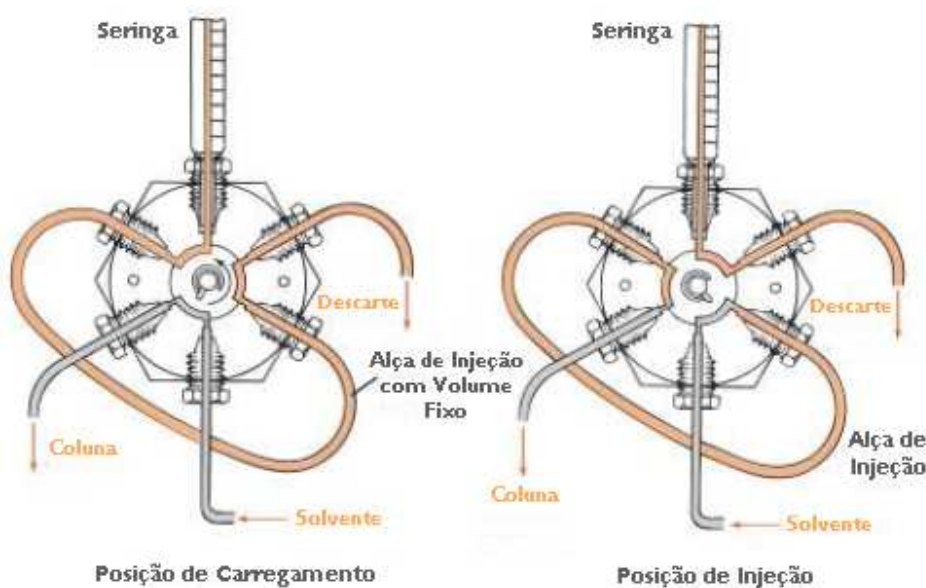


Figura 10: Injetor de Válvula de Amostragem (75).

As amostras são injetadas no equipamento nas pressões necessárias, com grande eficiência e precisão através de auto-injetores. Esse sistema de injeção é

capaz de injetar um grande número de amostras sem a presença do analista, além de realizar operações como diluição, derivatização ou adição de reagentes (76).

As colunas (fase estacionária) são geralmente de aço inoxidável, com diâmetro interno característico e com comprimento variável. O sistema cromatográfico pode ser classificado de duas maneiras de acordo com a coluna empregada. A cromatografia de fase normal consiste em um sistema cuja fase móvel é apolar e a fase estacionária é polar, e a cromatografia de fase reversa, é o sistema em que a fase móvel é polar e a fase estacionária é apolar. A afinidade e a retenção de uma amostra pela fase estacionária são determinadas pela polaridade da fase móvel (74).

As colunas normalmente utilizadas em separações analíticas têm diâmetros internos de 2 mm a 5 mm, podendo ser aquecidas com o intuito de otimizar a separação, embora raramente sejam utilizadas temperaturas superiores aos 60° C devido a potencial degradação da fase estacionária ou volatilidade da fase móvel (74).

A escolha do detector adequado depende do atendimento das características desejadas, ou seja, alta sensibilidade, alta seletividade, linearidade, baixo limite de detecção e estabilidade frente a mudanças na composição da fase móvel e na temperatura (76).

1.8 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de espectrometria de massa (LC-MS/MS)

Uma das técnicas analíticas que ganhou extrema importância no elenco disponível para a indústria farmacêutica é a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (77).

Um detector ideal para um sistema cromatográfico (Figura 11) deve apresentar peculiaridades como alta sensibilidade, alta seletividade, boa resposta a um grande número de classes de compostos e habilidade na detecção de misturas complexas permitindo um elevado número de análise. Sendo também indispensável

à possibilidade de uso do detector em análises quantitativas. Todas essas características são encontradas no sistema de detecção por espectrometria de massa (77).



Figura 11: Sistema cromatográfico utilizado para as análises, composto por um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) acoplado a um espectrômetro de massa (MS/MS).

O desenvolvimento de técnicas como a ionização química à pressão atmosférica (APCI) e a ionização por eletronebulização (*electrospray*, ESI) possibilitaram a união viável e efetiva de duas poderosas ferramentas analíticas, a espectrometria de massa (MS) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), gerando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa – *HPLC-MS*, um método robusto e aplicável a uma grande variedade de matrizes (77).

Mais recentemente com o surgimento dos primeiros equipamentos comerciais com sistema de fotoionização, a técnica *HPLC-MS* tornou-se uma ferramenta analítica universal capaz de analisar desde componentes de baixa massa molecular como aminoácidos até proteínas (77).

A espectrometria de massa está fortemente presente na indústria farmacêutica, desde a pesquisa de novos fármacos e formulações até o controle da qualidade. No Brasil, um segmento que vem ganhando cada vez mais importância econômica, inclusive trazendo divisas com a prestação de serviços na área de química analítica, é a análise de fármacos em amostras de plasma utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa em série *HPLC-MS/MS*, (Figura 12) para desenvolvimento de medicamentos genéricos. O impacto e a velocidade de crescimento da *HPLC-MS/MS* são tão grandes que, mesmo para moléculas tradicionalmente analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CGAS-MS), como é o caso dos esteróides, a *HPLC-MS/MS* apresenta enormes vantagens, principalmente em relação à simplicidade da preparação da amostra (na maioria dos casos não necessita a execução de uma etapa de derivatização) e tempo de análise, normalmente inferior a 5 minutos (77).

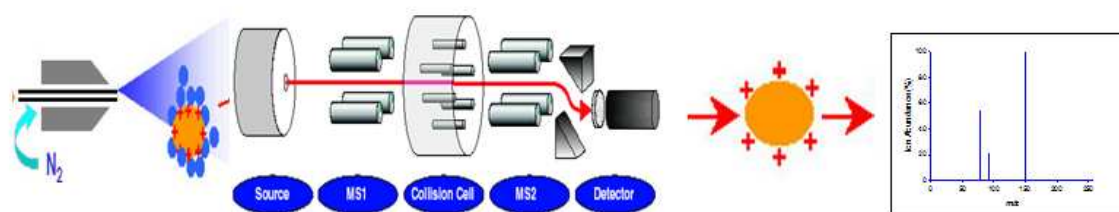


Figura 12: Esquema da espectrometria de massa acoplado a espectrometria de massa (sinônimos: espectrometria de massa em tandem EM-EM e EM2). Ilustra uma das formas de realização da técnica, neste caso empregando sistema de analisadores de massa em configuração.

O espectrômetro de massa é um detector universal, de alta sensibilidade que fornece a massa molecular dos solutos e permite a elucidação estrutural desses. Para a área de bioequivalência, a espectrometria de massa é a metodologia ideal, pois a utilização do MS-MS permite a fragmentação dos íons já formados, fornecendo informações estruturais de maior seletividade, permitindo a detecção exata e precisa da molécula que constitui o princípio ativo do medicamento-teste mediante a comparação com o medicamento referência analisados (76). A espectrometria de massa é uma técnica usada para o estudo das massa de átomos, moléculas ou fragmentos de moléculas permitindo a obtenção de informações tanto qualitativas quanto quantitativas. Para se obter um espectro de massa, as moléculas no estado gasoso ou as espécies desorvidas a partir de fases condensadas são ionizadas. Os íons obtidos são acelerados por um campo elétrico e separados de acordo com a razão entre sua massa e sua carga elétrica (m/z) (73).

A espectrometria de massa necessita de alto vácuo para evitar colisões moleculares durante a separação dos íons. Por sua vez a cromatografia é intrinsecamente uma técnica de alta pressão. O problema em acoplar as duas técnicas é a remoção da enorme quantidade de matéria presente entre o cromatógrafo e o espectrômetro (78).

Em cromatografia a gás o uso de colunas capilares estreitas diretamente conectadas à entrada do espectrômetro de massa através de uma linha de transferência aquecida, não sobrecarregaria o sistema de vácuo do espectrômetro. Mas na cromatografia líquida o problema é mais complexo, devido ao enorme volume de gás formado pelo líquido proveniente da coluna na interface entre a coluna e o espectrômetro de massa. Para minimizar o problema o emprego de aditivos não voláteis na fase móvel (por exemplo, o tampão fosfato, freqüentemente utilizado em cromatografia) é evitado (73).

O *electrospray* auxiliado por meio pneumático, também conhecido como eletronebulização é um método adotado para solucionar o problema, pois ele é capaz de transferir as fases líquidas eluídas proveniente da cromatografia líquida para o espectrômetro de massa através de uma pequena fragmentação do analito e

obtenção de espectros de massa simples (73). Mas para isso requer que o solvente cromatográfico tenha uma força iônica pequena, de modo que os íons do tampão não encubram os íons do analito no espectro de massa (73).

No processo descrito por Swaya (2006), a solução com o analito ionizado proveniente do sistema de *HPLC* é inserida no espectrômetro de massa, numa dada vazão através de um capilar ao qual é aplicado um alto potencial positivo para promover a separação de cargas, ou potencial negativo para promover a desprotonação. O nitrogênio é geralmente usado como gás de nebulização, e através da divisão e evaporação das gotas contendo em excesso de carga (positivas ou negativas dependendo do modo de aquisição) os íons são transferidos para fase gasosa e atraídos para dentro do espectrômetro de massa por um gradiente de potenciais. Uma contra corrente de nitrogênio é aplicada para evitar a formação de agregados de íons (*clusters*) e entrada de moléculas neutras para o espectrômetro de massa.

Submete-se uma solução da amostra de pH ácido ou básico a um *spray* eletrolítico sob pressão atmosférica, formando um fino *spray* (aerossol). Na presença de um alto campo elétrico, como por exemplo de +4500 V ou -4500 V. O contra-íon é oxidado (ou reduzido) e formam-se gotas com excesso de carga positiva (ou negativa). O solvente é evaporado reduzindo o volume das gotas, subdividindo-as (79).

Devido à alta repulsão entre os íons de mesma carga, ocorre à formação de gotas contendo apenas um íon (modelo CRM), ou os íons evaporam e são “ejetados” das gotas para a fase gasosa (modelo IEM de evaporação). (80).

Já em estado gasoso os íons deslocam-se para dentro do espectrômetro de massa onde se encontra um analisador de massa quadrupolar. Esses analisadores são compostos de quatro barras paralelas e cilíndricas de aço inox, onde as barras opostas são conectadas eletricamente, e nas barras adjacentes aplicam-se uma voltagem e uma radio frequência (RF), que promovem a oscilação iônica dentro dos quadrupolos. E de acordo com a voltagem e a radio frequência aplicadas, apenas

uma relação massa carga (m/z) apresenta trajetória estável dentro do quadrupolo, atingindo o detector (79).

Essa relação m/z pode ser fixa permitindo a passagem de compostos que apresentem a relação m/z de interesse, ou pode variar permitindo a varredura e subsequente detecção de todos os íons no quadrupolo (79).

1.9 Ionização por *electrospray* (ESI)

A ionização por *electrospray* (ESI) e a ionização química a pressão atmosférica (APCI) são as duas fontes bastante utilizadas para a ionização à pressão atmosférica. Quando a amostra é ionizada a pressão atmosférica, a eficiência desta ionização é de 10^3 a 10^4 vezes maior que em pressão reduzida (79).

Por trabalhar com moléculas em solução e ser compatível com os solventes freqüentemente usados em HPLC por fase reversa (metanol, água e acetonitrila), a ESI pode ser usada como interface entre separações por *HPLC* e identificação dos compostos por espectrometria de massa simples (MS) ou MS/MS. Para facilitar a protonação de sítios básicos ou a desprotonação de sítios ácidos, é comum adicionar um modificador à solução. Para analisar moléculas com sítios básicos é adicionado geralmente ácido fórmico na solução e para sítios ácidos adiciona-se geralmente de hidróxido de amônio. Adiciona-se também o acetado de amônio que atua como tampão, ou seja, evita variações bruscas de pH durante o processo (79).

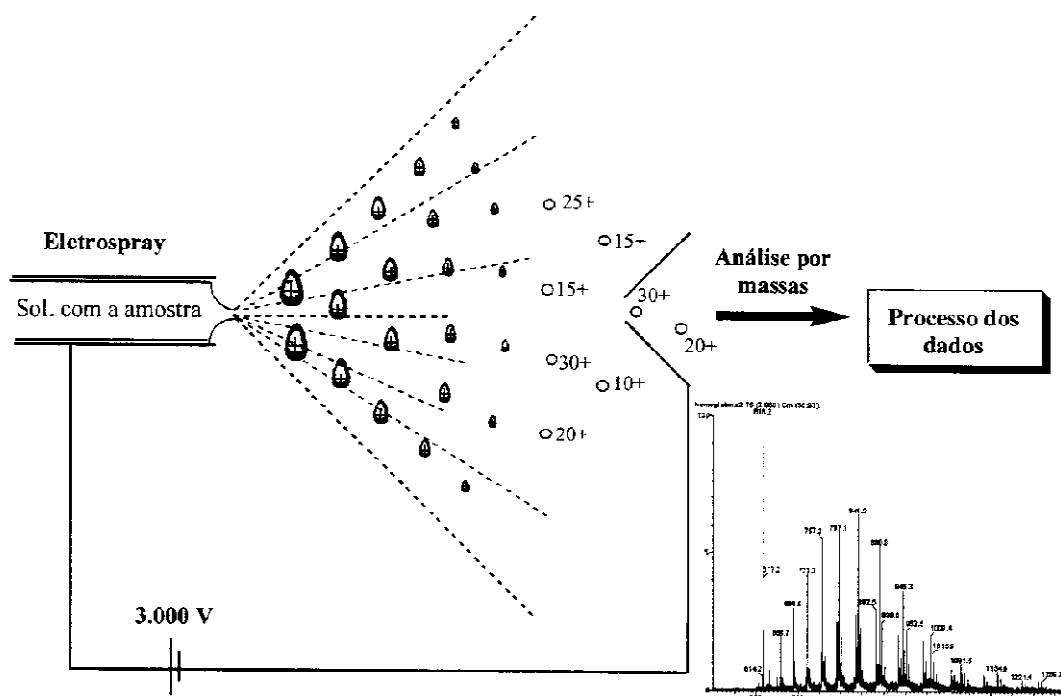


Figura 13: Ionização por *electrospray* (ESI).

1.10 Efeito Residual (Carry Over)

Os efeitos residuais podem causar grandes interferências estatísticas na bioequivalência entre duas formulações, por esse motivo é de suma importância definir o período de eliminação durante a realização de um planejamento de estudo (81).

Segundo Chang “o período de eliminação é definido como o intervalo de tempo suficiente entre dois períodos de administração para que o efeito residual de uma formulação administrada em um período seja eliminado até o próximo.” Essa definição se baseia no valor de meia-vida de eliminação do fármaco. Geralmente considera-se um período de 5 meias-vidas tempo suficiente para a eliminação de até 96,9% do fármaco do organismo (81).

Se um fármaco apresenta um tempo de meia-vida longo e o período de eliminação não for planejado adequadamente, o efeito residual do primeiro período

de administração vai interferir na análise do segundo período, de modo que os dados estatísticos gerados no segundo período não será o dado da amostra independente, e sim o da amostra somado ao resíduo remanescente no organismo do indivíduo em estudo (81, 82).

1.11 Efeito de matriz (supressão iônica)

A presença de compostos interferentes provenientes da matriz e/ou do processo de extração resulta no efeito de matriz. Interferentes com menor volatilidade podem danificar a eficiência do processo evaporativo do solvente, resultando em uma alteração na quantidade de íons em estado gasoso na entrada do detector, e conseqüentemente ocasionando o comprometimento de detecção do analito e a repetibilidade dos resultados devido ao aumento ou diminuição do sinal do íon analisado (83).

Esta interferência pode ocorrer no momento de injeção, ou ainda ser resultante de um tempo de eluição maior do que tempo da corrida analítica, interferindo nas injeções subseqüentes. Por exemplo, numa corrida de 4 minutos com tempo de retenção de 2,5 minutos para o analito, pode ocorrer um interferente da matriz que diminua o sinal do íon analisado e que elua no mesmo tempo que o analito. Caso este interferente elua em 15 minutos, então só será percebido após a terceira amostra (83, 84).

1.12 Validação do método analítico

A validação metodologias analíticas é um processo de fundamental importância no que se refere à garantia da qualidade, pois através desta, busca-se fornecer em toda sua amplitude, as evidências necessárias para se promover confiabilidade, reprodutibilidade, e segurança de ensaios analíticos (85). Validar uma metodologia consiste em comprovar através de dados empíricos aliados a estudos estatísticos e fornecer uma evidência documentada de que o método atenda as

exigências limitantes pré-estabelecidas, permitindo assim sua reprodutibilidade, sem desconsiderar a confiabilidade dos resultados analíticos (85).

No que tange medicamentos, é necessário que sejam estabelecidos padrões ou níveis de qualidade idealizados para cada produto, para tanto, os laboratórios que validam metodologias analíticas relacionadas a fármacos devem seguir as normas referentes às Boas Práticas de Laboratório, garantindo dessa forma que os resultados analíticos obtidos consistam em informações confiáveis, em um patamar mínimo de variabilidade (86).

A realização do processo de validação exige algumas etapas e aspectos previamente definidas, como o envolvimento de pessoal qualificado, treinado e motivado, as condições do ambiente laboratorial, o uso de equipamentos calibrados ou qualificados e a utilização de materiais, soluções e reagentes analíticos de procedência confiáveis, devidamente preparados, padrões e substâncias químicas de referência compatíveis e rastreáveis (86).

Segundo Gil e Batista filho (2007) “a validação do método analítico se inicia na verdade pela qualificação dos equipamentos e dos operadores, calibração de vidrarias e equipamentos de medição entre outros cuidados”.

Um método analítico deve ser validado sempre que seja necessário verificar a adequação de seu desempenho e eficácia, seja na revisão de método específico, para incorporar melhorias ou estendê-lo a novas aplicações, ou para comprovar a equivalência entre duas metodologias analíticas, ou ainda objetivando, para um método previamente estabelecido, um escopo de abrangência mais amplo envolvendo diferentes laboratórios, além de analistas e instrumentos distintos (86).

No curso de uma análise, são raras as ocasiões em que se tem o analito livre de uma matriz, da qual deva ser extraído. Seja em uma formulação farmacêutica, em um extrato vegetal ou em um fluido biológico, sempre haverá uma matriz respeitando-se níveis distintos de complexidade. Esta poderá interferir de forma diferenciada nas etapas da análise. A validação do processo extrativo é intrínseca à determinação da precisão e exatidão do método (86).

Os critérios empregados na validação de métodos analíticos são complexos e dependem fundamentalmente do objetivo analítico do ensaio (85). Os ensaios relacionados com a biodisponibilidade ou estabilidade física de medicamento são classificados como ensaios de qualidade, e para estes, são atributos necessários, a exatidão e a especificidade, como por exemplo, ensaios físicos (dureza, friabilidade, tempo de desintegração) e físico-químicos (pH, intervalo de fusão, solubilidade) (85).

Idealmente, um método analítico deve ser exato e preciso para fornecer valor real em um número pequeno de ensaios, deve ser seletivo para que a exatidão não desvie com interferentes potenciais, ser sensível ou capaz de determinar as menores concentrações possíveis e, enfim, responder de forma proporcionalmente linear, ao longo de uma ampla faixa de concentração (85).

A definição dos parâmetros inerentes à validação do processo analítico, bem como os critérios de aceitação do método para cada um desses parâmetros e os limites até quais os estudos serão destinados, são fixados antes do início do processo (86). Dentre os principais parâmetros estão, a exatidão, precisão, recuperação, seletividade (especificidade), linearidade, sensibilidade (limite de detecção e limite de quantificação), estabilidade e robustez (85).

Embora inexista uma seqüência oficial obrigatória para a execução da validação, existe uma ordem que pode ser considerada lógica, em vista da complexidade crescente no que se refere às etapas. Os parâmetros da validação de metodologias analíticas encontram-se no diagrama descrito abaixo (Figura 14), seguido pelas suas descrições.



Figura 14: Parâmetros de validação para uma metodologia analítica.

1.12.1 Seletividade / especificidade

Especificidade é a capacidade do método em avaliar, inequivocamente, o analito, na presença de componentes que poderão dificultar a análise, como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Embora certas diretrizes compreendam seletividade e especificidade como equivalentes, orientações IUPAC e AOAC aplicam seletividade, pois consideram que somente as situações de métodos inerentemente seletivos podem permitir o emprego do termo especificidade (86).

Este parâmetro diz respeito à verificação da habilidade do método em não ser afetado por substâncias, que poderão interferir durante o curso da análise, seja advinda de excipientes ativos contaminados, degradado, residual de produtos de limpeza ou aqueles detectáveis no estudo de estabilidade, natural ou sob estresse.

No caso de fluído biológico é possível citar os componentes biológicos, proteínas, lipídeos, etc., metabolitos e produtos de degradação, reagentes utilizados na preparação da amostra (86).

Em um método quantitativo, no grau de seletividade deverá ser comprovado que o item sobre análise é quantificado independente dos eventuais interferentes presentes (86). Para sua determinação é feito teste de soluções-padrão e amostra, ou ainda do respectivo padrão de referência, na presença de componentes que poderiam interferir com a sua determinação sendo essa expressa pela concordância entre resultados obtidos para a solução-padrão e a amostra ou entre a solução-padrão com e sem interferentes (85).

A seletividade pode ser expressa através da fórmula:

$$C\% = (T_{\text{sol. padrão}} / T_{\text{sol. amostra}}) \times 100$$

Onde: C% = porcentagem de concordância

$T_{\text{sol. padrão}}$ = Teor da solução-padrão

$T_{\text{sol. amostra}}$ = Teor da solução-amostra

Para valores superiores a 100% admite-se que os interferentes contribuem ao sinal analítico, enquanto para valores inferiores a 100% submete-se que os interferentes suprimem sinal analítico (85).

1.12.2 Linearidade

É a extensão estabelecida na curva de calibração de um determinado método analítico que se responde de forma diretamente proporcional, ou seja, diz respeito à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância-teste dentro dos limites de variação (85).

Existem vários métodos para a verificação da linearidade, desde a comparação visual, até métodos estatísticos mais complexos. Para determinação da

linearidade de um método analítico é necessário que se obtenha a reta de calibração com, no mínimo, cinco pontos. A partir desta, obtêm-se a equação da reta ($Y=bx + a$) e demais parâmetros, tais como ponto de intersecção em Y (a), inclinação (b) e coeficiente de correlação (R). (85). Entretanto, apenas o coeficiente de correlação (R) pode não se constituir em indicador adequado da linearidade, devendo-se adicionalmente, proceder à verificação visual quanto ao ajuste da reta e o coeficiente de correlação. Assim pode-se considerar satisfatórias as curvas com $R^2 \geq 0,998$, desde que evidenciando também adequação satisfatória, e que a correlação não demonstre desvio significativo (86).

Uma vez que o método apresenta linearidade na faixa de trabalho escolhida, é necessário que se avalie eventual interferência da matriz onde o analito se encontra sobre a linearidade.

A matriz não pode influenciar sobre a linearidade, porém, pode produzir efeito somatório ou multiplicativo, ou ainda associação destes efeitos. Em condições ideais a matriz não deve promover influências sobre a linearidade, porém no caso de ocorrência de efeito matriz é aconselhável optar pelo desenvolvimento de uma nova metodologia ou adaptar o método, incorporando o emprego de branco que contenha a matriz sem a substância analisada, o que nem sempre é aplicável (86).

1.12.3 Sensibilidade

A sensibilidade de um método pode ser definida como a capacidade que ele tem de avaliar baixas concentrações de um determinado analito.

Existem dois parâmetros para avaliar a sensibilidade de um método, o limite de detecção e o limite de quantificação, estes referem-se respectivamente, a menor quantidade do item a ser analisado, capaz de ser detectada com satisfatório grau de certeza e à menor quantidade deste item capaz de ser quantitativamente determinada com graus de precisão e exatidão aceitáveis (86). Para a determinação da sensibilidade de um método são utilizadas concentrações conhecidas e decrescentes do fármaco até menor nível (85).

O que difere na determinação do limite de detecção e quantificação é o peso dado a cada parâmetro. Para a determinação do LD e LQ empregam-se, respectivamente, as fórmulas:

$$\text{LD} = (\text{desvio padrão médio} / \text{inclinação da reta}) \times 3$$

$$\text{LQ} = (\text{desvio padrão médio} / \text{inclinação da reta}) \times 10$$

Tais limites correspondem ao desvio padrão do intercepto com o eixo Y de várias curvas de calibração construídas, contendo concentrações do fármaco próximas aos limites de detecção e quantificação, respectivamente multiplicados por 3 e 10, e a seguir dividido pela inclinação da curva de calibração (86).

Como se pode ver por essas equações, os valores de LQ são, naturalmente, maiores que os valores de LD, já que as concentrações mínimas para uma detecção segura seriam obviamente menores que as concentrações mínimas necessárias a sua quantificação precisa e exata. (85).

1.12.4 Precisão

Precisão é o grau de repetibilidade entre os valores obtidos em análises individuais ou número de dados significativos obtidos em uma análise que podem ser utilizados na emissão de um resultado. A precisão relaciona-se a repetibilidade dos resultados obtidos em uma mesma análise, ou reprodutibilidade do método quando executado em diferentes condições. Dados estatísticos, como repetibilidade, reprodutibilidade, desvios e coeficiente de variância, bem como outros parâmetros usuais de validação e testes de rejeição, são fundamentais para a sua avaliação. O cálculo do desvio padrão relativo (DPR) é um bom indicador do grau de dispersão dos resultados, e oferece valores absolutos que permitem análises independentemente das médias (85).

Assim, a precisão pode ser expressa pela formula:

$$\text{CV\%} = (\text{Desvio Padrão} / \text{Média}) \times 100$$

O limite de dispersão aceitável depende em grande parte, da concentração da substância analisada na amostra, da sensibilidade do método e do número de etapas preparatórias necessárias antes da análise, ou seja, para métodos que envolvam pesagens e dissolução aceitam-se valores entre 1 e 2%. Porém, em situações mais complexas, que exijam operações múltiplas ou delicadas de extração, derivação, ou análise de traços, esses valores podem chegar a 5 ou 10%. Esse fator justifica a importância de se trabalhar com placebo, de forma a simular todo o processo farmacotécnico, na perda do princípio ativo incorporado, no momento final (86).

Para a determinação desse parâmetro são necessárias várias medições de uma mesma amostra tratada de forma idêntica.

A precisão está associada, estatisticamente, à repetitividade, máxima diferencial aceitável em medições individuais quando se tem o conjunto: mesma amostra, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo ajuste, mesma calibração (85).

1.12.5 Exatidão

A adequada recuperação da substância analisada, em uma amostra simulada irá definir a exatidão do método. O parâmetro exatidão diz respeito ao grau de concordância entre os resultados encontrados pelo método e um valor aceito como referência (86).

Para validar um método quanto a esse parâmetro devem-se utilizar concentrações conhecidas de um padrão de referência primário específico e comparar os valores medidos com valores verdadeiros. Na área farmacêutica possibilidade de se obter uma matriz que represente fielmente a amostra a ser analisada e totalmente palpável, tendo em vista a disponibilidade de um placebo do

produto (86). As concentrações usuais cobrem em geral a faixa de 50% a 70% da concentração do produto para qual o método foi desenvolvido (85).

A definição da exatidão deve, pelo menos, incluir um ponto de baixa concentração (menor ou igual a 3 vezes o limite de quantificação), um ponto na concentração média esperada e um ponto de alta concentração (de 75-90% da maior concentração da curva de calibração), e a farmacopéia americana recomenda que cada um desses pontos sejam analisados em triplicata (86).

A exatidão é expressa pela equação:

$$\text{Exatidão} = (\text{CME} / \text{CT}) \times 100$$

Onde: CME = Concentração Média Experimental

CT = Concentração Teórica (85).

1.12.6 Recuperação

Este parâmetro avalia a eficiência do método de tratamento da amostra, através da comparação de três concentrações conhecidas (baixa, média e alta) do composto referência, com três concentrações (supostamente iguais a do composto referência) da substância-teste. As análises são feitas em triplicata, e a recuperação pode ser expressa pela seguinte fórmula:

$$\text{Recuperação \%} = (\text{Valor obtido} / \text{Valor adicionado}) \times 100$$

Onde o valor obtido representa a amostra, e o valor adicionado representa o composto, referência o qual será feita a comparação.

1.12.7 Robustez

É a capacidade de um método se manter inalterado quando submetido a pequenas, mas deliberadas variações, esperadas como possíveis, durante o seu uso

normal (86). A robustez se relaciona à precisão e vulnerabilidade que o método tem de ser afetado por pequenas variações das condições de ensaio.

Em outras palavras, é a capacidade do método de não ser afetado por irregularidades sutis e em geral de difícil controle, as quais são causas comuns de erros indeterminados. Entre os fatores deliberadamente investigados, na avaliação da robustez de um método, destacam-se temperatura, pH, grau de pureza de reagentes, composição da fase móvel, velocidade de fluxo, e até a iluminação do ambiente.

É importante dizer que nenhum método pode ser robusto o suficiente para tolerar grandes variações desses parâmetros. (85).

Devido a sua vulnerabilidade, as medidas analíticas devem ser controladas de forma a não invalidar os resultados obtidos. Variações típicas que, portanto merecem controle diário, inclui estabilidade de soluções analíticas, emprego eventual de equipamento distinto e analistas diferentes. No caso de cromatografia líquida, o controle diário engloba pH de fase móvel e composição da mesma, diferentes lotes de fornecimento de colunas, temperatura e velocidade do fluxo.

1.13 Etapa estatística

Os estudos de bioequivalência são a comprovação empírica para a avaliação da equivalência terapêutica entre medicamentos. Através da análise de bioequivalência se obtém a garantia de intercambialidade segura entre equivalentes farmacêuticos com qualidade e eficácia comprovadas (81).

Mede-se a biodisponibilidade a partir da concentração de fármaco no sangue, supondo-se que haja uma relação direta entre a concentração do fármaco no plasma e sua concentração no sítio de ação. Essas medidas envolvem a variação do pico de concentração plasmática (C_{max}) e o tempo em que se atinge o pico de concentração (T_{max}) através da interpolação dos dados. A área sob a curva de concentração sanguínea *versus* tempo medido do instante zero ao instante t (ASC_{0-t}), no qual t corresponde ao tempo relativo à última concentração determinada

experimentalmente. A área sob a curva de concentração sanguínea *versus* tempo calculado do instante zero ao instante infinito (ASC_{0-inf}), onde $ASC_{0-inf} = ASC_{0-t} + C_t/l_z$, e C_t é a última concentração do fármaco determinada experimentalmente e l_z é a constante de eliminação da fase terminal. A ASC_{0-t} deve ser igual ou superior a 80% da ASC_{0-inf} (81).

1.13.1 Desenhos experimentais para estudos de biodisponibilidade relativa / bioequivalência

Para estudos de bioequivalência / biodisponibilidade a legislação brasileira recomenda que o desenho da pesquisa deve identificar questões científicas a serem respondidas, os fármacos e formas de dosagens bem como os métodos analíticos empregados (81)

O planejamento ideal de experimento deve minimizar a variabilidade proveniente de várias fontes:

- ✓ Variabilidade inter-individual;
- ✓ Variabilidade intra-individual;
- ✓ Tratamentos precedentes e o conseqüente efeito nos períodos que pode ser causado por ação residual;
- ✓ Erro experimental;
- ✓ Variabilidade associada a tratamentos diferenciados, como administração de produtos ou dosagens diferentes.
- ✓ Desta forma, um delineamento adequado possibilita identificar e isolar a variabilidade inter-individual na análise de dados.

1.3.1.1 Delineamento cruzado (*crossover*)

Obtém-se um delineamento cruzado através da utilização de desenhos experimentais de blocos completamente randomizados, ou seja, os indivíduos de estudo são alocados aleatoriamente em diferentes grupos, nos quais receberão a formulação teste e referência em diferentes períodos de confinamento (81).

Os indivíduos de cada grupo recebem uma seqüência diferente da formulação, ou seja, no primeiro período de confinamento será administrado tanto o medicamento teste quanto o referência entre os voluntários de forma que os mesmos não estejam cientes de qual formulação estão ingerindo. Dessa forma, no segundo período de confinamento será administrada a formulação diferente da ingerida no primeiro período, de modo que todos os voluntários tenham ingerido as medicações teste e referência (81).

As vantagens desse planejamento são a consequência de que cada indivíduo do estudo é o seu próprio parâmetro de controle, pois permite a comparação do estudo em um organismo. Assim a variabilidade interindividual do estudo é removida, ocasionando em estimativas não viciadas para a diferença (ou razão) entre as formulações (81).

2. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo, a avaliação do perfil farmacocinético de dois medicamentos anti-hipertensivos contendo associação de Losartana 100mg + Hidroclorotiazida 25mg, na forma farmacêutica de comprimidos revestidos, utilizando um método bioanalítico apropriado e validado, de determinação simultânea de ambos fármacos, para avaliação da biodisponibilidade relativa, utilizando-se os critérios de bioequivalência.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Descrição do desenho do estudo

O estudo foi designado para avaliar a biodisponibilidade relativa de dois produtos contendo losartana 100 mg + hidroclorotiazida 25 mg na forma de comprimido revestido.

O estudo foi esquematizado, para que se obtenham os parâmetros farmacocinéticos relevantes, para a comparação estatística, visando à averiguação de bioequivalência. Neste estudo, tais parâmetros, são obtidos diretamente a partir da determinação da concentração plasmática do princípio ativo do medicamento, baseado na aplicação de um modelo não compartimental, próprio para avaliação destas concentrações após a administração do medicamento por via oral.

O estudo foi aberto, randomizado, cruzado, com 2 tratamentos, 2 seqüências, 2 períodos, onde os voluntários receberam, em cada período, a formulação teste ou a formulação referência. A seqüência de tratamento (Tabela 5) atribuída a cada voluntário nos períodos de estudo foi determinada por uma lista de randomização, gerada automaticamente pelo sistema SCPCM (Sistema de Controle de Pesquisas Clínicas de Medicamentos). Vale ressaltar, que foi considerado previamente, o balanceamento dos voluntários em função do sexo.

Tabela 5: Definição da seqüência de tratamento dos voluntários.

Voluntário (Seqüência)	Período de Tratamento I Código do Tratamento	Período de Tratamento II Código do Tratamento
1	Teste	Referência
2	Referência	Teste
3	Teste	Referência
4	Referência	Teste
5	Teste	Referência
6	Teste	Referência
7	Referência	Teste
8	Referência	Teste
9	Referência	Teste
10	Referência	Teste
11	Teste	Referência
12	Teste	Referência
13	Teste	Referência
14	Teste	Referência
15	Referência	Teste
16	Teste	Referência
17	Teste	Referência
18	Referência	Teste
19	Referência	Teste
20	Teste	Referência
21	Referência	Teste
22	Referência	Teste
23	Teste	Referência
24	Referência	Teste
25	Referência	Teste
26	Teste	Referência
27	Referência	Teste
28	Teste	Referência

As formulações foram administradas em dose única, por via oral seguidos de coletas de sangue de pelo menos 3 meias vidas. Os períodos de tratamento obedeceram um intervalo mínimo de 7 meias-vidas entre eles (período de eliminação da droga pelo organismo).

3.2 Equivalência farmacêutica

Antes de passar por análises de bioequivalência é necessário submeter os medicamentos que serão registrados á ensaios físico-químicos. As análises são realizadas no intuito de verificar a qualidade dos medicamentos testados. O ensaio avalia os medicamentos teste e referência segundo a mesma metodologia, podendo esta ser obtida de monografias oficiais (farmacopéias) ou na ausência das mesmas, por métodos validados fornecidos por indústrias e posteriormente co-validados.

3.3 Etapa clínica

A finalidade da Etapa Clínica é a coleta de amostras de sangue dos voluntários para medir (na Etapa Analítica) níveis plasmáticos da droga após sua administração oral.

Os voluntários foram confinados na Clínica São Lucas. O hospital possui uma unidade para ensaios clínicos com 30 leitos e posto de enfermagem no qual dispõe de carrinho de emergência com desfibrilador, monitor cardíaco, oxímetro de pulso, respirador, material para pequena cirurgia e com medicação de urgência para qualquer eventualidade. Além disso, conta com uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI).

A biodisponibilidade comparativa das formulações seguida à administração oral foi avaliada com base em comparações estatísticas de parâmetros farmacocinéticos relevantes, obtidos de dados de concentração sanguínea da droga.

3.3.1 População do estudo e dados clínicos para seleção e recrutamento

A amostra populacional foi de 28 voluntários saudáveis, adultos, quatorze homens e quatorze mulheres não grávidas e não lactantes, com idades entre 18 e 50 anos, sem distinção de raça, os quais foram recrutados entre aqueles que se apresentaram ao Centro Clínico. Não ocorreram desistências ou retirada de voluntários.

Os voluntários foram aceitos no estudo somente se considerados saudáveis, a juízo médico, com base na história clínica (Tabela 6), exame físico e os exames laboratoriais pré-estudo e pós-estudo que antecedem a admissão no estudo.

Tabela 6: Amostragem dos dados da histórica clínica pré-estudo.

Voluntário	Pressão (mmHg)	Frequência Cardíaca (bpm)	Temperatura (°C)	Abuso de Álcool / Drogas	Fumante	Doador de Sangue
1	125/75	68	36,6	Não	Nunca Fumou	Não
2	134/68	69	35,7	Não	Nunca Fumou	Não
3	128/70	67	36,7	Não	Nunca Fumou	Não
4	116/70	77	35,8	Não	Ex-Fumante	Não
5	127/77	68	36,0	Não	Nunca Fumou	Não

Desta forma, para fins de avaliação das condições de saúde, durante o processo de seleção os voluntários, foram realizados os exames conforme apresentado na Tabela 7.

Tabela 7: Relação dos exames laboratoriais agregados ao processo de seleção dos voluntários.

Categoria	Exames
ECG	ECG padrão com 12 derivações.
Análise hematológica	Hemoglobina, hematócrito, contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de glóbulos vermelhos, contagem de plaquetas.
Análise Bioquímica	Uréia, creatinina, bilirrubina total, proteínas totais, albumina, glicose em jejum, fosfatase alcalina, SGOT, SGTP, colesterol total, triglicerídeos, ácido úrico, γ GT.
Urina	Sumário de Urina (Urina I).
Fezes	Proto-Parasitológico.
Sorologia	Análise sorológica para: hepatite B, hepatite C e HIV (I e II) β -HCG para mulheres

Observação: Os resultados dos exames de laboratório serão considerados “normais” quando dentro da faixa de normalidade declarada pelo laboratório. Para resultados numéricos, os valores até 10% fora da faixa de normalidade declarada serão ainda considerados como “normais”. O eletrocardiograma (Anexo 3) foi avaliado por um cardiologista da equipe de avaliação clínica, que informou se os achados específicos foram julgados como normais, anormais clinicamente não significativos (NCS) ou anormais.

3.3.2 Critérios de inclusão do voluntário

Os seguintes critérios foram satisfeitos para que o voluntário participasse do estudo:

- ✓ Homens e mulheres não grávidas e que não estejam amamentando;
- ✓ Idade entre 18 a 50 anos;

- ✓ O voluntário que teve seu índice de massa corpórea maior ou igual a 19 e menor ou igual a 28;
- ✓ Boas condições de saúde ou ausência de doenças significativas, a juízo de um profissional de enfermagem e médico legalmente habilitados, de acordo com às regras definidas no Protocolo, e avaliações a que foi submetido: história clínica, medidas de pressão que será considerada como normal dentro dos seguintes limites: 100-140 mmHg para a sistólica e 60-90 mmHg para a diastólica, pulso, exame físico e psicológico, ECG, e exames laboratoriais complementares;
- ✓ Capacidade de compreensão da natureza e objetivo do estudo, inclusive os riscos e efeitos adversos e com intenção de cooperar com o pesquisador e agir de acordo com os requerimentos de todo o ensaio, o que veio a ser confirmado mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.3.3 Critérios de exclusão do voluntário

3.3.3.1 Problemas relacionados com a droga

- ✓ O voluntário que teve sabidamente uma hipersensibilidade a droga estudada (losartana + hidroclorotiazida) ou a compostos quimicamente relacionados; história de reações adversas sérias ou hipersensibilidade a qualquer droga;
- ✓ Uso de terapia de manutenção com qualquer droga excetuando-se anticoncepcionais por via oral.

3.3.3.2 Doenças ou problemas de saúde

- ✓ História ou presença de doenças hepáticas ou gastrointestinais ou outra condição que interfira com absorção, distribuição, excreção ou metabolismo da droga;

- ✓ História de doença hepática, renal, pulmonar, gastro-intestinal, epilética, hematológica ou psiquiátrica, tem hipo ou hipertensão de qualquer etiologia que necessite de um tratamento farmacológico; tem história ou teve infarto do miocárdio, angina e/ou insuficiência cardíaca;
- ✓ Os resultados dos exames laboratoriais fora dos valores considerados normais de acordo com as normas deste protocolo, a menos que sejam considerados clinicamente irrelevantes pelo investigador.

3.3.3.3 Hábitos e dependências

- ✓ Voluntário fumante;
- ✓ O voluntário com ingestão maior que cinco xícaras de café ou chá por dia;
- ✓ História de abuso de álcool ou drogas.

3.3.3.4 Condições encontradas nos dias ou meses que antecedem o estudo:

- ✓ Fez uso de medicação regular dentro das 2 semanas que antecederam o início do tratamento e a data de avaliação, ou fez uso de qualquer medicação dentro de uma semana, excetuando-se anticoncepcionais por via oral;
- ✓ Foi internado por qualquer motivo entre 8 semanas do início do primeiro período de tratamento deste estudo e a data da avaliação;
- ✓ Tratamento dentro dos 3 meses prévios ao estudo com qualquer droga conhecida de ter um potencial tóxico definido nos grandes órgãos;
- ✓ O voluntário participou de qualquer estudo experimental ou ingeriu qualquer droga experimental dentro dos três meses que antecedem o início deste estudo e a data da avaliação;

- ✓ O voluntário doou ou perdeu 450 mL ou mais de sangue dentre dos três meses que antecederam ao estudo ou que doou mais de 1500 mL dentro dos 12 meses entre o início do tratamento do estudo e a data de avaliação.

3.3.3.5 Outras condições

- ✓ História de reações adversas sérias ou hipersensibilidade a qualquer droga;
- ✓ Teste positivo de gravidez para as voluntárias mulheres;
- ✓ O voluntário teve qualquer condição que o impedisse de participar do estudo pelo julgamento do investigador.

3.3.4 Critérios de retirada do voluntário

Solicitação por parte do voluntário para que seja retirado do estudo a qualquer momento:

- ✓ Voluntário não desejou continuar no estudo por razões pessoais (ou mesmo sem razão);
- ✓ Voluntário não desejou continuar no estudo devido aos eventos adversos da droga (efeitos não desejáveis possivelmente relacionados a droga em estudo);
- ✓ Voluntário não desejou continuar por outras razões que não compreendem eventos adversos, tais como: indisponibilidade, intolerância aos procedimentos do estudo ou mesmo vontade própria.

O investigador do estudo poderia retirar o voluntário do estudo por uma das seguintes razões:

- ✓ Resposta positiva à reavaliação de qualquer um dos critérios de exclusão, no momento da admissão ao primeiro período do estudo ou em ocasião subsequente;

- ✓ Não aderência às exigências do protocolo;
- ✓ Eventos adversos ou sintomas ou sinais de possível toxicidade;
- ✓ Doença intercorrente requerendo medicação;
- ✓ Qualquer outra condição que, a juízo do investigador, foi do interesse para manutenção da saúde do voluntário.

A adesão às restrições quanto ao uso de medicamentos, limitações dietéticas e demais restrições definidas no Protocolo foram investigadas inicialmente através de questionamento ou observação direta por parte do investigador e coordenador do estudo no momento do confinamento, antes da administração do medicamento e por observação direta durante o período de confinamento.

Foi especificamente investigado, no primeiro e no segundo confinamento, se o voluntário:

- ✓ Fez uso de qualquer medicamento durante os 14 dias que precederam o confinamento ou durante o intervalo entre os confinamentos;
- ✓ Foi hospitalizado, ou por qualquer motivo, doou ou perdeu sangue;
- ✓ Suspeita de gravidez ou amamentação (sexo feminino);
- ✓ Fez uso de cafeína ou produtos que contenham xantina (chocolate, chá, café, colas, etc.) nas 48 horas antes do confinamento;
- ✓ Fez uso de álcool ou drogas psicotrópicas;
- ✓ Fez algum exercício físico intenso nas 12 horas antecedentes ao horário previsto para o início da medicação;
- ✓ Deixou de cumprir com as restrições de jejum estabelecidas.

Se houvesse qualquer dúvida sobre o uso de álcool, poderia ser feito um teste para detecção de bebida alcoólica.

Se o voluntário admitisse ingestão de droga, o Investigador Clínico e o Investigador Principal iriam decidir se seria permitido que o voluntário permanecesse no estudo, dependendo da droga usada, do tipo de droga e da dose. A hora em que a droga foi ingerida seria anotada no CRF (Formulário de Relato de Caso).

Se o voluntário admitisse o não cumprimento das demais restrições, o Investigador Clínico e o Investigador Principal deveriam também decidir sobre sua permanência no Estudo, documentando o fato (e a decisão) no CRF.

3.3.5 Coleta de amostras

Após um período mínimo de 10 horas de jejum, o ensaio teve início com a coleta de 8 mL de sangue de cada voluntário mantendo assim a padronização da metodologia. Vinte e oito voluntários foram selecionados para a realização do estudo.

Os tempos de coleta para losartana e hidroclorotiazida, bem como a descrição dos horários nos quais foram realizados o acompanhamento da pressão arterial, pulso e temperatura de cada voluntário encontram-se descritos na Tabela 8.

Tabela 8: Cronograma das coletas das amostras.

Tempo (h:min)	Losartana	Hidroclorotiazida	Atividades
00:00	Coleta de sangue	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura
00:15	Coleta de sangue		
00:20		Coleta de sangue	
00:30	Coleta de sangue		
00:40		Coleta de sangue	
00:45	Coleta de sangue		
01:00	Coleta de sangue	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura
01:20	Coleta de sangue	Coleta de sangue	
01:40	Coleta de sangue	Coleta de sangue	
02:00	Coleta de sangue	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura
02:20		Coleta de sangue	
02:30	Coleta de sangue		
02:40		Coleta de sangue	
03:00	Coleta de sangue	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura
03:30		Coleta de sangue	
04:00	Coleta de sangue	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura
05:00	Coleta de sangue	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura
06:00	Coleta de sangue	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura
08:00	Coleta de sangue	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura
10:00	Coleta de sangue	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura
14:00	Coleta de sangue	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura
24:00	Coleta de sangue	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura
48:00		Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura

Após a realização de cada tempo de coleta, as amostras de sangue foram transferidas para tubos de polipropileno contendo heparina, transportadas em estantes dentro de caixas de isopor contendo gelo e centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, uma alíquota de 2,5 mL de plasma, foi transferida para o primeiro tubo criogênico e o plasma restante, para o segundo tubo, obtendo-se assim a amostra em duplicata. Cada tubo foi devidamente identificado com número e código respectivo a cada voluntário, fase do estudo, data da administração da droga, tempo de coleta, nome e número do estudo.

Em seguida foram colocados em sacos plásticos identificados, lacrados e armazenados no freezer (-20 °C), onde foram armazenadas. A identificação e manipulação das amostras foram realizadas conforme as Boas Práticas de Laboratório (BPL).

O projeto de pesquisa, com o protocolo experimental e o termo de consentimento, foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP - credenciado pelo CONEP - Conselho Nacional de Saúde/MS.

O estudo foi conduzido de acordo com a Declaração de Helsinque (1964) e as revisões de Tóquio (1975), Veneza (1983), Hong Kong (1989), Somerset Oeste (1996) e Edinburgh (2000), assim como as regulamentações locais (Resoluções 196/96 e 251/97 do CNS-MS, bem como Resolução RDC 135/03 da ANVISA).

3.4 Etapa analítica

A Etapa Analítica define a fase de quantificação dos fármacos e conseqüente obtenção dos dados destinados à fase estatística. Na realização da metodologia foram requeridos equipamentos específicos, reagentes especiais e padrões de referência.

3.4.1 Equipamentos e acessórios

Tabela 9: Equipamentos utilizados no estudo analítico.

Equipamento	Fabricante
Espectrômetro de massa API 2000; <i>software Analyst</i> , v. 14	<i>Sciex/Applied Biosystems</i> , Brasil
HPLC 1100 com bomba quaternária	<i>Agilent</i>
Pipetas P20, P100, P200, P1000 e P5000	Gilson
Tubos de polipropileno de 12mL com tampa de pressão	FCR
Ponteiras para pipetas	<i>Corning</i>
Agitador vortex	Ika
Mesa agitadora	Nova Ética
Dispensador	Gênus
Repipetador	Gilson
Balança Analítica	Sartorius
Microvials 250 µL	OCP
Tampa de alumínio com sépto	OCP
Banho-de-água	Nova Ética
Purificador de água	Gehaka

3.4.2 Padrões

Tabela 10: Padrões utilizados para validação e quantificação do estudo.

Identificação	Lote	Finalidade
Losartana	05044244	Analito 1
Hidroclorotiazida	1003	Analito 2
Valsartana	CO336	Padrão Interno 1
Clortalidona	7E38F	Padrão Interno 2

3.4.3 Reagentes

Tabela 11: Reagentes utilizados para validação e quantificação do estudo.

Reagente	Abreviação	Marca
Metanol	MeOH	Tedia
Acetonitrila grau HPLC	ACN	Tedia
Acetato de Etila	EtOAc	Tedia
n-Hexano	HEX	Tedia
Éter dietílico	DEE	Tedia
Ácido acético	CH ₃ COOH	JTBaker
Ácido Fórmico	HCOOH	Tedia

3.4.4 Amostras biológicas

As bolsas de plasma utilizadas no preparo da curva de calibração e controles de qualidade foram fornecidas pelo Banco de Sangue do Hospital de São Paulo.

3.4.5 Preparo das soluções

3.4.5.1 Soluções-padrão estoque

Foram preparadas soluções de 1mg/mL de concentração, diluídas em metanol, com exceção da losartana que foi diluída em uma solução de metanol/água (1:1).

3.4.5.2 Soluções-padrão de uso

Foram preparadas soluções nas concentrações de 250 ng/μL e 25 ng/μL para ambos padrões, losartana e hidroclorotiazida, diluídas em metanol/água (1:1). Preparou-se uma solução de padrão interno nas concentrações de 156,25 ng/mL + 125 ng/mL de valsartana e clortalidona, respectivamente.

As soluções de losartana e hidroclorotiazida (250 ng/μL e 25 ng/μL) utilizadas no preparo das soluções-padrão de diluição dos calibradores e dos controles de qualidade.

3.4.5.3 Fase móvel

Com o auxílio de uma proveta de 500 mL mediu-se aproximadamente 100 mL de água, adicionou-se uma alíquota de 0,150 mL de ácido acético e completou-se o volume para 300mL com água. Obtendo-se assim uma solução de ácido acético 0,05%.

Com o auxílio de uma proveta de 1000 mL mediu-se 700 mL de acetonitrila. Acrescentou-se os 300 mL de solução de ácido acético 0,05% e homogeneizou-se obtendo-se uma solução de acetonitrila/ácido acético 0,05%.

3.4.6 Preparo dos calibradores em plasma

O processo de dopagem (preparo de “soluções” do fármaco na matriz biológica) da curva de calibração e controles de qualidade foi realizado pela metodologia de dopagem direta. A dopagem direta consiste em um processo no qual dopa-se cada ponto utilizando uma solução mãe previamente preparada em solvente, levando-se em consideração a porcentagem máxima permitida de solução em plasma.

Segundo a RE 899 a quantidade máxima de solução presente em plasma não deve ultrapassar 2% do volume total do balão volumétrico que será completado com plasma.

Para losartana as concentrações da curva de calibração em ng/mL foram 4; 8; 15; 50; 100; 250 e 500, e dos controles de qualidade em ng/mL 4; 12; 400; 650.

Para hidroclorotiazida as concentrações da curva de calibração em ng/mL foram 4; 8; 15; 50; 100; 400 e 800, e dos controles de qualidade em ng/mL 4; 12; 200; 400.

Tabela 12: Preparação dos calibradores em plasma (curva de calibração).

Analito	Solução de Uso (ng/ μ L)	Volume (μ L)	Volume do Diluente (μ L)	Volume Final (μ L)	Concentração Final (ng/ μ L)
Losartana	40,00	30	1470	1500	800
	20,00	30	1470	1500	400
	5,00	30	1470	1500	100
	2,50	30	1470	1500	50
	0,75	30	1470	1500	15
	0,40	30	1470	1500	8
	0,20	30	1470	1500	4
Hidroclorotiazida	25,00	30	1470	1500	500
	12,50	30	1470	1500	250
	5,00	30	1470	1500	100
	2,50	30	1470	1500	50
	0,75	30	1470	1500	15
	0,40	30	1470	1500	8
	0,20	30	1470	1500	4

3.4.7 Procedimento de extração

- ✓ Identificou-se adequadamente os tubos de polipropileno de 12 mL com tampa de pressão;
- ✓ Pipetou-se 0,2 mL de amostra de plasma e transferiu-se para o respectivo tubo;
- ✓ Adicionou-se 25 μ L do padrão interno;
- ✓ Agitou-se no vórtex por 5 minutos;
- ✓ Adicionou-se 25 μ L de ácido fórmico 1,3%;
- ✓ Agitou-se no vórtex por 5 minutos;
- ✓ Adicionou-se 4 mL de acetato de etila/hexano/éter dietílico (70:15:15);
- ✓ Agitou-se em mesa agitadora a 200 rpm por 5 minutos;

- ✓ Centrifugou-se a 3500 rpm por 2 minutos;
- ✓ Separou-se as fases usando gelo seco;
- ✓ Transferiu-se a fase orgânica para um tubo de vidro;
- ✓ Evaporou-se a 50° C sob fluxo de nitrogênio;
- ✓ Retomou-se com 200 µL de fase móvel;
- ✓ Transferiu-se para os inserts;
- ✓ Fechou-se os inserts e colocou-se na bandeja seguindo a ordem da corrida analítica.

3.4.8 Condições cromatográficas

Tabela 13: Condições cromatográficas utilizadas na validação e quantificação do estudo.

Parâmetro	Condição / Fabricante
Coluna cromatográfica C 8, 150x4,6mm, 5µm	Agilent, mod. Zorbax Eclipse
Pré-coluna C-18, 4x3mm, 5µm	Phenomenex (mod. Germini)
Fase móvel	Acetonitrila/ácido acético 0,05%
Fluxo	0,6 mL/min
Temperatura da coluna	25° C
Temperatura do amostrador	- 10° C
Split	1:2
Volume de injeção	30 µL
Tempo de corrida	4,5 minutos

3.4.9 Condições de ionização

As condições de aquisição são demonstradas em três transições do analito e do padrão interno, sendo que dois íons são utilizados para a identificação e o terceiro para a quantificação (Tabela 14). Os pares de íons em **negrito** foram utilizados na quantificação.

Tabela 14: Condições de ionização utilizadas na metodologia analítica.

FÁRMACO	TRANSIÇÃO		TEMPO DE RETENÇÃO	DWELL TIME (msec)	CE (eV)
Losartana	421,0	> 127,0	2,96 min	80	-24
		> 157,0			-28
		> 179,1			-32
Valsartana	434,2	>179,1	3,44 min	80	-32
		> 178,5			-34
		> 116,1			-22
Hidroclorotiazida	295,9	> 205,1	2,46 min	80	-4
		> 269,0			-8
		> 126,0			-20
Clortalidona	337,0	> 145,9	2,48 min	80	-24
		>189,9			-32
		> 129,0			-28

3.4.10 Critérios de aceitação da corrida analítica

Os resultados das amostras de CQ servem de base para aceitação ou rejeição da corrida analítica. No mínimo 67% (quatro de seis) das amostras de CQ devem estar dentro de $\pm 15\%$ dos seus respectivos valores nominais, exceto para o LQ, para o qual se admite desvios $\leq 20\%$; 33% (duas de seis) das amostras de CQ podem estar fora destes limites, mas não para a mesma concentração.

Todas as amostras de um mesmo voluntário devem ser analisadas em uma mesma corrida analítica.

3.4.11 Método bioanalítico

Tabela 15: Parâmetros da técnica bioanalítica definidos para metodologia empregada.

Técnica Bioanalítica	HPLC-MS/MS
Tipo de ionização:	<i>Electrospray</i> negativo (ESI-)
Método de detecção:	Monitoração de Reações Múltiplas (MRM)
Voltagem do capilar	4.500 (V)
Temperatura de dessolvatação:	450 (°C)
Padrão interno	
Para Losartana:	Valsartana – 156,25 ng/ml
Para Hidroclorotiazida:	Clortalidona – 125 ng/ml
Matriz biológica:	Plasma
Anticoagulante:	Heparina sódica
Tipo de extração:	Extração líquido-líquido (LLE)
Faixa de linearidade	
Para Losartana:	4 – 800 ng/ml
Para Hidroclorotiazida:	4 – 500 ng/ml
Parâmetro de quantificação:	Área relativa (área do analito / área do padrão)
Parâmetro de detecção	Tempo de retenção e íons característicos
Para Losartana:	TR = 2,96 min m/z = 421,1 > 127,0
Para Hidroclorotiazida:	TR = 2,46 min m/z = 295,9 > 205,1
Para Valsartana:	TR = 3,44 min m/z = 434,2 > 179,1
Para Clortalidona:	TR = 2,48 min m/z = 337,0 > 145,9

3.4.12 Validação da Metodologia Analítica

3.4.12.1 Parâmetros a serem validados

Após o desenvolvimento do método analítico, o qual deve ter sensibilidade suficiente para quantificar com confiança a menor concentração provável de ser encontrada nas amostras dos voluntários, a validação deve contemplar os seguintes parâmetros:

- ✓ Especificidade;

- ✓ Comprovação da ausência de supressão de íons;
- ✓ Comprovação da ausência de contaminação entre amostras (carry over);
- ✓ Limite de quantificação (LIQ e LSQ);
- ✓ Curva de calibração e linearidade;
- ✓ Recuperação;
- ✓ Precisão e exatidão intra e interensaio;
- ✓ Estabilidade.

3.4.12.2 Procedimentos da validação analítica

3.4.12.2.1 Especificidade

Foram analisadas conforme o método proposto, amostras da matriz biológica devidamente identificadas obtidas de, pelo menos, seis indivíduos, sendo 4 amostras normais, uma lipêmica e uma hemolisada para avaliar possíveis interferentes no tempo de retenção do fármaco e do padrão interno.

As soluções padrão para comparação foram preparadas na concentração adequada para o fármaco e o padrão interno e processadas conforme o método proposto.

Os resultados foram comparados com aqueles obtidos de solução aquosa do analito na concentração do LIQ ou com matriz biológica adicionada do analito na concentração do LIQ.

As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito e do padrão interno devem ser inferiores, respectivamente, a 20% e 5% da resposta na concentração do LIQ.

Qualquer plasma que apresentar interferência significativa no tempo de retenção do fármaco, do metabólito ou do padrão interno deve ser rejeitado e um novo grupo de amostras deve ser testado. Se amostras desse novo grupo também apresentarem interferência significativa no tempo de retenção do fármaco, o método deve ser alterado visando eliminá-la.

3.4.12.2.2 Supressão Iônica

Foram realizados ambos os procedimentos, sendo que primeiro foi realizada a infusão direta de solução-padrão (analito + PI) em concentração próxima àquela utilizada no teste de infusão durante o desenvolvimento do método e concomitantemente foram injetadas várias vezes ($n = 10$ a 30) o branco da matriz biológica para verificar se a linha de base permaneceria estável.

Depois, foi realizada a infusão direta de solução-padrão (analito + PI) em concentração próxima àquela utilizada no teste de infusão durante o desenvolvimento do método e injetar o branco da matriz biológica, programando um tempo de corrida aproximadamente 5 vezes superior ao tempo de corrida estabelecido, visando verificar a eventual presença de picos negativos ou positivos que poderiam aparecer depois do tempo regular de corrida.

Foram verificados os possíveis resultados e respectivas ações a serem tomadas (Tabela 16).

Tabela 16: Possíveis resultados do teste de supressão de íons e ações decorrentes.

POSSIBILIDADE (supondo tempo de corrida de 5 min)	AÇÃO
Ausência de picos	Método de acordo.
Picos com $Tr < 5$ min e não coincidentes com o Tr dos analitos	Método de acordo.
Picos com $Tr < 5$ min e coincidentes com o Tr dos analitos	Mudar condições cromatográficas ou de preparo da amostra.
Picos com $Tr > 5$ min, por exemplo, 8 min	Aumentar o tempo de corrida para 9 min.
Picos com $Tr > 5$ min, por exemplo, 20 min	Calcular após quantas amostras este pico aparecerá e avaliar se ele interferirá no tempo de retenção do analito. Se os picos coeluírem, mudar as condições cromatográficas, de preparo da amostra ou limpar a coluna analítica.

3.4.12.2.3 Contaminação entre amostras ou arraste (*carry over*)

Foi injetada uma amostra com concentração maior ou igual ao ponto mais alto da curva de calibração (LSQ) seguida da injeção de um branco da matriz biológica. O processo foi repetido e desta vez injetou-se fase móvel após o LSQ.

Se houver a presença de pico do analito ou do padrão interno nas amostras de branco, implica que está ocorrendo o efeito de arraste. Portanto, considera-se *carry over* a presença de picos nos TR do analito e do PI com áreas superiores a 20% e 5%, respectivamente, em relação à resposta do LIQ.

Para eliminar este efeito pode-se:

- ✓ Diluir a amostra;
- ✓ Aumentar o procedimento de lavagem da seringa após a injeção;
- ✓ Acrescentar álcool isopropílico (IPA) na fase móvel;
- ✓ Mudar o método.

3.4.12.2.4 Linearidade

A curva de calibração foi compreendida pelas análises da amostra branco (matriz biológica isenta de padrão do analito e do padrão interno), da amostra zero (matriz biológica acrescida do padrão interno) e de 7 (sete) diferentes concentrações dos calibradores em duplicata, contendo o padrão interno e contemplando a faixa de concentração definida, sendo 4, 8, 15, 50, 100, 400 e 800 ng/mL para losartana e 4, 8, 15, 50, 100, 250 e 500 ng/mL.

As amostras que compõem a curva de calibração foram submetidas ao método proposto e os resultados foram tratados pelo método estatístico apropriado, sendo que o modelo mais indicado e aplicado foi o do cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

A avaliação da curva considera os seguintes critérios:

- ✓ Desvio $\leq 20\%$ em relação à concentração nominal para o calibrador de concentração no limite de quantificação do método (LIQ);

- ✓ Desvio $\leq 15\%$ em relação à concentração nominal para as outras concentrações;
- ✓ No mínimo 5 de 7 concentrações (pontos da curva de calibração) devem cumprir os critérios acima, incluindo o LIQ e o LSQ;
- ✓ Quando utilizadas replicatas das concentrações, no mínimo 67% de todas as réplicas devem apresentar desvio $\leq 15\%$ em relação à concentração nominal ($\leq 20\%$ para réplicas do LIQ);
- ✓ O coeficiente de correlação linear deve ser $\geq 0,98$.

3.4.12.2.5 Precisão e exatidão

Na determinação da precisão e da exatidão da metodologia analítica foram analisadas 4 concentrações de CQ (LIQ, CQB, CQM, CQA), preparadas respectivamente nas concentrações de 4 ng/mL, 12 ng/mL, 400 ng/mL e 650 ng/mL.

Este procedimento foi repetido em 3 ensaios devido as determinações interensaio. Não foi necessário demonstrar a precisão e a exatidão interensaio para o LIQ, o que significa que essa concentração será avaliada apenas no primeiro ensaio, para determinar da precisão e exatidão intraensaio.

No cálculo de precisão e exatidão foram necessários pelo menos 5 resultados válidos, ou seja, valores com precisão $\leq 20\%$ para o LIQ e $\leq 15\%$ para demais CQs e exatidão entre 80-120% para LIQ e 85-115% para demais CQs;

A precisão e a exatidão intraensaio foram avaliadas pelo valor médio das replicatas para cada concentração num mesmo ensaio;

A precisão e a exatidão interensaio podem ser avaliadas pelo valor médio de todas as replicatas de cada concentração nos 3 ensaios. Contudo, é também aceito o cálculo utilizando a média das médias obtidas em cada dia para cada concentração de CQ.

3.4.12.2.7 Limite de quantificação

O LQ pode ser estabelecido por uma das três formas descritas a seguir:

- ✓ **Limites inferior (LIQ) e superior (LSQ) de quantificação:** No caso de LIQ, verificar na literatura qual a menor concentração provável de ser encontrada nas amostras dos voluntários após a administração do fármaco em regime de dose e de via de introdução semelhantes às do estudo em questão, ou calcular de 5 a 7 $t_{1/2}$ de eliminação em relação ao $C_{m\acute{a}x}$, também definida na literatura, e adotar esse valor como base para a determinação do LIQ. Em seguida, preparar amostras (n=5) nessa concentração e verificar a precisão e exatidão. Se necessário, adicionar o fármaco à matriz biológica em concentração próxima (maior ou menor) a esse valor de concentração. O LIQ será a menor concentração na qual o pico de resposta do fármaco for identificável e reproduzível com precisão de $\leq 20\%$ e exatidão compreendida entre 80 e 120%. Se for um estudo de cronograma de coletas truncado, então o LIQ deve ser eficiente para permitir a quantificação de todas as amostras de coletas até, no mínimo, 72 horas. No caso do LSQ, verificar na literatura qual o $C_{m\acute{a}x}$ do fármaco e adotar esse valor acrescido de até aproximadamente 120% como LSQ. A validação do LSQ deve apresentar precisão $\leq 15\%$ e exatidão compreendida entre 85 e 115%.
- ✓ **Sinal / Ruído:** O LIQ será a concentração que produzir uma razão superior a 5:1 entre o sinal do analito e o ruído da linha de base.
- ✓ **Intercepto:** O LIQ é expresso através da equação: $LIQ = (DP * 10)/i.c.$, onde DP é o desvio padrão do intercepto com o eixo y de várias curvas de calibração contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto LQ e i.c., é a inclinação da curva de calibração.

3.4.12.2.8 Recuperação

Embora porcentagens de recuperação próximas a 100% sejam desejáveis, admitiu-se valores menores, desde que a recuperação apresentasse precisão $\leq 20\%$ entre as replicatas de cada conjunto.

Além disso, considerou-se que a diferença entre os valores de recuperação obtidos para os controles CQB, CQM e CQA sejam $\leq 15\%$.

O ensaio foi realizado comparando-se os resultados analíticos de amostras extraídas a partir de três concentrações (CQB, CQM e CQA) com aqueles obtidos de amostras não extraídas (padrão adicionado após a extração) preparadas quer seja em solução ou em matriz biológica, as quais representam 100% de recuperação. O cálculo da recuperação foi realizado em função da relação de área do padrão extraído e não extraído, tanto para o analito quanto para o padrão interno separadamente.

3.4.12.3 Estabilidade

Na determinação da estabilidade foi utilizado um conjunto de cinco amostras das concentrações baixa e alta determinadas na validação do método analítico (CQB e CQA) preparadas a partir de uma solução estoque recente do fármaco em estudo, adicionado a uma matriz biológica isenta de interferência.

A estabilidade foi demonstrada nas condições do estudo corrente (temperatura de armazenamento, matriz biológica e anticoagulante) e o foi concluído antes da análise das amostras dos voluntários, com exceção do ensaio de estabilidade de longa duração, que pode ser concluído ao final das corridas analíticas.

3.4.12.3.1 Preparo das amostras do teste de estabilidade e dos CQ's controle (CQ-Ctrl)

Foram preparadas as soluções padrão do analito, do padrão interno (PI) e as amostras de CQB e CQA sem padrão interno, em volume suficiente para todo o estudo de estabilidade. Aliquotou-se os CQs de acordo com a tomada de ensaio e procedeu-se adicionando PI a 5 alíquotas de cada CQ e analisou-se conforme o método proposto.

Esses resultados serviram de controle em todos os testes de estabilidade (CQ-Ctrl).

A avaliação dos resultados foi feita através do cálculo da percentagem de desvio em relação aos controlos.

3.4.12.3.2 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento (CQ-CCD)

A estabilidade do fármaco (analito) foi avaliada após 3 ciclos de congelamento e descongelamento. O teste foi feito utilizando-se 5 amostras de concentrações baixa e alta, definidas na validação do método analítico, nas seguintes condições:

1. Manteve-se uma amostra de cada CQ a - 20°C por 24 horas;
2. Descongelou-se à temperatura ambiente (ciclo 1);
3. Congelou-se novamente por 12 a 24 horas;
4. Descongelou-se à temperatura ambiente (ciclo 2);
5. Congelou-se novamente por 12 a 24 horas;
6. Descongelou-se à temperatura ambiente (ciclo 3).

Após o terceiro ciclo de congelamento e descongelamento, cada amostra de CQ (n=5) foi aliquoteada com adição de PI (padrão interno) e submetida à análise. Os resultados foram comparados com os respectivos CQs-Ctrl.

3.4.12.3.3 Estabilidade de curta duração (CQ-CD)

Para verificação dessa estabilidade foram utilizadas 5 amostras das concentrações do CQB e CQA. Cada uma delas permaneceu à temperatura ambiente de 4 (quatro) a 24 (vinte e quatro) horas (com base no tempo em que as amostras do estudo serão mantidas à temperatura ambiente) e analisadas. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém-preparadas (CQs-Ctrl).

3.4.12.3.4 Estabilidade de longa duração (CQ-LD)

O tempo de armazenamento para o estudo de longa duração deve exceder o intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra e a análise da última. A temperatura utilizada no ensaio deve reproduzir a recomendada para o armazenamento das amostras ($\leq 20^{\circ}\text{C}$).

No ensaio de estabilidade de longa duração foram utilizadas duas curvas de calibração, ou seja, os resultados foram reportados como a variação observada numa mesma amostra antes e depois do período em teste. Nesse caso, os CQs recém-preparados são lidos na curva do dia e são armazenados pelo período em teste. Ao término desse período, esses CQs foram descongelados e analisados em uma nova curva recém-preparada.

O ensaio poderia ter sido realizado utilizando apenas uma curva de calibração e a comparação seria feita entre os controles armazenados com controles recém-preparados. Neste caso, os CQs recém-preparados são armazenados pelo período em teste e ao término desse tempo são descongelados e lidos em uma curva recém-preparada juntamente com controles, também recém-preparados.

3.4.12.3.5 Estabilidade pós-processamento na bandeja do injetor (CQ-PP)

No caso da utilização de equipamentos que empreguem sistemas automáticos de injeção com recurso de controle de temperatura deve-se verificar a estabilidade do fármaco na condição de temperatura sob a qual as amostras do estudo serão analisadas. Foram utilizadas 5 amostras de concentrações baixa e alta determinadas na validação do método analítico e os resultados foram comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém-preparadas (CQs-Ctrl).

Na prática, após a extração e transferência da alíquota para os frascos de injeção, a amostra processada foi mantida na bandeja do injetor automático do equipamento. Desta forma, foi calculado o intervalo de tempo entre a primeira e a última injeção considerando a bandeja totalmente preenchida e os frascos foram deixados na bandeja do injetor por um intervalo de tempo $\geq$ ao calculado. Decorrido

esse tempo, as amostras foram injetadas e quantificadas na curva de calibração dos outros ensaios de estabilidade.

3.4.12.3.6 Estabilidade das soluções padrão do analito e do PI

A estabilidade das soluções-padrão do fármaco e do PI pode avaliada à temperatura ambiente ou em condições de refrigeração ou congelamento, dependendo do fármaco.

Os padrões foram pesados, a solução padrão do analito e do PI foi preparada e injetada (Pd-Ctrl). Uma alíquota dessa solução padrão foi deixada à temperatura ambiente por no mínimo 6 horas (bancada) para injetar em seguida no equipamento (Pd-CD) e foram armazenadas sob refrigeração ou congelamento (freezer), contemplando a temperatura e o período de armazenamento das mesmas (Pd-LD). Passado esse tempo, as soluções foram novamente injetadas e os resultados comparados com os obtidos anteriormente (Pd-Ctrl).

3.4.12.3.7 Análise dos resultados

As amostras são consideradas estáveis quando se observar desvio $\leq 15\%$ do valor obtido em relação às amostras recém-preparadas.

A fórmula abaixo, normalmente aplicada, foi utilizada para calcular a % de desvio. Quaisquer procedimentos alternativos devem ser justificados.

$$\text{Desvio (\%)} = [(\text{conc. obtida} - \text{conc. controle}) + \text{conc. controle}] \times 100$$

3.4.12.4 Quantificação das amostras

Todas as amostras de um mesmo voluntário devem ser analisadas em uma mesma corrida analítica.

Os resultados devem ser avaliados e caso seja necessário reprocessar amostras deve-se seguir os procedimentos segundo os critérios de reanálise das amostras.

3.4.12.5 Validação das corridas analíticas

No método validado, sua precisão e exatidão foram monitoradas continuamente, através de controles, para assegurar um desempenho satisfatório ao longo do estudo.

Os CQs foram incorporados em intervalos adequados, dependendo do número total de amostras da corrida, preferencialmente um CQ a cada 10 amostras, sempre em igual número de replicatas de cada concentração (CQB, CQM e CQA) e nunca em quantidade inferior a 5% (cinco por cento) do número de amostras desconhecidas.

Nas corridas analíticas constituídas de até 120 amostras, pelo menos 6 (seis) CQs (uma duplicata de cada concentração) devem estar presentes.

3.4.12.5.1 Critérios de aceitação

Os resultados das amostras de CQ serviram de base para aceitação ou rejeição da corrida analítica. No mínimo, 67% (quatro de seis) das amostras de CQ devem estar dentro de mais ou menos 15% dos seus respectivos valores nominais; 33% (duas de seis) das amostras de CQ podem estar fora destes limites, mas não para a mesma concentração.

Na eventualidade de três CQs seguidos apresentarem valores fora dos critérios de aceitação, todas as amostras compreendidas nesse intervalo devem ser reanalisadas, ou seja, da primeira amostra após o último CQ aceito até a amostra imediatamente antes do próximo CQ aceito.

3.5 Etapa estatística

A seguinte análise estatística foi conduzida baseada em médias de mínimos quadrados de cada componente do produto teste e referência. O modelo estatístico utilizado para a análise foi:

Sequência + Voluntário (Sequência) + Período + Tratamento

Realizou-se uma análise de variância (ANOVA), com efeitos fixos para sequência, período e tratamento e efeito aleatório para voluntário dentro da sequência, usando transformação logarítmica de ASC_{0-t} e C_{max} . Foram calculados os intervalos de confiança de 90% para a razão das médias geométricas das medidas farmacocinéticas ASC_{0-t} e C_{max} .

Os seguintes programas foram utilizados: WinNonlinTM, versão 3.1; EquivTest versão 2.0; GraphPad Prism, versão 2.0; Microsoft Excel, versão 97; Microsoft Word, versão 97.

Na etapa clínica da losartana e hidroclorotiazida houve atraso nos tempos de coleta e os mesmos foram considerados no cálculo dos parâmetros farmacocinéticos.

3.5.1 Critérios de decisão de bioequivalência

Como critério de decisão de bioequivalência das formulações R e T, é necessário avaliar se os intervalos de confiança para a razão das médias geométricas de ASC_{0-t} e C_{max} estão dentro dos limites de bioequivalência de 80% a 125%.

3.5.2 Análise de variância

O modelo de análise de variância (ANOVA), com método de lineares generalizados, foi aplicado para os parâmetros farmacocinéticos log-transformados C_{max} e ASC_{0-t} para determinar as diferenças entre produto Teste e Referência. O modelo incluiu os efeitos de sequência, tratamento, período como fatores fixos e voluntário dentro da sequência como fator aleatório. O efeito de sequência foi testado usando o termo voluntário dentro da sequência com $\alpha = 10\%$. E outros efeitos foram testados usando o erro residual do modelo com $\alpha = 5\%$.

3.5.3 Poder

O Poder de um teste estatístico para confirmar a bioequivalência entre duas formulações (Referência e Teste) é aplicado e definido como a probabilidade de rejeitar não bioequivalência entre referência e teste quando duas formulações são bioequivalentes.

3.5.4 Intervalo de Confiança de 90%

O intervalo de confiança (IC) de 90% é aplicado e definido como um intervalo sobre o valor estimado que garante 90% de certeza que este intervalo contém o verdadeiro valor.

Os parâmetros $C_{\max}$, ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} foram analisados na escala logarítmica para testar a bioequivalência do produto Teste e Referência. A bioequivalência é confirmada quando IC 90% está dentro do intervalo de 80%-125%. IC 90% para $C_{\max}$, ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} .

4. RESULTADOS

4.1 Etapa clínica

Conforme Anexo 1, o estudo foi apresentado ao Comitê de Ética da Unicamp e o mesmo foi aprovado para realização do estudo de bioequivalência farmacêutica proposto.

O número de voluntários necessários para a realização de um estudo de bioequivalência pode influenciar significativamente na probabilidade de aceitação da bioequivalência entre teste e referência. Durante a etapa de planejamento, o número de voluntários é uma das questões mais importantes para obter um poder desejado para o estudo (por exemplo, 80%) estabelecendo bioequivalência entre duas formulações dentro dos limites clinicamente importantes. Assim para a determinação do número de voluntários (N) realiza-se o cálculo da função do poder do teste fundamentado numa estimativa de coeficiente de variação intra-individual obtida em literatura ou estudo piloto.

Os 28 voluntários recrutados apresentaram o Índice de Massa Corpórea (IMC) maior ou igual a 19 e menor ou igual a 28, boas condições de saúde ou ausência de doenças significativas, e com pressão considerada normal (100-140 mm Hg para a sistólica e 60-90 mm Hg para a diastólica).

Tabela 17: Dados estatísticos descritivos da população.

Variáveis	Voluntários (N)	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Mediana
Altura	28	1,64	0,08	1,50	1,82	1,64
Peso	28	63,29	7,97	51,00	76,3	62,20
IMC	28	23,53	2,38	19,43	27,99	22,76
Idade	28	31,85	7,59	19,00	45,00	29,00

IMC: Índice de massa corpórea.

Para a seleção dos voluntários, os mesmos foram submetidos a exames específicos. O resultado desses exames (pré-estudo) foram critérios

imparciais para o aceite do individuo no estudo. A relação dos exames realizados (pré e pós-estudo) com os resultados obtidos para uma amostragem de voluntários encontram-se descritos nas Tabelas 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25.

Tabela 18: Resumo de exames laboratoriais pré-estudo (análise bioquímica).

Exames	Voluntários										Valor Referência
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Coolesterol Total (mg/dL)	126	157	106	155	159	187	230	121	172	197	0 - 239
Triglicérides (mg/dL)	147	48	112	58	54	103	117	47	70	110	0 - 200
Uréia (mg/dL)	35	33	41	36	25	32	30	49	24	42	6 - 50
Creatinina (mg/dL)	0,81	0,82	0,57	1,20	0,82	1,03	1,13	0,89	1,10	1,10	0,6 – 1,1
Glicose jejum (mg/dL)	90	86	95	78	79	77	74	71	87	94	60 - 99
Ácido Úrico (mg/dL)	4,3	4,3	3,1	4,4	2,6	4,7	5,7	5,8	3,6	3,8	2,6 - 6
TGO (U/L)	23	33	21	33	33	13	20	20	21	31	13 - 35
TGP (U/L)	20	34	16	31	19	15	22	10	13	23	7 - 34
Bilirrubina Total (mg/dL)	0,52	0,57	0,52	0,84	0,65	0,55	0,51	1,40	0,55	0,67	0,5 – 1,4
Bilirrubina Direta (mg/dL)	0,12	0,16	0,14	0,19	0,29	0,1	0,19	0,55	0,1	0,11	0,1 - 0,6
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	0,36	0,41	0,3	0,55	0,46	0,45	0,3	0,77	0,35	0,58	0,1 – 0,8
Fosfatase Alcalina (U/L)	175	172	140	149	168	138	274	190	162	211	70 - 290
Gama GT (U/L)	14	16	16	17	22	13	29	29	14	25	7 - 32
Proteínas Totais (g%)	6,0	7,3	6,4	6,1	6,0	7,5	7,1	7,6	6,5	7,1	6 - 8
Albumina (g%)	4,6	4,3	4,9	4,4	4,3	4,5	4,9	4,5	4,7	4,7	3,5 – 5,5
Globulina (g%)	1,4	3,0	1,5	1,7	1,7	3,0	2,2	3,0	1,8	2,4	1 - 3
Relação A/G	3,3	1,4	3,3	,2,6	2,5	1,5	2,2	1,4	2,6	2,0	1,2 - 5
Beta HCG (mUI/mL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0

Tabela 19: Resumo de exames laboratoriais pré-estudo (Análise Hematológica).

Exames	Voluntários										Valor Referência
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Hemoglobina (g/dL)	15,5	16,1	14,4	15,9	15,4	16,2	16,0	15,4	14,8	14,8	11,3 – 16,3
Eritrócito (mm³)	5,40	5,10	5,04	5,39	5,39	5,31	5,27	5,34	5,22	5,35	4,0 – 5,4
Hematócrito (%)	46,5	47,9	42,9	47,9	47	47,7	47,5	46,1	45,1	44,1	36 – 48
V.C.M. (fL)	85,4	86,1	85,1	88,8	80,0	89,7	86,4	86,2	79,7	82,4	77 - 92
H.b.C.M. (pg)	28,4	28,6	28,5	29,4	27,0	30,4	28,5	28,7	31,5	27,6	27 - 32
C.H.b.C.M (g/dL)	33,3	33,2	33,5	33,1	32,7	33,9	33,0	33,4	32,8	33,5	30 – 35
RDW (%)	13,1	13,4	13,0	13,3	14,1	13,0	13,7	12,6	13,1	14,5	11,5 – 14,5
Leucócitos (mm³)	5,4	4,1	5,1	11	6,9	6,5	6,5	4,8	7,0	7,8	4 - 11
Neutrófilo (%)	62	57	42	53	70	58	41	55	49	57	40 - 70
Mielócitos (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 - 0
Metamielócitos (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 - 0
Bastonetes (%)	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	0 - 4
Segmentados (%)	62	56	42	53	65	58	41	55	49	57	36 - 66
Eosinófilo (%)	2	4	3	3	2	2	2	4	4	2	2 – 4
Basófilos (%)	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0 – 1
Linfócitos (%)	28	30	31	27	27	31	43	30	35	28	25 – 45
Monócitos (%)	9	8	10	7	6	8	8	10	5	6	2 - 10
Plaquetas (x10³)	194	270	186	264	299	291	265	177	307	295	150 - 400

Tabela 20: Resumo de exames laboratoriais pré-estudo (análise parasitológica).

Exames	Voluntários										Valor Referência
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Protozoários	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Helmintos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0 = Resultados negativos, 1 = Resultados positivos.

Tabela 21: Resumo de exames laboratoriais pré-estudo (análise sorológica).

Exames	Voluntários										Valor Referência
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Hepatite B (Anti-HBS)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Não reagente
Hepatite B (Anti-HBc IgG)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Não reagente
Hepatite B (Anti-HBc IgM)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Não reagente
Hepatite C (Anti-VHC)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Não reagente
HIV 1-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hepatite B (AgHBs)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Não reagente

0 = Resultados negativos, 1 = Resultados positivos.

Tabela 22: Resumo de exames laboratoriais pré-estudo (análise de urina).

Exames	Voluntários										Valor Referência
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Depósitos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Densidade (mg/L)	1020	1010	1020	1020	1010	1020	1020	1020	1020	1010	1010 - 1020
Proteínas (mg/dL)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glicose (mg/dL)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Corpos Cetônicos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pigmento Biliar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nitrito	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Células Epiteliais	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Filamentos de Muco	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leucócitos Urina (Células/mL)	250	250	250	500	500	2500	250	500	250	2500	0 - 10000
Hemácias (Células/mL)	250	250	250	500	500	4000	250	250	500	1250	0 - 8000
Cilindros	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pH	6	5	6	6	7	6	6,5	5	5	5	5,0 - 7
Oxalato de Cálcio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ácido Úrico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fosfato Triplo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Uratos Amorfos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fosfatos Amorfos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0 = Resultados negativos, 1 = Resultados positivos.

A última fase da etapa clínica é a realização de exames pós-Estudo. Nesta fase os voluntários são submetidos novamente à exames laboratoriais clínicos e eletrocardiograma, para garantir o boa condição de saúde geral dos indivíduos que participaram da do estudo. Para tanto segue abaixo uma amostragem dos resultados pós-estudo.

Tabela 23: Resumo de exames laboratoriais pós-estudo (análise bioquímica).

Exames	Voluntários										Valor Referência
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Coolesterol Total (mg/dL)	147	170	131	126	193	158	180	122	158	215	0 - 239
Triglicérides (mg/dL)	50	69	42	60	131	104	177	42	54	275	0 - 200
Uréia (mg/dL)	22	31	43	48	50	40	28	47	30	26	6 - 50
Creatinina (mg/dL)	1,1	0,8	0,7	0,7	0,6	0,7	0,6	1,1	1,1	0,9	0,6 – 1,1
Glicose jejum(mg/dL)	96	91	99	88	89	75	92	84	99	97	60 - 99
Ácido Úrico (mg/dL)	3,1	4,8	3,6	5,2	5,6	5,6	5,7	4,8	4,8	4,1	2,6 - 6
TGO (U/L)	20	27	24	41	23	18	17	18	19	25	13 - 35
TGP (U/L)	17	30	13	27	25	18	25	11	9	25	7 - 34
Bilirrubina Total (mg/dL)	0,60	0,57	0,74	0,85	1,22	0,53	0,51	1,40	0,85	0,96	0,5 – 1,4
Bilirrubina Direta (mg/dL)	0,17	0,1	0,18	0,14	0,17	0,17	0,16	0,4	0,17	0,11	0,1 - 0,6
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	0,23	0,22	0,25	0,22	0,49	0,36	0,35	0,70	0,23	0,27	0,1 – 0,8
Fosfatase Alcalina (U/L)	160	176	155	164	168	209	234	173	157	180	70 - 290
Gama GT (U/L)	9	18	18	10	21	15	27	31	17	28	7 - 32
Proteínas Totais (g/dL)	7,1	7,1	7,3	7,2	7,2	6,5	6,8	6,3	7,1	7,8	6 - 8
Albumina (g/dL)	4,7	4,4	4,9	4,7	4,7	4,4	4,6	4,6	5,1	4,9	3,5 – 5,5
Globulina (g/dL)	2,4	2,7	2,5	2,5	2,5	2,1	2,2	1,7	2,0	2,8	1 - 3
Relação A/G	1,9	1,6	1,9	1,9	1,9	2,1	2,1	2,7	2,5	1,8	1,2 - 5

Tabela 24: Resumo de exames laboratoriais pós-estudo (análise hematológica).

Exames	Voluntários										Valor Referência
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Hemoglobina (g/100mL)	14,5	16,0	13,9	14,1	13,9	15,2	15,2	13,5	14,2	14,6	11,3 – 16,3
Eritrócito (x 10⁶/mm³)	4,97	4,54	4,81	4,74	5,21	5,01	5,19	4,06	5,34	5,23	4,0 – 5,4
Hematócrito (%)	42,8	47,9	41,5	42,4	41,5	45,0	45,0	39,9	42,9	43,5	36 – 48
V.C.M. (μ³)	86,1	86,4	86,1	89,3	79,6	89,7	86,7	86,6	80,2	83,1	77 - 92
H.b.C.M. (pg)	29,1	28,8	28,8	29,6	27,6	30,2	29,2	29,3	28,5	27,8	27 - 32
C.H.b.C.M (%)	33,8	33,4	33,4	33,2	33,4	33,7	33,7	33,8	33,1	33,5	30 – 35
RDW (%)	12,4	13,2	13,1	12,8	14,2	13,3	13,4	12,5	12,9	14,1	11,5 – 14,5
Leucócitos (x10³unidade/mL)	5,4	4,4	5,9	7,4	11	4,6	7,8	4,3	7,4	9,5	4 - 11
Neutrófilo (%)	63	47	46	50	57	54	56	52	49	64	40 - 70
Mielócitos (%/mm³)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 - 0
Metamielócitos (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 - 0
Bastonetes(%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 - 4
Segmentados (%)	63	47	46	50	57	54	56	52	49	64	36 - 66
Eosinófilo	1	8	18	13	17	3	7	4	9	7	2 – 4
Basófilos (%)	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0 – 1
Linfócitos (%)	27	35	26	28	20	33	29	33	37	24	25 – 45
Monócitos (%)	8	9	10	8	5	9	7	10	4	4	2 - 10
Plaquetas (x10³)	221	267	296	260	303	259	275	162	395	374	150 - 400

0 = Resultados negativos, 1 = Resultados positivos.

Tabela 25: Resumo de exames laboratoriais pós-estudo (análise de urina).

Exames	Voluntários										Valor
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Referência
Depósitos	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Densidade (mg/L)	1020	1010	1020	1020	1020	1010	1020	1020	1010	1010	1010 - 1020
Proteínas (mg/dL)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glicose (mg/dL)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Corpos Cetônicos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pigmento Biliar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nitrito	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Células Epiteliais	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Filamentos de Muco	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
Leucócitos Urina (Células/mL)	1250	2000	2000	1000	1000	2000	1000	3000	500	250	0 - 10000
Hemácias (Células/mL)	750	1000	1500	250	500	250	250	1750	500	250	0 - 8000
Cilindros	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pH	6	5	6	5	6	5	5	5	5	7	5,0 - 7
Oxalato de Cálcio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ácido Úrico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fosfato Triplo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Uratos Amorfos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fosfatos Amorfos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0 = Resultados negativos, 1 = Resultados positivos.

Todos os voluntários selecionados foram avaliados pelo eletrocardiograma e considerados pelo Cardiologista aptos a participar do estudo, conforme amostragem de resultados apresentados no Anexo 3.

Dos 28 voluntários selecionados, 17 apresentaram ritmo cardíaco sinusal normal e 11 com pequenas alterações consideradas clinicamente não significativa, sendo 8 com bradicardia, 1 com Intervalo PR curto, 1 com bloqueio incompleto do ramo direito e 1 com bloqueio incompleto do ramo esquerdo.

A data e o horário de confinamento dos voluntários encontram-se descritas na Tabela 26. Os voluntários se apresentaram as 18:00 horas na noite anterior de cada período o qual foi feita uma reunião pré-confinamento, vistoria dos pertences dos voluntários e uma avaliação médica. O tempo de confinamento foi de 26 horas.

Tabela 26: Histórico de confinamento dos voluntários.

Período I	Início: 29/11/2005 – 20h00.
	Término: 30/11/2005 – 22h00.
Período II	Início: 06/12/2005 – 20h00.
	Término: 07/12/2005 – 22h00.

Após um período de 10 horas de jejum foram coletadas as amostras referentes ao tempo zero, e foi administrada a primeira dose do medicamento. Após a administração os voluntários permaneceram em decúbito dorsal elevado em 60°, durante quatro horas e 30 minutos.

Tabela 27: Administração da medicação.

Posologia:	Losartana comprimido revestido de 100 mg + hidroclorotiazida 25 mg	
Forma de administração:	1 comprimido acompanhado por 200 mL de água s/ gás	
Administração dos medicamentos*:	Período I	Início: 30/11/2005 – 07h00 Término: 30/11/2005 – 07h28
	Período II	Início: 07/12/2005 – 07h00 Término: 07/12/2005 – 07h28
Intervalo entre os períodos:	07 dias	

*O início e o término da administração se refere à data e horário da administração da medicação ao primeiro voluntário e da administração ao último voluntário.

Durante o período de confinamento foram observados alguns eventos adversos dos quais alguns encontra-se descritos na Tabela 28.

Tabela 28: Eventos adversos.

Voluntário	Medicação	Evento Adverso	Intensidade	Relação com a Droga	Conduta
3	T	Cefaléia	M	S	0
3	R	Cefaléia	M	S	1
10	R	Cefaléia	L	S	1
11	R	Cefaléia	L	S	1
16	T	Hipotensão e cefaléia	M	S	1
16	R	Tontura, palidez e cefaléia	M	S	1
17	T	Cefaléia	M	S	1
17	R	Cefaléia	M	S	1
18	R	Cefaléia	M	S	1
18	T	Cefaléia	M	S	1
23	R	Cefaléia e náusea	L	S	0
24	R	Náusea e vômito	L	S	1
Medicação T: Teste R: Referência		Intensidade L: Leve M: Moderado S: Severo		Relação com a droga N: Não relacionado S: Suspeito	Conduta: 0: Nenhuma 1: Tratamento farmacológico

Os eventos descritos na Tabela 4.4 ocorreram em baixa intensidade, náuseas, taquicardias, tonturas e cefaléia, são implicações comuns conseqüentes da administração do medicamento. Portanto, os eventos adversos anunciados não se

apresentaram significativos, pois se encontram dentro do quadro esperado para o estudo.

4.1.1 Pressão sistólica e diastólica

Visando compreender um dos objetivos secundários do estudo em questão, valores pressóricos foram obtidos no decorrer das internações como dado de segurança. Desta forma, através destes valores, foi possível estabelecer um comparativo (Figura 4.1) que demonstra as variações entre a pressão sistólica e diastólica em função do tempo.

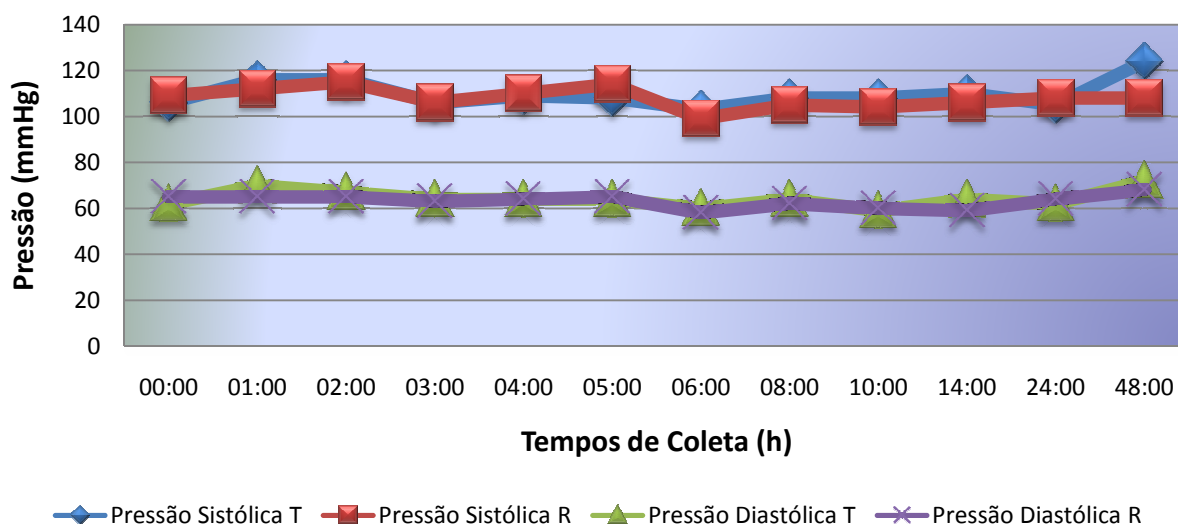


Figura 15: Gráfico da pressão arterial em função dos tempos de coleta.

4.2 Etapa analítica

A metodologia analítica de quantificação utilizada foi devidamente desenvolvida e validada, para garantir a confiabilidade dos resultados. Neste processo, foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade / seletividade, linearidade, exatidão e precisão intra e inter corrida analítica, recuperação do método de extração e a estabilidade dos analitos nas condições experimentais.

Na Tabela 29, estão apresentados os resultados obtidos para no método analítico da associação losartana (antagonista dos receptores da angiotensina) + hidroclorotiazida (diurético tiazídico).

Tabela 29: Principais resultados apresentados pela validação da metodologia analítica.

Parâmetros Validados	Losartana	Hidroclorotiazida
Especificidade / Seletividade	Específico para a Losartana e Valsartana (PI)	Específico para a Hidroclorotiazida e Clortalidona (PI)
Supressão de Íons	Ausência de Pico na Região de Interesse	Ausência de Pico na Região de Interesse
Carry Over	Ausência de Pico na Região de Interesse	Ausência de Pico na Região de Interesse
Linearidade	Boa Resposta Linear	Boa Resposta Linear
Faixa de Linearidade	4-800 ng/mL	4-500 ng/mL
Coefficiente de Correlação Linear da Reta	0,9957 – 0,9977	0,9988 – 0,9995
Precisão e Exatidão (LIQ)	Concentração: 4 ng/mL Precisão e Exatidão intra-ensaio: CV 6,6 – 11,0% e 91,3 – 109,3% Precisão e Exatidão inter-ensaio: CV 9,0% e 100,7% (Valores dentro da faixa de variação de 20% em função do valor nominal)	Concentração: 4 ng/mL Precisão e Exatidão intra-ensaio: CV 3,1 – 9,4% e 89,4 – 105,8% Precisão e Exatidão inter-ensaio: CV 8,6% e 96,7% (Valores dentro da faixa de variação de 20% em função do valor nominal)
Precisão e Exatidão dos CQs (Controles de Qualidade)	Concentrações: 12, 400 e 650 ng/mL Precisão e Exatidão intra-ensaio: CV 2,6 – 8,4% e 99,5 – 108,9% Precisão e Exatidão inter-ensaio: CV 0,7 – 3,5% e 101,3 – 108,1% (Valores dentro da faixa de variação de 15% em função do valor nominal)	Concentrações: 12, 200 e 450 ng/mL Precisão e Exatidão intra-ensaio: CV 1,4 – 5,0% e 95,7 – 104,7% Precisão e Exatidão inter-ensaio: CV 2,5 – 3,7% e 98,5 – 101,4% (Valores dentro da faixa de variação de 15% em função do valor nominal)
Recuperação	Eficiente e seletivo para o analito e o padrão interno Extração Média: 73,9% Nível de CQB, CQM e CQA: 71,5%, 84,5% e 65,7% Recuperação do PI: 65,1%	Eficiente e seletivo para o analito e o padrão interno Extração Média: 76,2 Nível de CQB, CQM e CQA: 66,5%, 88,6% e 73,4% Recuperação do PI: 69,5%

4.2.1 Validação da Metodologia Analítica

4.2.1.1 Especificidade

Conforme já mencionado, no teste de especificidade do método, foram realizadas análises de amostras de plasma branco de seis indivíduos, sendo quatro amostras normais, uma lipêmica e uma hemolisada.

Os resultados foram comparados com aqueles obtidos com uma solução aquosa do analito, em concentração próxima ao LQ e do padrão interno, próxima a sua concentração final.

Não foram detectados interferentes significativos nos tempos de retenção do analito e do padrão interno, conforme exemplificado nos cromatogramas (Figura 16 e 17).

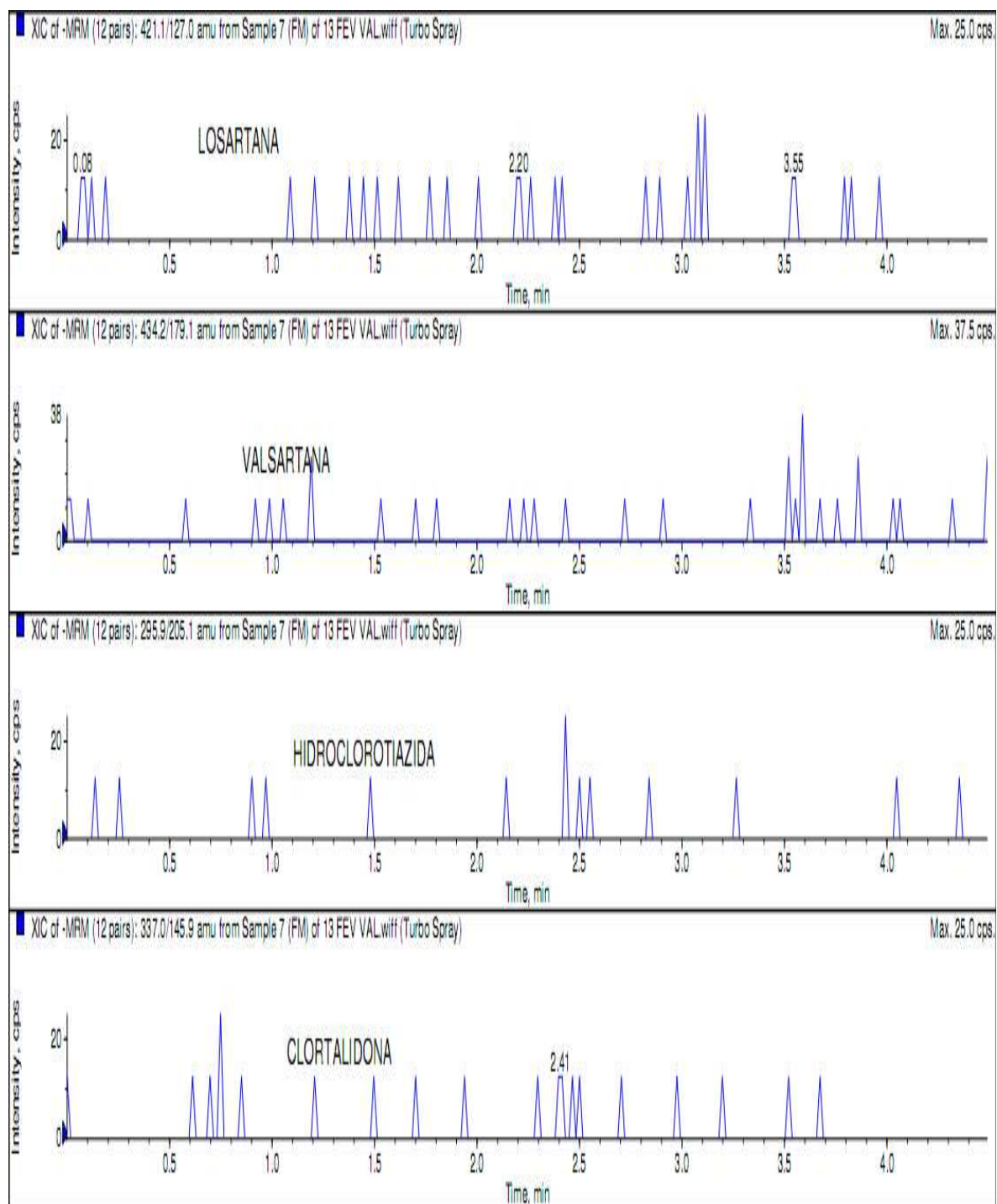


Figura 16: Cromatogramas representativos para amostras de branco normais dos analitos e os seus respectivos padrões internos.

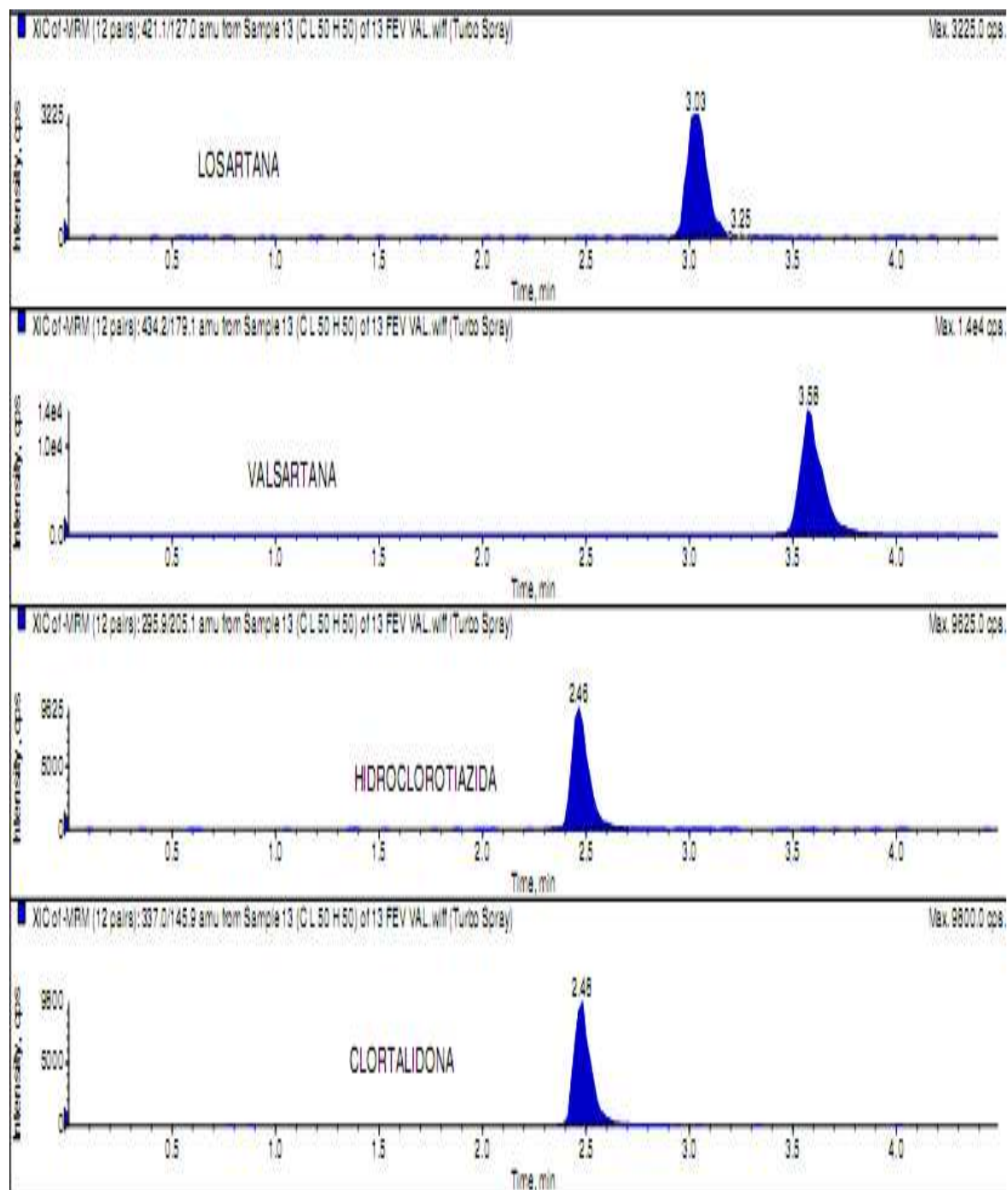


Figura 17: Picos representativos para as soluções dos analitos e os seus respectivos padrões internos.

4.2.1.1.1 Supressão iônica

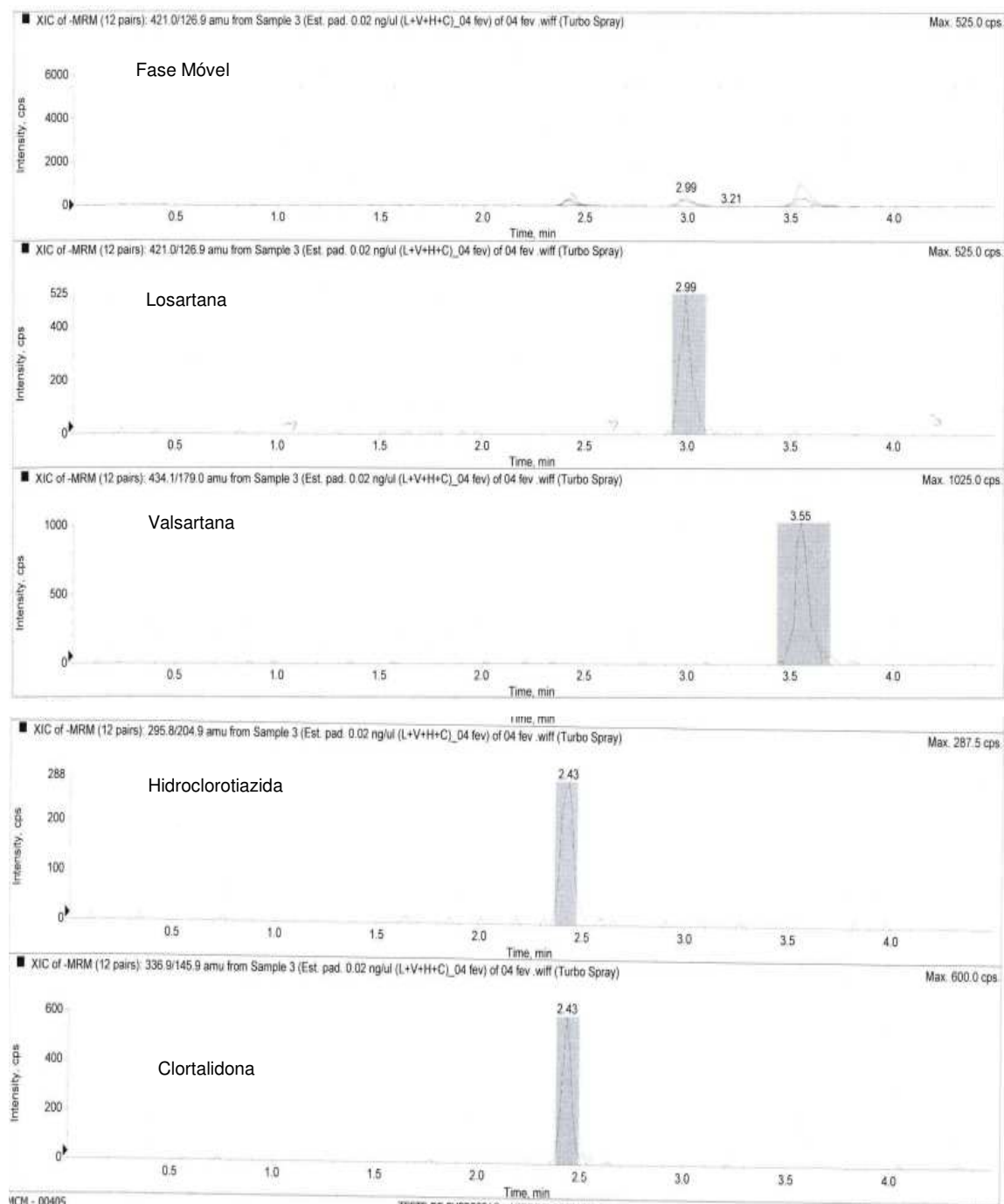


Figura 18: Picos representativos de uma injeção da fase móvel, dos analitos e dos seus respectivos padrões internos.

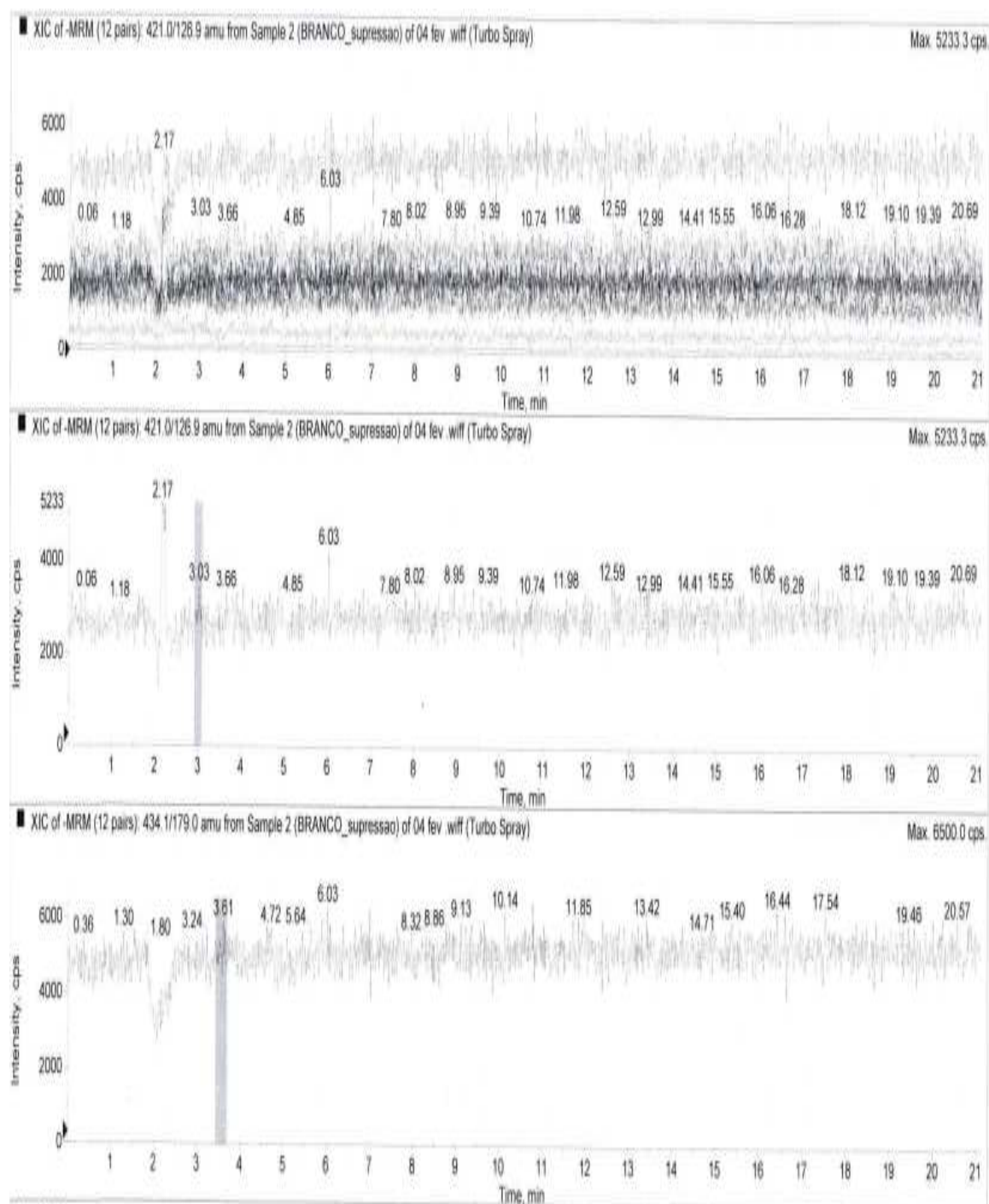


Figura 19: Cromatogramas representativos do plasma branco que demonstra a ausência de coeluição de interferentes para o analito (losartana) e o padrão interno (valsartana).

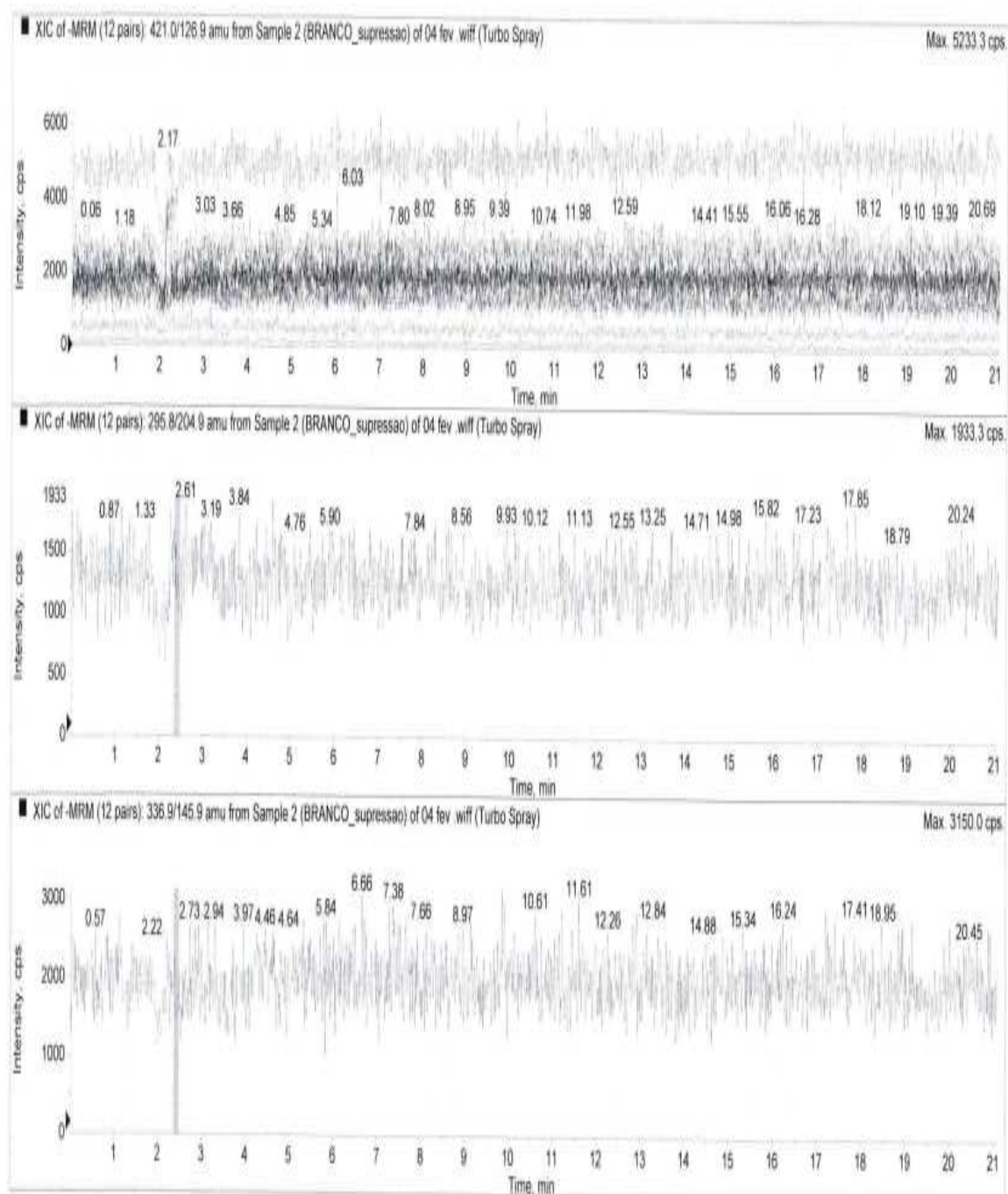


Figura 20: Cromatogramas representativos do plasma branco demonstra a ausência de coeluição de interferentes para o analito (hidroclorotiazida) e o padrão interno (clortalidona).

4.2.1.1.2 Carry over

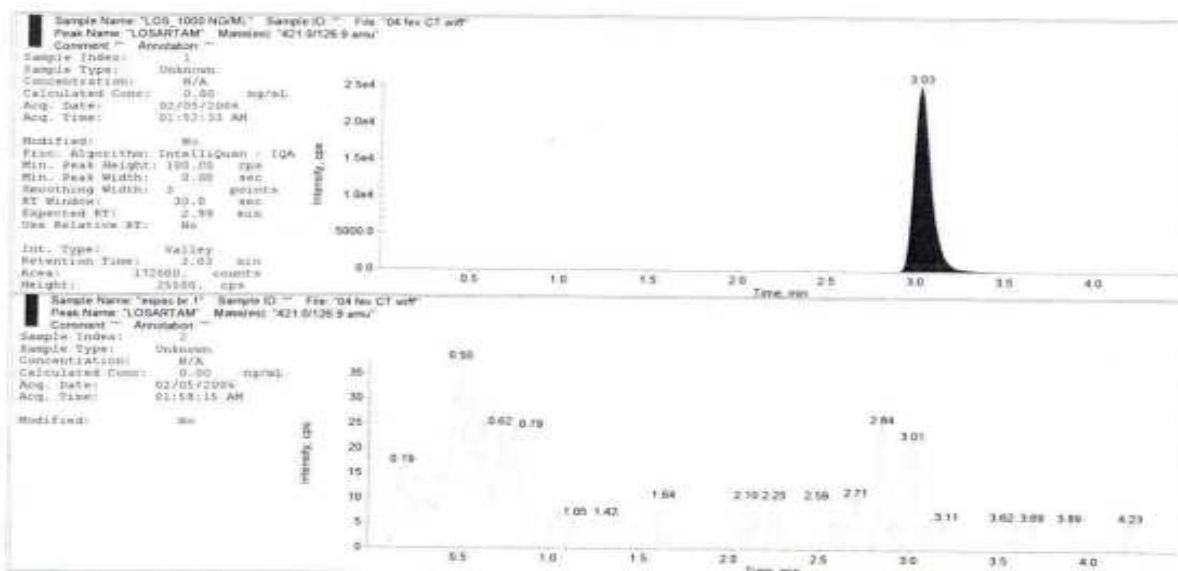


Figura 21: Cromatogramas representativos para o teste de *carry over*, sendo o primeiro referente à injeção da solução de losartana e seguido da injeção do branco.

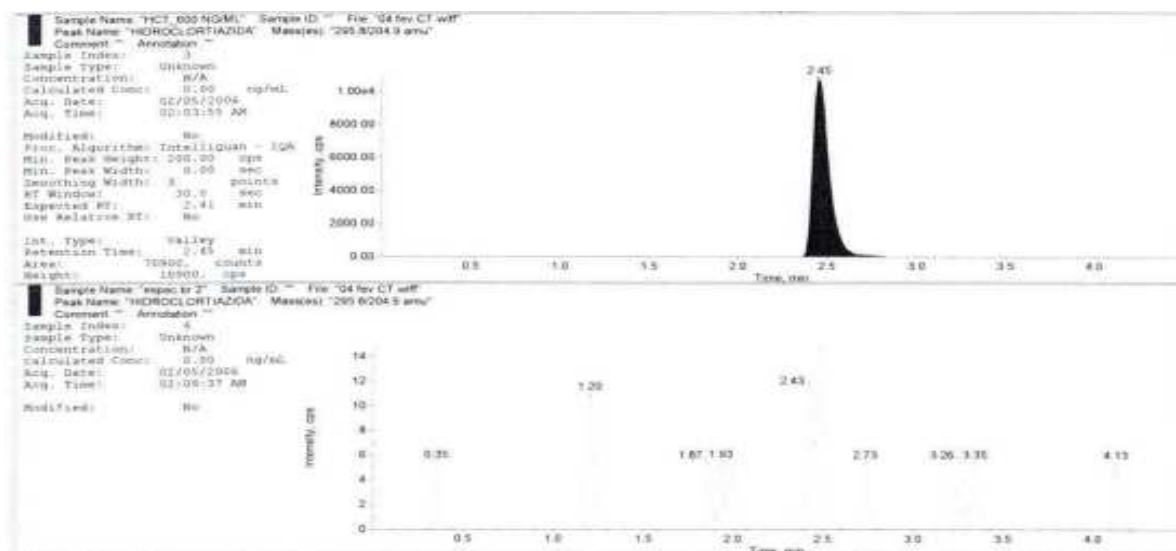


Figura 22: Cromatogramas representativos para o teste de *carry over*, sendo o primeiro referente à injeção da solução de hidroclorotiazida e seguido da injeção do branco.

4.2.1.2 Linearidade

4.2.1.2.1 Losartana

Na avaliação da curva de calibração (linearidade 1, 2 e 3) para a losartana, foram obtidos resultados em conformidade com os critérios de aceitação previamente estabelecidos, onde no mínimo 6 de 7 concentrações (pontos da curva de calibração) apresentaram resultados com desvio $\leq 20\%$ em relação à concentração nominal para o calibrador de concentração no limite de quantificação do método (LIQ) e desvio $\leq 15\%$ em relação à concentração nominal para as outras concentrações.

Para as replicatas das concentrações, no mínimo 67% de todas as réplicas apresentaram desvio dentro dos critérios acima descritos para o LIQ e as demais concentrações.

Na Figura 23 e na Tabela 30 estão apresentados os dados referentes às três linearidades e as curvas de calibração respectivamente.

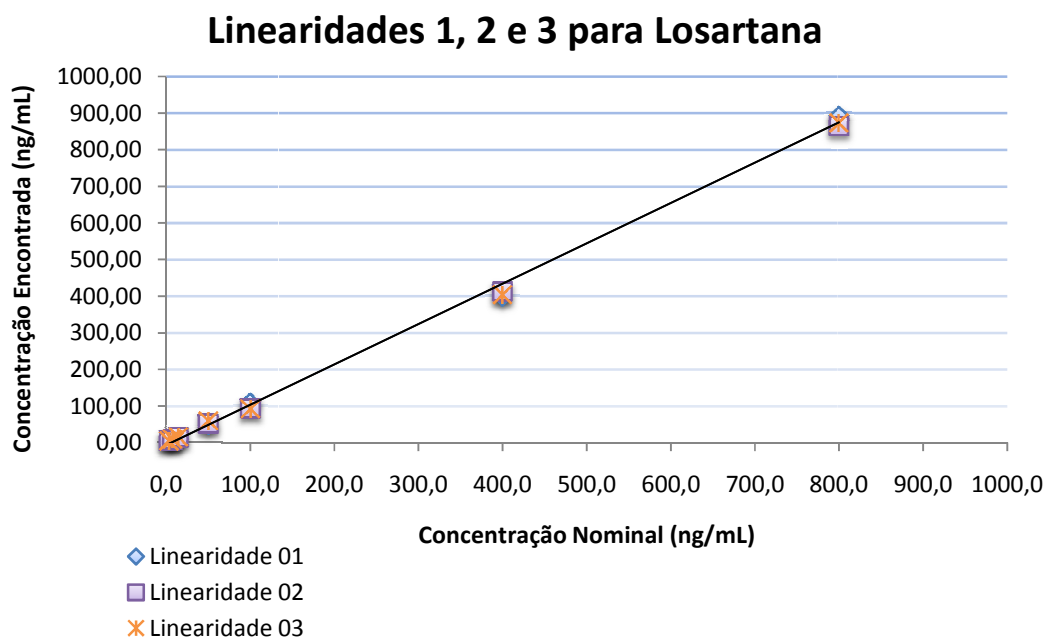


Figura 23: Representação gráfica das linearidades para losartana.

Tabela 30: Equações das curvas de calibração e do respectivo coeficiente de correlação linear (R).

Equações das Curvas de Calibração para Losartana	
Equação da Curva de Calibração 1:	$y = 0,00422x + 0,000337$ ($r = 0,9957$) peso: $1/x^2$
Equação da Curva de Calibração 2:	$y = 0,00393x + 0,00127$ ($r = 0,9957$) peso: $1/x^2$
Equação da Curva de Calibração 3:	$y = 0,00374x + 0,00181$ ($r = 0,9977$) peso: $1/x^2$

A curva de calibração mostrou boa linearidade na faixa de 4 – 800 ng/mL de losartana, onde o coeficiente de correlação médio (r) foi maior que 0.9963.

4.2.1.2.2 Hidroclorotiazida

Na avaliação da curva de calibração (linearidade 1, 2 e 3) para a hidroclorotiazida, foram obtidos resultados em conformidade com os critérios de aceitação previamente estabelecidos, onde no mínimo 6 de 7 concentrações (pontos da curva de calibração) apresentaram resultados com desvio $\leq 20\%$ em relação à concentração nominal para o calibrador de concentração no limite de quantificação do método (LIQ) e desvio $\leq 15\%$ em relação à concentração nominal para as outras concentrações.

Para as replicatas das concentrações, no mínimo 67% de todas as réplicas apresentaram desvio dentro dos critérios acima descritos para o LIQ e as demais concentrações.

Na Figura 24 e na Tabela 31 estão apresentados os dados referentes às três linearidades e as curvas de calibração respectivamente.

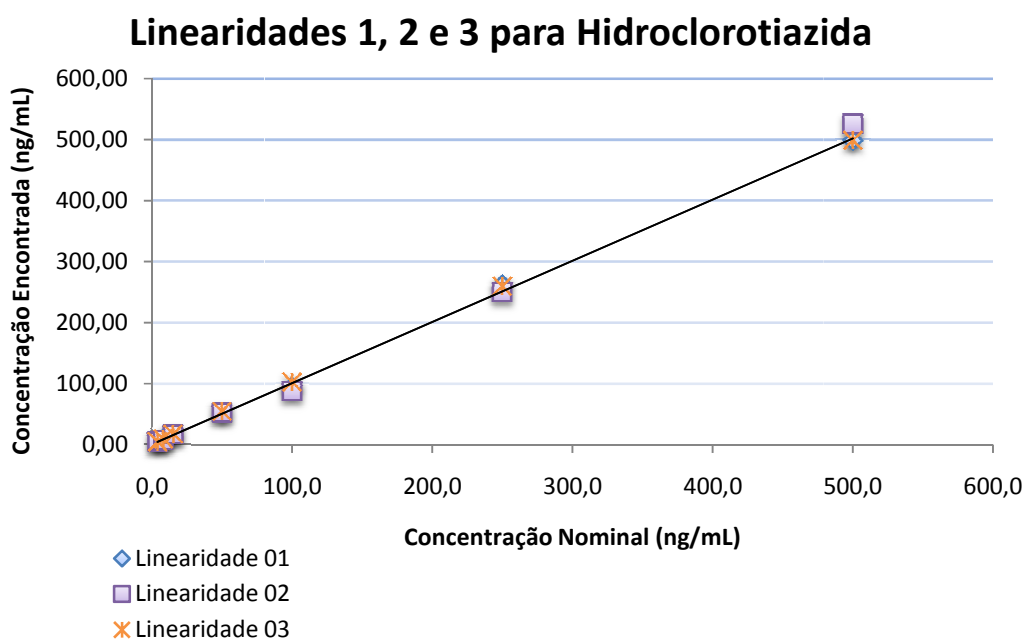


Figura 24: Representação gráfica das linearidades para hidroclorotiazida.

Tabela 31: Equações da curvas de calibração e do respectivo coeficiente de correlação linear (R).

Equações das Curvas de Calibração para Losartana	
Equação da Curva de Calibração 1:	$y = 0,0179x + 0,00377$ ($r = 0,9995$) peso: $1/x$
Equação da Curva de Calibração 2:	$y = 0,0185x + 0,00135$ ($r = 0,9988$) peso: $1/x$
Equação da Curva de Calibração 3:	$y = 0,0182x + 0,00694$ ($r = 0,9994$) peso: $1/x$

A curva de calibração mostrou boa linearidade na faixa de 4 – 500 ng/mL de hidroclorotiazida, onde o coeficiente de correlação médio (r) foi maior que 0.9992.

4.2.1.3 Precisão e Exatidão

4.2.1.3.1 Losartana

Na avaliação da precisão e da exatidão da metodologia analítica foram analisadas 4 concentrações de CQ (LIQ, CQB, CQM, CQA), preparadas respectivamente nas concentrações de 4 ng/mL, 12 ng/mL, 400 ng/mL e 650 ng/mL.

No cálculo de precisão e exatidão no mínimo 6 de 7 resultados apresentaram valores dentro do critérios de aceitação previamente definidos.

A precisão e a exatidão intraensaio foram avaliadas pelo valor médio das replicatas para cada concentração num mesmo ensaio (Figura 25).

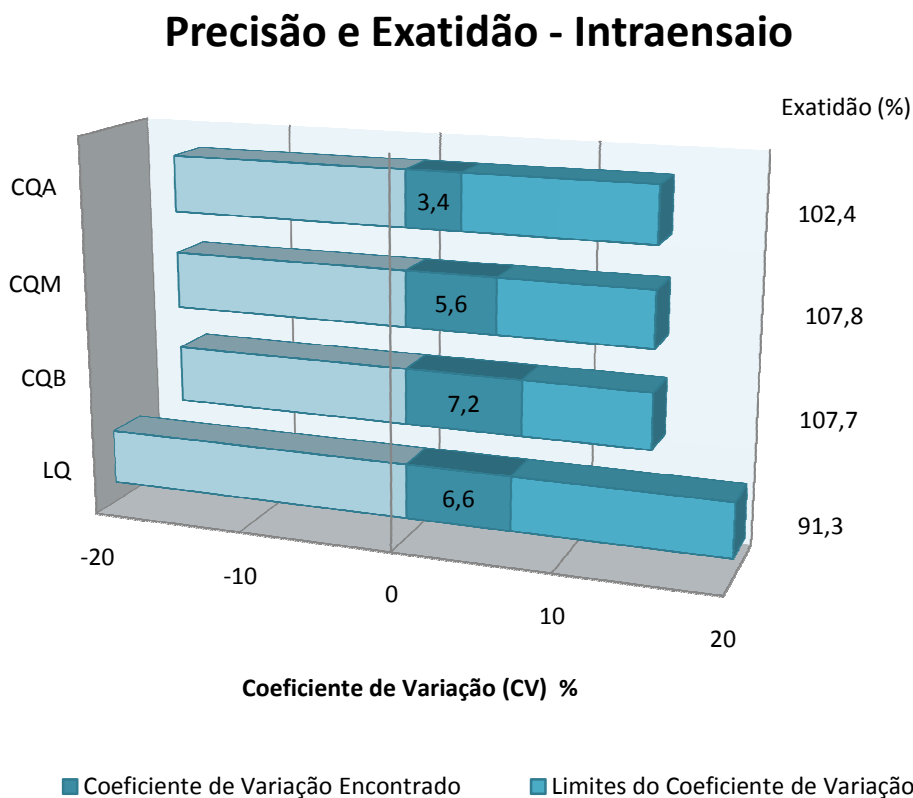


Figura 25: Resultados obtidos das análises intraensaio dos controles de qualidade e do LQ para matriz biológica (plasma).

A precisão e a exatidão interensaio podem ser avaliadas pelo valor médio de todas as replicatas de cada concentração nos 3 ensaios (Figura 26).

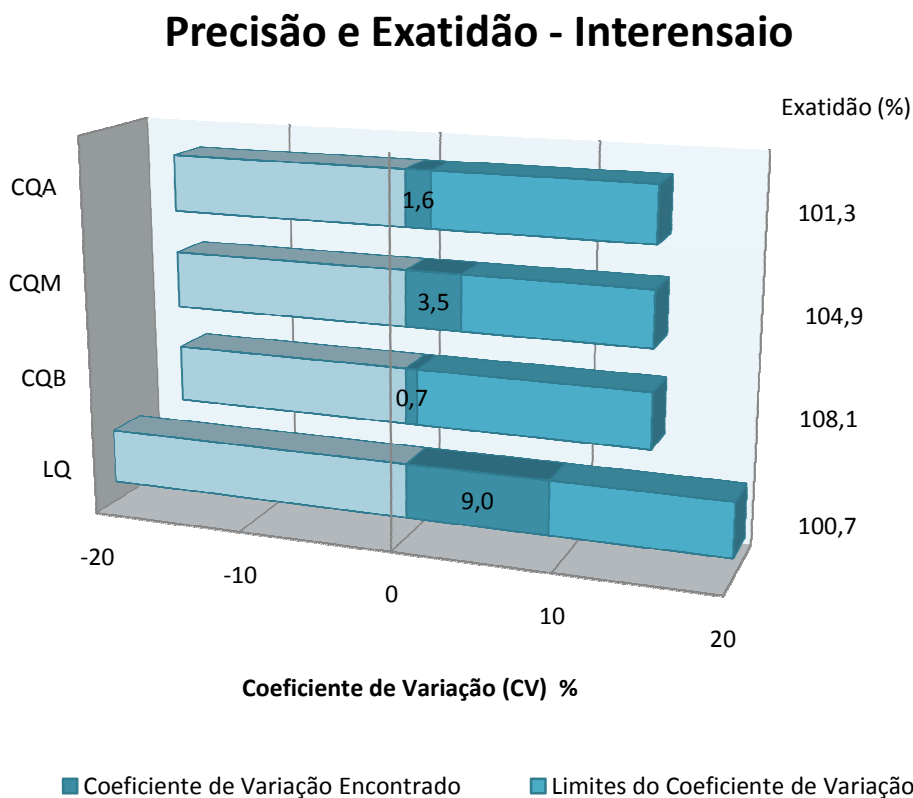


Figura 26: Resultados obtidos das análises interensaio dos controles de qualidade e do LQ para matriz biológica (plasma).

4.2.1.3.2 Hidroclorotiazida

Na avaliação da precisão e da exatidão da metodologia analítica foram analisadas 4 concentrações de CQ (LIQ, CQB, CQM, CQA), preparadas respectivamente nas concentrações de 4 ng/mL, 12 ng/mL, 200 ng/mL e 400 ng/mL.

No cálculo de precisão e exatidão no mínimo 6 de 7 resultados apresentaram valores dentro do critérios de aceitação previamente definidos.

A precisão e a exatidão intraensaio foram avaliadas pelo valor médio das replicatas para cada concentração num mesmo ensaio (Figura 27).

Precisão e Exatidão - Intraensaio

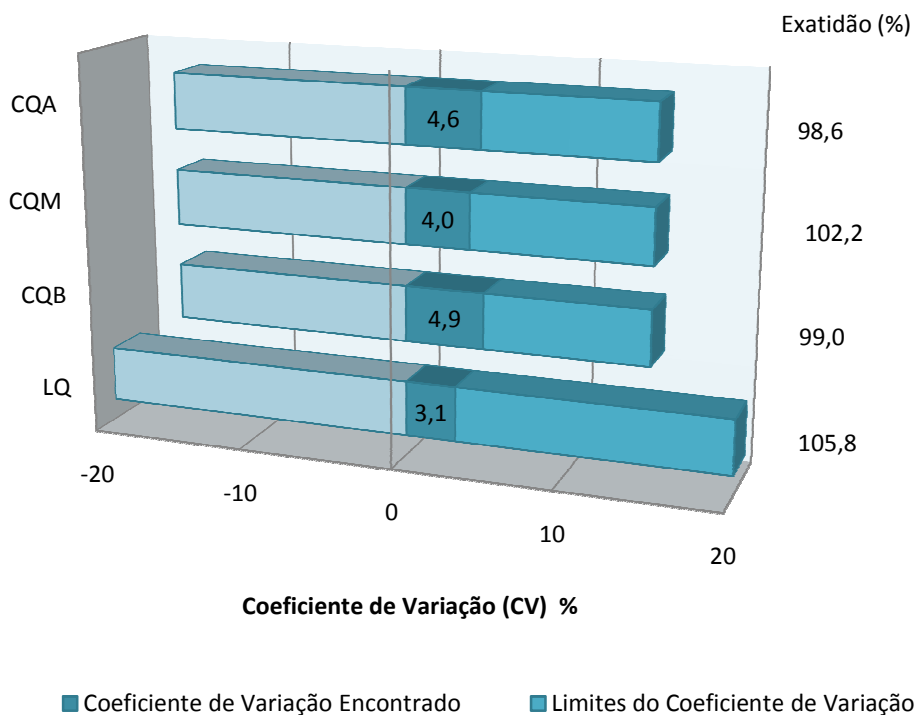


Figura 27: Resultados obtidos das análises intraensaio dos controles de qualidade e do LQ para matriz biológica (plasma).

A precisão e a exatidão interensaio podem ser avaliadas pelo valor médio de todas as replicatas de cada concentração nos 3 ensaios (Figura 28).

Precisão e Exatidão - Interensaio

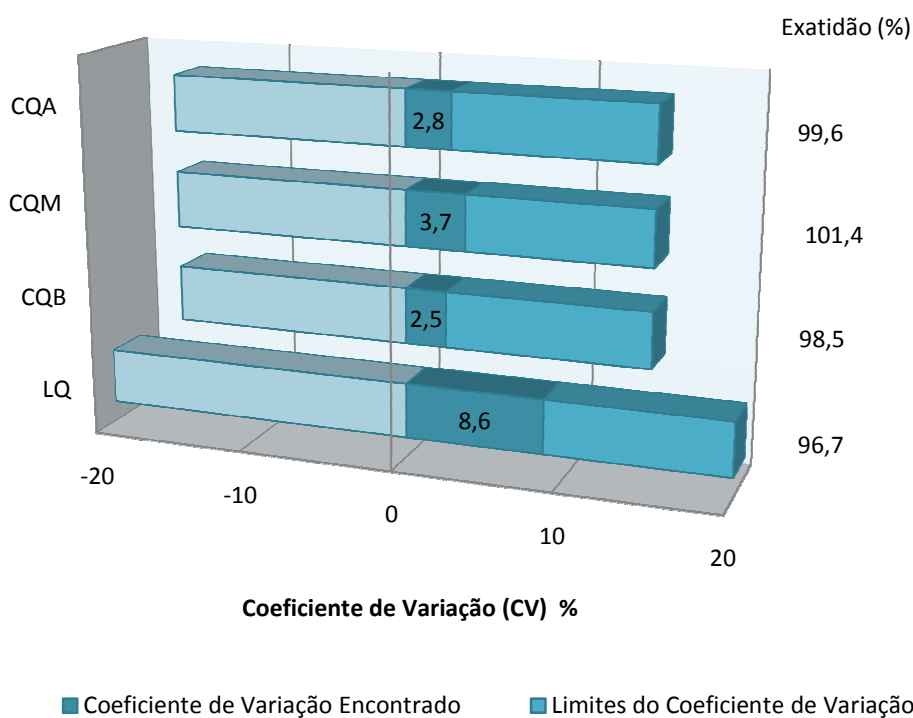


Figura 28: Resultados obtidos das análises interensaio dos controles de qualidade e do LQ para matriz biológica (plasma).

4.2.1.4 Recuperação

4.2.1.4.1 Losartana

Após comparação dos resultados analíticos de amostras extraídas para losartana a partir de três concentrações (CQB, CQM e CQA) e para valsartana (padrão interno) com aqueles obtidos de amostras não extraídas (padrão adicionado após a extração) preparadas em solução, os resultados apresentados foram satisfatórios e em conformidade com os critérios definidos previamente (Figura 29).

Recuperação - Losartana

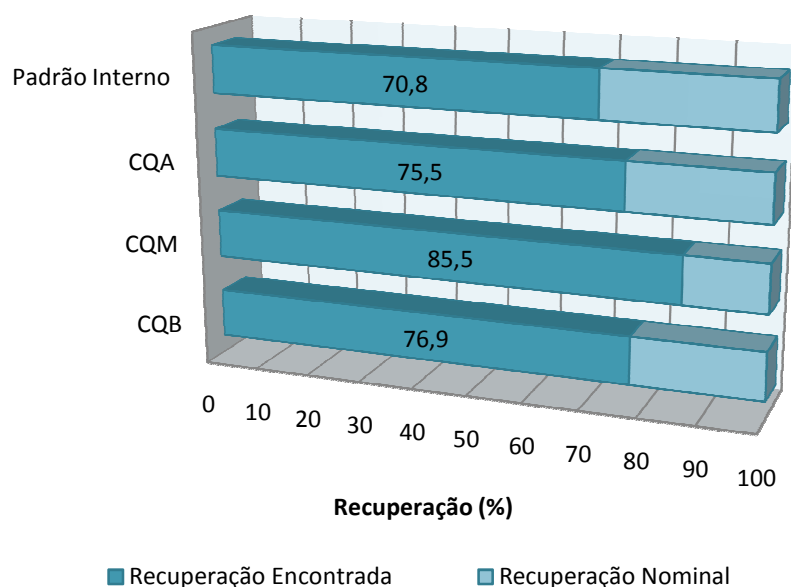


Figura 29: Resultados obtidos para a recuperação do fármaco e do padrão interno.

4.2.1.4.2 Hidroclorotiazida

Após comparação dos resultados analíticos de amostras extraídas para hidroclorotiazida a partir de três concentrações (CQB, CQM e CQA) e para clortalidona (padrão interno) com aqueles obtidos de amostras não extraídas (padrão adicionado após a extração) preparadas em solução, os resultados apresentados foram satisfatórios e em conformidade com os critérios definidos previamente (Figura 30).

Recuperação - Hidroclorotiazida

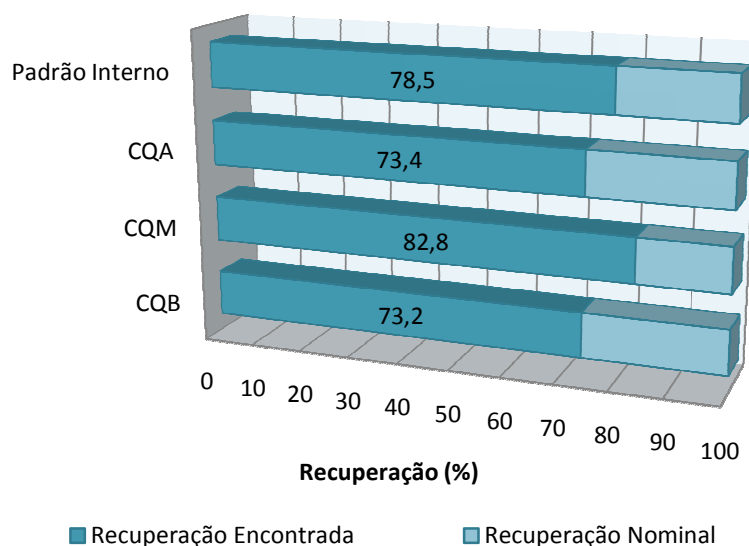


Figura 30: Resultados obtidos para a recuperação do fármaco e do padrão interno.

4.2.1.5 Estabilidades

Na determinação da estabilidade para losartana e hidroclorotiazida foram encontrados resultados em conformidade com os critérios previamente estabelecidos, sendo estes demonstrados pela Tabela 32.

Tabela 32: Estabilidade dos analitos em matriz biológica.

Estabilidade da Amostra	Losartana	Hidroclorotiazida
Estabilidade Solução	21 dias	21 dias
Pós-Processamento (Auto-Injetor)	2 dias (48 horas)	2 dias (48 horas)
Curta Duração (Bancada)	6,5 horas em temperatura ambiente	6,5 horas em temperatura ambiente
Ciclos de Degelo	3 ciclos sem sofrer degradação significativa	3 ciclos sem sofrer degradação significativa
Longa Duração	99 dias	99 dias

4.2.2 Quantificação das amostras

Todas as amostras respectivas a um voluntário foram analisadas no mesmo dia.

Uma pequena amostragem das concentrações plasmáticas, parâmetros farmacocinéticos e as razões individuais, para losartana e hidroclorotiazida respectivamente, entre teste e referência, estão descritas nas Figuras 31, 32 e Tabelas 33 e 34.

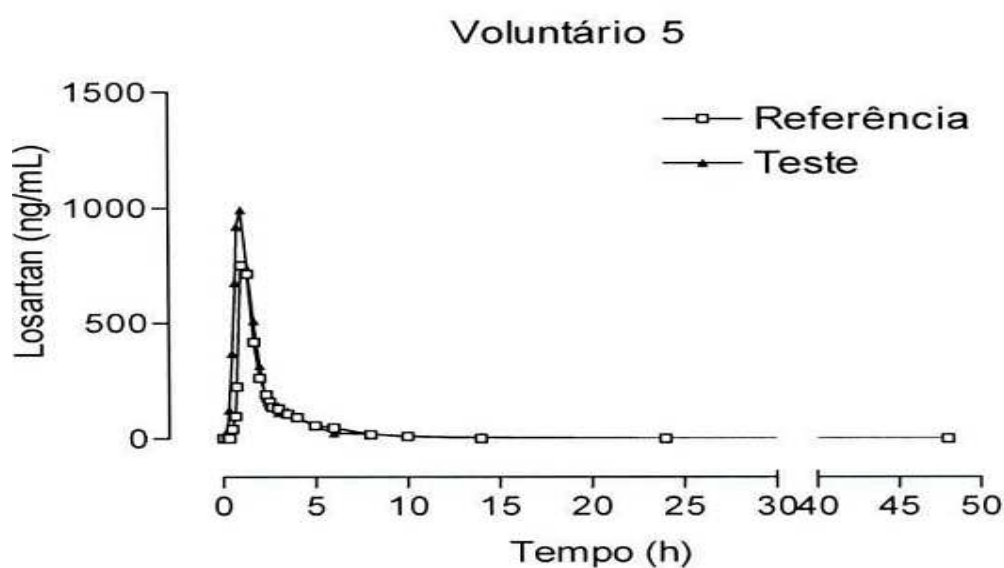


Figura 31: Gráfico de concentração versus tempo.

Tabela 33: Parâmetros farmacocinéticos para o voluntário 05 da losartana.

Parâmetros Farmacocinéticos	Teste	Referência
T_{max} (h)	1,00	1,00
C_{max} (ng/mL)	992,00	752,00
ASC_{0-t} (ng.h/mL)	1562,57	1195,47
$T_{1/2}$ (h)	2,09	1,87
ASC_{0-inf} (ng.h/mL)	1575,85	1222,49

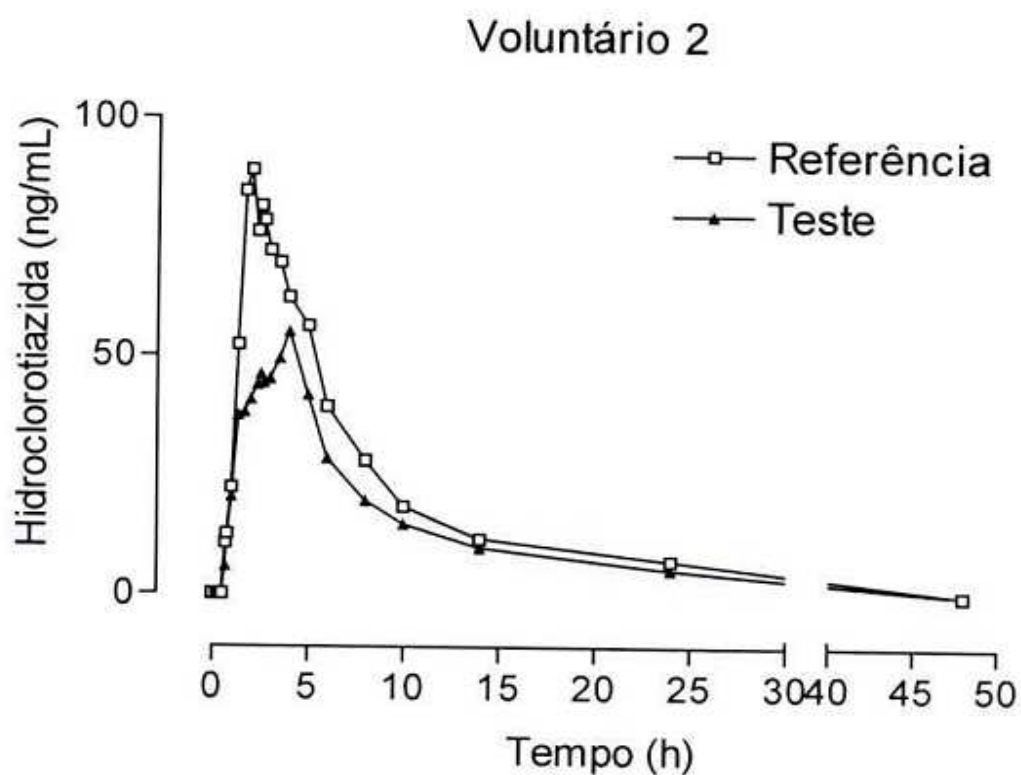


Figura 32: Gráfico de concentração versus tempo.

Tabela 34: Parâmetros farmacocinéticos para o voluntário 02 da hidroclorotiazida.

Parâmetros Farmacocinéticos	Teste	Referência
$T_{\max}$ (h)	4,00	2,00
$C_{\max}$ (ng/mL)	55,00	89,00
ASC_{0-t} (ng.h/mL)	425,02	595,18
$T_{1/2}$ (h)	9,64	5,53
ASC_{0-inf} (ng.h/mL)	497,91	652,75

As figuras 33 e 34, demonstram a média das concentrações plasmáticas (teste e referência) *versus* tempo para os 28 voluntários de losartana e hidroclorotiazida, respectivamente.

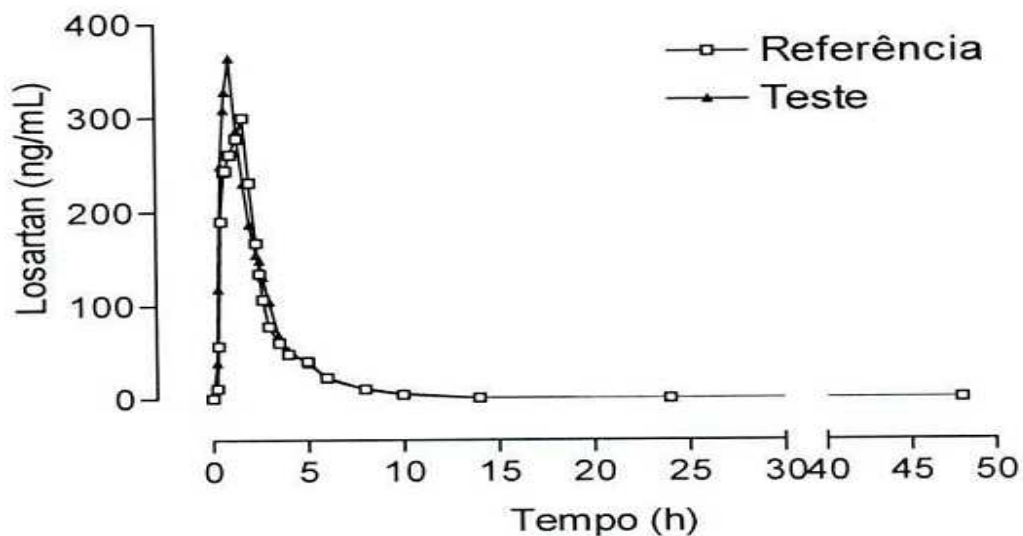


Figura 33: Curva média da concentração plasmática de dois medicamentos (teste e referência), baseada em 28 voluntários para losartana.

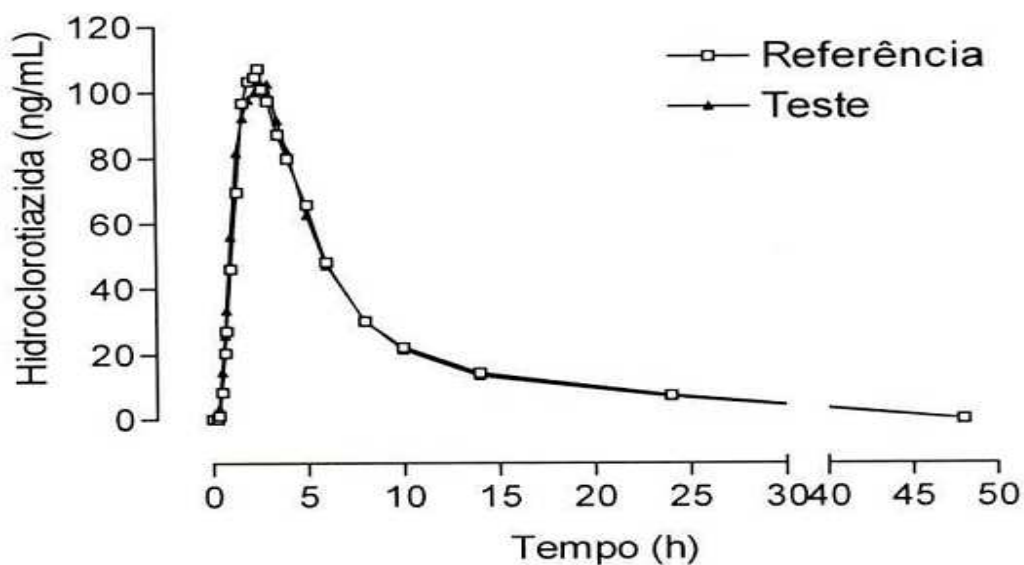


Figura 34: Curva média da concentração plasmática de dois medicamentos (teste e referência), baseada em 28 voluntários para hidroclorotiazida.

É importante ressaltar que o fato das figuras 33 e 34 serem construídas a partir das médias dos valores das concentrações de cada tempo, as mesmas não avaliam a diferença entre os parâmetros farmacocinéticos C_{max} e ASC_{0-t} .

4.3 Etapa estatística

O estudo de bioequivalência entre teste e referência para losartana e hidroclorotiazida foi realizado a partir do planejamento de blocos aleatorizados modificados (*crossover*) na análise, ou seja, cada bloco recebeu mais de uma formulação de um mesmo fármaco em diferentes períodos. A razão das médias geométricas e intervalos de confiança (IC 90%) que referem-se aos parâmetros de C_{max} e ASC_{0-t} , tanto para losartana quanto para hidroclorotiazida encontram-se descritas nas Tabelas 35 e 36 abaixo.

Tabela 35: Média, IC (90%), e conclusão para a razão das médias de C_{max} , e ASC_{0-t} . Dados transformados em logaritmo natural, losartana.

Razão Teste / Referência	Média Geométrica	IC (90%)	Poder do Teste (%)	Bioequivalência
C_{max}	100,42	(83,00 – 121,50)	49,73	sim
ASC_{0-t}	108,59	(98,27 – 119,98)	93,40	sim

Tabela 36: Média, IC (90%), e conclusão para a razão das médias de C_{max} , e ASC_{0-t} . Dados transformados em logaritmo natural, hidroclorotiazida.

Razão Teste / Referência	Média Geométrica	IC (90%)	Poder do Teste (%)	Bioequivalência
C_{max}	92,72	(82,41 – 104,32)	84,77	sim
ASC_{0-t}	98,74	(91,21 – 106,90)	98,69	sim

Observa-se no parâmetro $C_{\max}$ de losartana, o poder do teste encontrado é menor que 80%, portanto é necessário apresentar o teste estatístico complementar, para avaliação da variabilidade.

4.3.1 Teste de variabilidade – Pitman-Morgan's Adjusted F Test

Nos estudos de bioequivalência, o teste mais utilizado para testar a igualdade das variabilidades entre dois medicamentos é Pitman-Morgan's adjusted F test.

As hipóteses testadas são:

$$H_0: \sigma_T^2 = \sigma_R^2 \quad \text{vs.} \quad H_a: \sigma_T^2 \neq \sigma_R^2.$$

Pelo procedimento proposto por Pitman and Morgan, o teste estatístico pode ser obtido baseado em correlações entre as diferenças e correlação entre totais dos medicamentos de cada sujeito definidas como $V_{ik} = \ln(Y_{iT_k}) - \ln(Y_{iR_k})$ e $U_{ik} = \ln(Y_{iT_k}) + \ln(Y_{iR_k})$, onde Y_{iT_k} e Y_{iR_k} são respostas observadas ($\ln(C_{\max})$ ou $\ln(ASC)$) no sujeito i da seqüência k para formulação teste e referência, respectivamente.

4.3.1.1 Teste para $\ln(C_{\max})$ de Losartana

Em virtude do resultado de $\ln(C_{\max})$ de Losartana apresentar resultado de Poder de 49,73% foi realizado uma avaliação estatística complementar para verificar o impacto desse resultado na bioequivalência deste parâmetro.

Sob suposição de normalidade em $\ln(C_{\max})$, condições de ausência de efeito de seqüência e de período, temos:

$$S_{2vv} = 0,337, S_{2uu} = 0,764, S_{2vu} = 0,550.$$

O coeficiente de correlação de Pearson entre V_{ik} e U_{ik} é dado por $r_{uv} = 0,119$.

Portanto, tem $F_{uv} = 0,377$, com um p-valor de 0,545. Baseado no p-valor, não se rejeita a hipótese nula de igualdade de variabilidade entre duas formulações ao nível de 5%, assegurando a bioequivalência para este parâmetro farmacocinético.

4.3.2 Amostragem

No período de amostragem realizado na etapa clínica houve alguns atrasos no momento da coleta, esses atrasos foram registrados e empregados no cálculo dos parâmetros farmacocinéticos. Na Tabela 37 constam alguns desses registros.

Tabela 37: Atrasos de pontos de coleta.

Voluntário	Período	Horário de coleta (h)	Tempo de atraso (min)
02	1	24:00	3
05	1	06:00	1
05	1	24:00	57
23	1	14:00	1
8	2	0:20	3
17	2	10:00	1
18	2	24:00	42

4.3.3 Análise de variância

A análise de variância é o estudo da variabilidade de seqüência e de período dos dados. As Tabelas 38 e 39, mostram uma análise de variância para losartana, e as Tabelas 40 e 41 para hidroclorotiazida.

Tabela 38: ANOVA para $\ln(C_{\max})$ da losartana.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	Valor-p
Inter-individual					
Seqüência	1	0,4567	0,4567	1,2056	0,2822
Resíduos (inter)	26	9,8504	0,3788	2,1681	0,0267
Intra-individual					
Fármaco	1	0,0002	0,0002	0,0014	0,9702
Período	1	0,0028	0,0028	0,0160	0,9000
Resíduos (intra)	26	4,5432	0,1747		
Total	55	14,8536			

Tabela 39: ANOVA para $\ln(ASC_{0-t})$ da losartana.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	Valor-p
Inter-individual					
Seqüência	1	0,1010	0,1010	0,4311	0,5172
Resíduos (inter)	26	6,0960	0,2344	4,8951	6,485E-05
Intra-individual					
Fármaco	1	0,0949	0,0949	1,9827	0,1709
Período	1	0,0603	0,0603	1,2594	0,2720
Resíduos (intra)	26	1,2453	0,0478		
Total	55	7,5977			

Tabela 40: ANOVA para $\ln(C_{max})$ da hidroclorotiazida.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	Valor-p
Inter-individual					
Seqüência	1	0,1443	0,1443	0,8448	0,3664
Resíduos (inter)	26	4,4432	0,1708	2,5548	0,0099
Intra-individual					
Fármaco	1	0,0799	0,0799	1,1951	0,2843
Período	1	0,0179	0,0179	0,2688	0,6084
Resíduos (intra)	26	1,7391	0,0668		
Total	55	6,4247			

Tabela 41: ANOVA para $\ln(ASC_{0-t})$ da hidroclorotiazida.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	Valor-p
Inter-individual					
Seqüência	1	0,0003	0,0003	0,0023	0,9618
Resíduos (inter)	26	4,1405	0,1592	5,2490	3,443E-05
Intra-individual					
Fármaco	1	0,0022	0,0022	0,0739	0,7878
Período	1	0,0504	0,0504	1,6628	0,2085
Resíduos (intra)	26	0,7888	0,0303		
Total	55	4,9824			

4.3.4 Parâmetros Farmacocinéticos

Os parâmetros farmacocinéticos médios, baseados em um intervalo de confiança de 90% obtidos da análise comparativa teste/referência dos 28 voluntários, encontram-se descritos nas Tabelas 42 para losartana e 43 para hidroclorotiazida.

Tabela 42: Médias e IC (90%) dos parâmetros farmacocinéticos para losartana.

Parâmetros farmacocinéticos	Referência	Teste
T_{max} (h) Média (IC 90%)	1,39 (1,11 – 1,68)	1,21 (1,00 – 1,43)
C_{max} (ng/mL) Média (IC 90%)	531,96 (447,06 – 616,87)	532,54 (439,89 – 607,19)
ASC_{0-t} (ng.h/mL) Média (IC 90%)	747,76 (666,16 – 829,37)	808,26 (717,59 – 898,94)
t_{1/2} (h) Média (IC 90%)	1,98 (1,82 – 2,14)	1,91 (1,78 – 2,04)
ASC_{0-inf} (ng.h/mL) Média (IC 90%)	766,54 (684,32 – 848,77)	826,17 (735,44 – 916,90)

Tabela 43: Médias e IC (90%) dos parâmetros farmacocinéticos para hidroclorotiazida.

Parâmetros farmacocinéticos	Referência	Teste
T_{max} (h) Média (IC 90%)	2,33 (2,01 – 2,65)	2,64 (2,17 – 2,90)
C_{max} (ng/mL) Média (IC 90%)	131,92 (116,56 – 147,28)	121,81 (108,91 – 134,71)
ASC_{0-t} (ng.h/mL) Média (IC 90%)	729,19 (662,98 – 795,41)	724,84 (650,01 – 799,67)
t_{1/2} (h) Média (IC 90%)	8,52 (7,83 – 9,21)	8,11 (7,40 – 8,82)
ASC_{0-inf} (ng.h/mL) Média (IC 90%)	821,75 (747,60 – 895,90)	814,50 (719,81 – 890,38)

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, para avaliação do perfil farmacocinético comparativo, foram escolhidos os fármacos Losartana e Hidrocortiazida, associados em único medicamento, na forma de comprimidos revestidos. O medicamento referência estabelecido, é o Hyzaar, produzido pelo laboratório Merk Sharp Dome. A escolha foi realizada devido o medicamento apresentar eficácia comprovada por via oral, segurança e boa tolerabilidade (95, 96, 97), além de permitir a redução na quantidade de medicamentos administrados durante o tratamento, facilitando a adesão ao tratamento da Hipertensão Arterial Sistêmica (43).

A cada ano morrem 7,6 milhões de pessoas em todo o mundo devido à hipertensão, segundo dados do Boletim Global de Doenças Relacionadas à Hipertensão. Cerca de 80% dessas mortes ocorrem em países em desenvolvimento como o Brasil, sendo que mais da metade das vítimas têm entre 45 e 69 anos. A hipertensão arterial é responsável, segundo o documento, por 54% de todos os casos de acidente vascular cerebral (AVC) e 47% dos casos de infarto, fatais e não fatais, em todo o mundo. Na última década, a hipertensão fez mais de 70 milhões de vítimas fatais. No Brasil, a hipertensão afeta mais de 30 milhões de brasileiros (36% dos homens adultos e 30% das mulheres) e é o mais importante fator de risco para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares (DCV), com destaque para o AVC e o infarto do miocárdio, as duas maiores causas isoladas de mortes no país. Mas a percepção da população é outra. Dados da pesquisa Datafolha, de novembro de 2009, revelam a percepção errônea, na população, de que o câncer é a principal causa de óbitos no Brasil. Quanto à prevenção de doenças, a mesma pesquisa revela que, embora 90% identifiquem os fatores de risco (hipertensão, tabagismo, colesterol e estresse), apenas 3% temem sofrer uma DCV (92, 93, 94).

Nos cuidados com a hipertensão, o abandono da terapêutica por efeitos indesejados de drogas é avaliado de diversas maneiras. Vários estudos mostram que o grau de adesão varia com as diferentes classes de anti-hipertensivos. Antagonistas de receptor de angiotensina têm as melhores taxas de adesão, seguidos pelos inibidores da enzima conversora de angiotensina, bloqueadores de canais de cálcio, betabloqueadores e diuréticos (98, 99).

Atualmente, existem alguns medicamentos genéricos de Losartana 100mg + Hidroclorotiazida 25mg comprimidos revestidos disponíveis no mercado brasileiro, onde o preço, para a embalagem com 30 comprimidos, pode ser encontrado por até R\$ 36,36. Já o medicamento de referência (Hyzaar – Merck Sharp Dome) custa R\$ 85,35 (108).

As formulações de Losartana + Hidroclorotiazida têm a conveniência da dose única diária, sendo assim, a substituição do medicamento referência pelo medicamento genérico permite ao paciente uma economia de aproximadamente 57% ou R\$ 49 mensais (108).

Diante disso, a realização de estudos de farmacocinética comparada de fármacos, para verificar se existe bioequivalência entre o medicamento teste e o medicamento referência adotado como padrão pelo Ministério da Saúde, é fundamental para garantir a política de medicamentos genéricos estabelecida, favorecendo o acesso aos medicamentos para a população de baixa renda.

O planejamento de estudo utilizado para a quantificação da associação de losartana e hidroclorotiazida foi do tipo aleatório, cruzado com um intervalo entre os períodos de no mínimo 7 meias-vidas para a completa eliminação do fármaco. Justifica-se o delineamento cruzado com um fator eliminatório relacionado ao indivíduo de estudo, pois este método permite a comparação do medicamento teste e referência em um mesmo indivíduo. O intervalo de tempo entre os períodos é realizado de forma a garantir que não haja resíduos interferentes que possam prejudicar o andamento do estudo.

No que diz respeito à Etapa Clínica, a análise da Tabela 17 que descreve os dados estatísticos descritivos da população permite observar que todos os voluntários selecionados encontram-se de acordo com os parâmetros pré-definidos no protocolo clínico, apresentando valores médios de 31,85 anos para a faixa etária, 1,64 m para a altura, 63,29 Kg para o peso e 23,53 Kg/m² para o índice de massa corpórea. O IMC calculado por gênero não apresenta diferenças consideráveis, os valores para o sexo masculino e feminino foram de 22,87 Kg/m² e 24,17 Kg/m² respectivamente. O desvio padrão calculado por gênero mostra que esses valores se

apresentam maiores para os voluntários de sexo masculino (2,45) do que para os voluntários de sexo feminino (2,09291).

Todos os voluntários receberam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2), na íntegra, conforme as diretrizes da CNS 196/96 e complementares.

Para cada voluntário a medicação foi administrada aleatoriamente em uma sequência de tratamento (Teste/Referência ou Referência/Teste). A lista de randomização está descrita na Tabela 5. A randomização é uma ferramenta estatística essencial na validação de um estudo de bioequivalência. Inferências estatísticas válidas são normalmente baseadas na suposição de que os erros do modelo estatístico empregado são variáveis aleatórias independentemente distribuídas, o que pode ser garantido pela correta aleatorização. Não ocorreram desistências nem retiradas de voluntários.

Durante o período de confinamento a pressão arterial dos voluntários foram aferidas com uma frequência de 1 hora durante as primeira 6 horas, após a sexta hora a aferição passou a ocorrer em uma frequência de 2 horas até a décima quarta hora, posteriormente aferiu-se às 24 e 48 horas. Os dados gerados por essas aferições descritos na Figura 15. demonstram claramente as variações de pressão alta (sistólica) e baixa (diastólica). Através desta comparação, pôde-se constatar que não houveram variações estatisticamente significativas entre as formulações (teste/referência) quando aplicadas em voluntários saudáveis, submetidos às mesmas condições alimentares – que minimiza as possíveis interferências na farmacocinética do estudo – e de confinamento.

A fase clínica do estudo conclui-se de forma satisfatória, não houve perda de amostras que pudessem ocasionar comprometimento das fases subseqüentes. O encerramento se deu com a alta de todos os 28 voluntários, cujos exames de alta foram realizados a contento e com resultados aceitáveis.

Em estudos de bioequivalência, o desenvolvimento e validação de uma metodologia bioanalítica para quantificação de fármacos em matrizes biológicas, é uma ferramenta de grande importância para o controle de qualidade dos

medicamentos. É um fator determinante na geração de dados reprodutíveis e confiáveis após execução de estudos farmacocinéticos. O processamento de um grande número de matrizes biológicas, que geralmente é requerido em estudos farmacocinéticos, que necessitam de procedimentos analíticos rápidos, sensíveis, específicos e seletivos.

No desenvolvimento da metodologia analítica empregada, foram avaliadas as características físico-químicas da losartana e hidroclorotiazida. Foram escolhidos como padrões internos, respectivamente, a valsartana e a clortalidona, por se tratarem de substâncias com bastante similaridade química aos analitos, disponíveis comercialmente com fácil acesso e que atendem às finalidades analíticas propostas.

Os padrões internos são essenciais em espectrometria de massa quantitativa, para corrigir a possível variabilidade no processo de extração e ionização na fonte. Uma quantidade fixa de padrão interno é adicionada na amostra no processo inicial da extração. O analisador detecta tanto o analito quanto o padrão interno e a resposta é registrada como a relação entre ambos, de forma tal que qualquer variação na extração ou ionização entre as amostras é compensada. É importante que o analito e o padrão interno tenham uma estrutura química e propriedades físicas suficientemente similares para que se comportem de forma análoga e estejam submetidas aos mesmos efeitos matriz. Podem ocorrer problemas quando em um mesmo estudo, mais do que um analito será analisado, o que pode dificultar a escolha do padrão interno adequado, sendo que este deve apresentar uma ionização e extração semelhantes ao analito (103, 104, 105).

O procedimento de extração selecionado para o processamento das amostras, do tipo líquido-líquido, empregou como solventes de extração uma composição de: acetato de etila/hexano/éter dietílico (70/15/15; v/v/v) que foi a que, com polaridade mais adequada para carrear o fármaco da fase aquosa, mostrou melhor rendimento com ausência de efeito matriz, supressão iônica e carry over. A adição do ácido fórmico 1,3% interagiu no deslocamento do equilíbrio químico que favoreceu o processo extração, assim como no rompimento das ligações com as proteínas plasmáticas.

Foi estabelecido um comparativo entre um método publicado na literatura antes deste trabalho que descreve a quantificação simultânea de hidroclorotiazida e losartana em plasma humano, onde foi utilizado um procedimento totalmente automatizado de extração em fase sólida (SPE), para isolar a losartana e seu principal metabólito EXP-3174, hidroclorotiazida e furosemida (padrão interno) do plasma humano (106). Contudo, neste trabalho, os autores descrevem um menor limite de quantificação (LQ) tanto para losartana (1,0 ng/mL) quanto para hidroclorotiazida (0,5 ng/mL) em relação ao limite de quantificação (LQ) aqui descrito para ambos (4,0 ng/mL). A desvantagem desta abordagem é o alto preço das cartuchos SPE e os aparelhos automatizados necessários para realizar as extrações, tornando impossível para todos os laboratórios oferecer este sistema de extração em uma análise de rotina.

A combinação entre a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a espectrometria de massa seqüencial (MS-MS), conhecida por HPLC-MS-MS, apresenta-se como uma técnica de análise que une a eficiência das colunas cromatográficas na separação de misturas complexas com a elevada capacidade de identificação de substâncias pela apresentação do espectro de massa. O espectrômetro de massa é um dispositivo analítico, que tem a capacidade de determinar o peso molecular de compostos químicos através da separação dos íons moleculares de acordo com sua relação massa/carga (m/z), sendo que esses íons são gerados, pela perda ou ganho de uma carga (100), e que auxilia na determinação da estrutura dos compostos em questão (101).

Um estudo farmacocinético, que relatou a quantificação de ambas as moléculas em plasma humano por uma combinação de HPLC/Fluorescência para detecção de losartana e HPLC/MS/MS para detecção de hidroclorotiazida foi publicado recentemente (107). A principal desvantagem deste estudo é a aplicação de dois métodos diferentes para a quantificação dos analitos. Todas as amostras devem ser analisadas duas vezes, a aplicação de dois diferentes métodos de extração, seguido por dois diferentes sistemas de detecção. Apesar de também apresentar um menor limite de quantificação (LQ) para hidroclorotiazida (0,41

ng/mL), o limite de quantificação (LQ) de losartana foi superior ao método descrito neste trabalho (6,4 ng/mL).

O método analítico proposto foi devidamente validado pelos parâmetros de seletividade / especificidade, sensibilidade, linearidade, precisão e exatidão, com uma recuperação média para o losartana e hidroclorotiazida de 79,3 % e 76,5 %, respectivamente.

Nenhuma interferência significativa foi observada nos tempos de retenção dos fármacos e dos padrões internos, nas condições analisadas, conforme demonstrado nos cromatogramas apresentados nas Figuras 16 e 17.

O LQ validado foi de 4 ng/mL e foi suficiente para caracterização do perfil farmacocinético de todos os voluntários, atendendo o critério da ASC_{0-t} , ser de, no mínimo, 80% da ASC_{inf} .

A faixa de linearidade validada (4 – 800 ng/mL para Losartana e 4 – 500 ng/mL para Hidroclorotiazida) abrangeu todas as concentrações obtidas nas amostras do estudo. O coeficiente de correlação linear foi superior a 0,98 (0.9963 e 0.9992) como pode ser observado nas Figuras 23 e 24.

O método mostrou-se preciso e exato, intra e intercorridas analíticas, sendo a variação inferior a 15% para todos os valores obtidos. A maior variação encontrada foi de 9,0% (Figura 26).

Pelos resultados de estabilidade obtidos, comprovou-se a estabilidade dos fármacos e dos padrões internos (quando foi o caso) em todas as condições experimentais do estudo, nos recipientes e nas condições de armazenagem (Tabela 32).

Os tempos de coleta são responsáveis pela definição do formato da curva de calibração, e pela consideração mais precisa do valor de C_{max} e ASC_{0-t} . A escolha dos tempos de coleta se baseia no tempo de meia vida do fármaco, na concentração máxima que atinge no organismo e no tempo necessário para se alcançar a concentração máxima. É recomendado que o período de coleta abranja uma faixa de três a cinco meias vidas de eliminação no intuito de compreender a total absorção do fármaco em análise.

Para estudos de bioequivalência, o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos é obtido a partir da curva de concentração sangüínea do fármaco *versus* tempo, após administração dos fármacos em estudo. Para isso, determina-se a área sob a curva, a máxima concentração sangüínea obtida e o tempo necessário para que a concentração seja atingida.

A variabilidade de seqüência e do período dos dados expressa pela análise da variância (Tabelas 38, 39, 40, 41) permite afirmar através dos resultados obtidos (valor-p = 0,2822 para C_{max} e valor-p = 0,5172 para ASC_{0-t} , para losartana e valor-p = 0,3664 para C_{max} e valor-p = 0,9618 para ASC_{0-t} , para hidroclorotiazida), que para os parâmetros farmacocinéticos C_{max} e ASC_{0-t} o efeito de seqüência não é significativo. Além disso, para o efeito de período os resultados obtidos (valor-p = 0,9000 para C_{max} e valor-p = 0,2720 para ASC_{0-t} , para losartana e valor-p = 0,6084 para C_{max} e valor-p = 0,2085 para ASC_{0-t} , para hidroclorotiazida) permite concluir que para os parâmetros farmacocinéticos o efeito de período também não é significativo. Mas esse resultado de variância não implica na bioequivalência média entre duas formulações, pois a bioequivalência é definida pelo intervalo de confiança (IC) com 90% de confiança.

Apesar do poder do teste para C_{max} de losartana apresentar valor de 49,73%, este foi avaliado de forma complementar pelo teste de variabilidade – Pitman-Morgan's Adjusted F Test, comprovando que não se rejeita hipótese nula de igualdade de variabilidade entre as duas formulações ao nível de 5%, assegurando o resultado de bioequivalência neste parâmetro.

A análise comparativa entre teste e referência (Tabela 42 e 43) permite observar que os valores tanto para a média quanto para o IC 90% entre as formulações são próximos. Nota-se também que a média de $ASC_{0-ult h}$, (referência = 747,76, teste 808,26) é maior do que 80% da média de ASC_{0-inf} (referência 80% = 613,23, teste 80% = 660,94), para o medicamento referência e teste conforme aconselhado pela legislação vigente.

A razão entre as médias geométricas do C_{max} entre as formulações teste e referência para losartana foi de 100,42%. O intervalo de confiança de 90% foi de

83,00% - 121,50%, e para hidroclorotiazida foi de 92,72%. O intervalo de confiança de 90% foi de 82,41% - 104,32%.

A razão entre as médias geométricas do ASC_{0-t} entre as formulações teste e referência para losartana foi de 108,59%. O intervalo de confiança de 90% foi de 98,27% - 119,98%, e para hidroclorotiazida foi de 98,74%. O intervalo de confiança de 90% foi de 91,21% - 109,90%.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nas relações de T/R de C_{max} e ASC, observamos que os mesmos estavam dentro do intervalo proposto por organismos regulatórios (80-125%) para um intervalo de confiança de 90%, e com isso se conclui que a formulação teste contendo losartana 100 mg associado a 25 mg de hidroclorotiazida, na forma de comprimidos revestidos é bioequivalente ao medicamento referência (Hyzaar® fabricado pela Merck Sharp Dome®), tanto em relação ao alcance da concentração máxima, quanto em relação a taxa de absorção de ambos os fármacos.

O método bioanalítico escolhido, utilizando a cromatografia líquida acompanhada à espectrometria de massa (HPLC-MS/MS) utilizada para quantificar simultaneamente os fármacos losartana e hidroclorotiazida, demonstrou-se satisfatório para os objetivos propostos, permitindo a análise de centenas de amostras diariamente, utilizando uma quantidade relativamente pequena de plasma, solvente e os outros consumíveis.

Não foram evidenciadas variações de pressão (sistólica e diastólica) significativas entre as formulações quando aplicadas em voluntários saudáveis durante o período de internação e coleta ao que foram submetidos.

Os resultados farmacocinéticos demonstraram que o método é adequado para a quantificação destes fármacos em amostras de plasma obtidas durante um estudo de bioequivalência farmacêutica.

É relevante ressaltar que o método bioanalítico validado para quantificação das drogas simultaneamente, está em conformidade com o preconizado pelos órgãos regulatórios, tanto pelo FDA (*Food and Drug Administration*) quanto pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), para estudos de bioequivalência farmacêutica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdou HM. Dissolution, Bioavailability and Bioequivalence. Easton, PA, Mack Printing 1989 1:554.
2. Shargel L, Wu-Pong S, Yu Abc. Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics. 5th ed., McGraw-Hill, 2005.
3. TRIBUNAL INTERNACIONAL DE NUREMBERG – 1947; Trials of war criminal before the Nuremberg Military Tribunals. Control Council Law 1949;10(2):181-182.
4. Princípios Éticos para Pesquisa Clínica Envolvendo Seres Humanos; Adotado pela 18ª Assembléia Geral da Associação Médica Mundial Helsinque, Finlândia, Junho 1964 e emendas da: 29ª Assembléia Geral da Associação Médica Mundial, Tóquio, Japão, Outubro 1975; 35ª Assembléia Geral da Associação Médica Mundial, Veneza, Itália, Outubro 1983;41ª Assembléia Geral da Associação Médica Mundial, Hong Kong, Setembro 1989;48ª Assembléia Geral da Associação Médica Mundial, Oeste de Somerset, República da África do Sul, Outubro 1996;52ª Assembléia Geral da Associação Médica Mundial, Edimburgo, Escócia, Outubro 2000.
5. BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996. Diretrizes e Normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde.
6. Consiglieri VO, Storpirtis S. Bioequivalência de medicamentos: objetivos, parâmetros farmacocinéticos, delineamento experimental e critérios de avaliação. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2000 36:13-21.
7. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH (CDER). Guidance for industry: Bioavailability and Bioequivalence requirements, 2003.

8. Shargel L, Kanfer I. Generic drug Development Solid Oral Dosage Forms. New York: Marcel Deker, 2005.
9. Tandon V. Bioavailability and bioequivalence. In: Schoenwald, RD, Pharmacokinetics in drug Discovery and Development. CRC Press, 2002; 97-112.
10. BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lei nº 9.787, de 10 de fevereiro de 1999. Dispõe sobre a Vigilância Sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências. Diário Oficial da União, 1999.
11. BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 1.170 de 19/04/2006. Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos. Publicado em DOU em 24/04/2006;
12. BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 893 de 29/05/2003. Guia para realizações de alterações, inclusões, notificações e cancelamentos pós-registro de medicamentos. Publicado em DOU em 07/11/2003;
13. BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 310 de 1º/09/2004. Guia para elaboração do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução. Publicado em DOU em 03/09/2004;
14. Storpirtis S. Biofarmacotécnica: fundamentos de biodisponibilidade, bioequivalência, dissolução e intercambialidade de medicamentos. São Paulo, 1999.
15. Lieberman HA, Lancham L, Schwartz JB. Pharmaceutical Dosage Form – Tablets, 1989 1:1-127, 2: 245-316, 3: 303-365.

16. Aulton ME. Delineamento de Formas Farmacêuticas, 2005, p. 124-220 e 402-443.
17. Horter D, Dressman JB. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001 46:75-87.
18. Pinheiro M do C. Os centros de equivalência farmacêutica da ANVISA. *Fármacos e Medicamentos*, set./out 2003, 24 (4), p. 18-37.
19. Chinchilla IN. Resolução RDC 133/2003 – Uma visão regulatória sobre novas exigências para medicamentos similares. *Fármacos e Medicamentos*, São Paulo, set./out 2003, 24, (4), p.10-37.
20. Storpirtis S, Balduino J, Bueno MM, Freitas ST, Gatto RC, Lima FP, Marcolongo R, Valente VR. Aspectos técnicos ao registro de medicamentos genéricos no Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003.
21. De Moraes MEA, De Moraes MO. Ensaio clínicos de medicamentos no Brasil. *Fármacos e Medicamentos*, set./out., 2000v. 6, n. 1, p. 36-40.
22. Schuirmass DJ. A comparison of the two one-sided tests procedure and the Power approach for assessing the equivalence of average bioavailability. *Journal of Pharmacokinetic and Biopharmaceutics*, 1987 15: 657-680.
23. HEALTH CANADA. Therapeutic Products Directorate Guideline: Conduct and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies – Part A: Oral Dosage Formulations used for Systemic Effects, 1992.
24. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Committee for Medicinal Products for human Use, Guideline on the investigation of Bioequivalence, 2008.
25. Lancham L, Lieberman HA, Kanig JL. Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica, 2001 1:113-171; 1: 295-504, 2:509-598.

26. Amindon GL, Lennernas H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug products dissolution and in vivo bioavailability, *Pharmaceutical Research*, 1995. 12:413-420,
27. Ascione FJ, Kirking DM, Gaither CA, Welage LS. Historical overview of generic medication policy. *Journal of the American Pharmaceutical Association (Washington)*. 2001 41:567-577.
28. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE/ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE/AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Workshop Perspectivas para o fortalecimento dos mercados de medicamentos similares e genéricos em países em vias de desenvolvimento, 2003. Brasil, 2003. Disponível em:
<http://www.opas.org.br/medicamentos/site/UploadArq/folder_port.pdf>
Acesso em 18/06/2009.
29. BRASIL, Ministério da Saúde. Decreto Nº 793, de 05/04/1993. Altera os decretos nº 74.170, de 10/06/1974, e 79.094 de 05/01/1977, que regulamentam respectivamente as leis Nº 5.991 de 17/01/1973 e 6.360 de 23/09/1976 e dá outras providencias, 2003.
30. BRASIL, Ministério da Saúde. Lei nº 9.279, de 14 de maio de 1996. Regulamenta direitos e obrigações à propriedade industrial. *Diário Oficial da União*, 1996.
31. BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria MS/GM nº 3.916, de 30/10/1998. Aprova a Política Nacional de Medicamentos. Brasília, 1998.
32. BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 391 de 09/08/1999. Aprova o regulamento técnico para registro de medicamentos genéricos no Brasil. Brasília, 1999.

33. BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 16 de 02/03/2007. Aprova o Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos. Brasília, 2007.
34. JARDIM PCBVS, Lima AL. Historical aspects and current tendencies in blood pressure measurement. *Revista Brasileira de Hipertensão*, 2000 7(1): p. 6.
35. Messerli FH. This day 50 years ago. *N Engl J Med*, 1995, 332(15): 9.
36. Hamdy, R.C., Hypertension: a turning point in the history of medicine...and mankind. *South Med J*, 2001 94(11):1045-7.
37. VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, *Rev Bras Hipertens*, 2010,17(1): 256-312.
38. Nunes V, Neilson J, O'Flynn N, Calvert N, Kuntze S, Smithson H, Benson J, Blair J, Bowser A. Clinical Guidelines and Evidence Review for Medicines Adherence: involving patients in decisions about prescribed medicines and supporting adherence. London: National Collaborating Centre for Primary Care and Royal College of General Practitioners, 2009.
39. Gusmão JL, Ginani GF, Silva GV, Ortega KC, Mion D. Adesão ao tratamento em hipertensão arterial sistólica isolada, *Rev Bras Hipertens* 2009, 16:38-43.
40. ADHERENCE TO LONG-TERM THERAPIES: evidence for action. World Health Organization, 2003.
41. Yiannakopoulou ECH, Papadopoulos JS, Cokkinos DV, Mountokalakis TD. Adherence to treatment antihypertensive treatment: a critical factor for blood pressure control. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 2005, 12:243-9.
42. Mion DJR, Pierin AMG, Ignez E, Ballas D, Marcondes M. Conhecimento, preferências e perfil dos hipertensos quanto ao tratamento farmacológico e não farmacológico. *J Bras Nefrol*, 1995, 17:229-36.

43. Eisen SA, Miller DK, Woodward RS, Spitznagel E, Przybeck TR. The effect of prescribed daily dose frequency on patient medication compliance. ARCH INTERN MED, 1990, 150:1881-4.
44. Moser M., Prisant L.M. Low-dose combination therapy in hypertension [Editorial]. Am Fam Physician, 1997 56:1275-6,1279,1282.
45. Moser M, Black HR. The role of combination therapy in the treatment of hypertension. A J Hypertens, 1998 11:73S-8S.
46. Rang HP, Dale MM, Ritter, JM. O sistema vascular, Farmacologia, editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1999.
47. Law MR, Wald NJ, Morris K, Jordan RE. Value of low dose combination treatment with blood pressure lowering drugs: analysis of 354 randomised trials. British Medical Journal, 2003, 326:1427-34.
48. Guidelines for the Management of Arterial Hypertension. The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC), Journal of Hypertension, 2007, 25:6.
49. Sica DA, Gehr TW, Ghosh S. Clinical pharmacokinetics of losartan. Clin Pharmacokinet, 2005 44:797-814.
50. Duncia JV, Chiu AT, Carini DJ, Gregory GB, Johnson AL, Price WA, Wells GJ, Wong PC, Calabrese JC, Timmermans P.B. The discovery of potent nonpeptide angiotensin II receptor antagonists: A new class of potent antihypertensives. J. Med chem, 1990, 33: 1312-1329.
51. Laurence L, Brunton & Johns S, Lazo & Keith L, Parker. Goodman and Gilman's. As bases farmacológicas da terapêutica. 11ª edição, ed. New York: McGraw-Hill, 2006, 724.

52. PHYSICIANS' DESK REFERENCE 2003. 57th edition. Montvale, NJ: Thomson PDR; 2003.
53. Mosby's Drug Consult. St. Louis, MO: Mosby; 2007 p. II-1420 – II-1426.
54. Menard J. Anthology of the renin-angiotensin system: a one hundred reference approach to angiotensin II antagonists. J Hypertens Suppl 1993;11:S3-11.
55. Unger T, Jakobsen A, Heroy J, Ralph A, Rees T, Shaw M. Targeting cardiovascular protection: the concept of dual renin-angiotensin system control. Medscape J Med, 2008 10 Suppl:S4.
56. Brunner HR, Nussberger J, Waeber B. Angiotensin II blockade compared with other pharmacological methods of inhibiting the renin-angiotensin system. J Hypertens Suppl, 1993 11:S53–58.
57. Rush JE, Rajfer SI. Theoretical basis for the use of angiotensin II antagonists in the treatment of heart failure. J Hypertens Suppl, 1993, 11:S69–71.
58. Sachinidis A, Ko Y, Weisser P, Meyer Zu Brickwedde, Dusing R, Christian R, Wieczorek AJ, Vetter H. EXP3174, a metabolite of losartan (MK 954, DuP 753) is more potent than losartan in blocking the angiotensin II-induced responses in vascular smooth muscle cells. J Hypertens, 1993, 11:155–162.
59. Lo MW, Goldberg MR, Mccrea JB, Lu H, Furtek CI, Bjornsson TD. Pharmacokinetics of losartan, an angiotensin II receptor antagonist, and its active metabolite EXP3174 in humans. Clin Pharmacol Ther, 1995, 58:641–649.
60. Ohtawa M, Takayama F, Saitoh K, Yoshinaga T, Nakashima M. Pharmacokinetics and biochemical efficacy after single and multiple oral administration of losartan, an orally active nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, in humans. Br-j-Clin-Pharmacol, 1993 35(3): 290-297.

61. Christ DD. Human plasma protein binding of the angiotensin II receptor antagonist losartan potassium (DuP 753/MK 954) and its pharmacologically active metabolite EXP3174. *J Clin Pharmacol*, 1995 35:515–520.
62. Munger MA, Furniss SM. Angiotensin II receptor blockers: Novel therapy for heart failure? *Pharmacotherapy*, 1996 16:59S–68S.
63. Dahlof B, Devereux R, Kjeldsen S, 14. et al. Cardiovascular morbidity and mortality in the losartan intervention or endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomized trial against atenolol. *Lancet*, 2002 359:995-1003.
64. Konstam MA, Neaton JD, Dickstein K, Drexler H, Komajda M, Martinez FA, Investigators Effects of high-dose versus low-dose losartan on clinical outcomes in patients with heart failure (HEAAL study): a randomised, double-blind trial. *Lancet*, 2009 374(9704):1840-8.
65. Lanças FM. Avanços recentes e tendências futura das técnicas de separação: uma visão pessoal. *Scientia Chromatographica*; Instituto Internacional de Cromatografia, 2008, 0 (0) 17-21.
66. Andrade SS, Kano EK, Brioschi TMLS, Koono EEM, Serra CHR, Porta V. Bioavailability study of two oral formulations of didanosine in healthy volunteers. *Arzneimittel-Forschung*, 2006 56, (5) 359-365.
67. Kano EK, Porta V, Koono EEM, Schramm SG, Serra CHR. Bioequivalence study of two oral formulations of cefadroxil in healthy volunteers. *Arzneimittel-Forschung*, 2008, 58, 42-47.
68. Porta V, Scharamm SG, Kano EK, Koono EEM, Armado YP, Fukuda K, Serra CHR. HPLC-UV determination of metformin in human plasma for application in pharmacokinetics and bioequivalence studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008 46, 143-147.

69. Porta V, Chang KH, Storpirtis S. Evaluation of the bioequivalence of capsules containing 150 mg of fluconazole. *International Journal of Pharmaceutics*, 2005, 288 (1) 81-86.
70. Pyrzynska K, Pobozy E. Etapa Analítica dos estudos de biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos. In: Storpirtis S, Gonçalves JE, Chiann C, Gai MN. *Biofarmacotécnica, Ciências Farmacêuticas*. Rio de Janeiro. Editora Guanabara, 2009, p. 144.
71. Porta V, Kano EK. Etapa Analítica dos estudos de biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos. In: Storpirtis S, Gonçalves JE, Chiann C, Gai MN. *Biofarmacotécnica, Ciências Farmacêuticas*. Rio de Janeiro. Editora Guanabara, 2009, p. 143-145.
72. Ciola R. Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho: *HPLC*, p. 1- São Paulo, Ed. Edgard Blüncher, 2003.
73. Harris DC. Espectrometria de massa. *Análise Quantitativa*, 6ª edição, Ed. LTC, 2005, p. 507-537.
74. Cass Q, Degani AL, Vieira PC. Cromatografia: Um breve Ensaio. *Química Nova na Escola*. São Carlos, 1998, 7, 21-25.
75. De Oliveira AC. Desenvolvimento e validação de um método analítico para quantificação de pentoxifilina em plasma humano. 2008; 81p. Dissertação (Graduação em Química Industrial) – Universidade São Francisco. Bragança Paulista.
76. Cass Q, Degani ALG. Desenvolvimento de métodos por HPLC – Fundamentos, Estratégias e Validação. *Serie apontamentos*, - São Carlos, Ed. UFSCAR, 2001, p.5.
77. Pereira A. *Química Nova*. vol.28. suppl.0 São Paulo Nov./Dec. 2005; Galeno Research Unit, Campinas – SP.

78. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Molecular mass spectrometry. Principles of instrumental analysis 5ª edição, ED. Brooks/Cole Thomson learning, 2001, p. 498-532.
79. Swaya AC. Análise da composição química de própolis brasileira por espectrometria de massa; Tese – Universidade Estadual de Campinas Instituto de Química; Campinas, SP; 2006.
80. Bancks JF. Protein analysis by packed capillary liquid chromatography with electrospray ionization and time-of-flight mass spectrometry detection. Journal of chromatography, October 1997, 786 (1) 24, 67-73.
81. Chiann C. Planejamento e Análise Estatística dos estudos de biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos. In: Storpirtis S, Gonçalves JE, Chiann C, Gai MN. Biofarmacotécnica, Ciências Farmacêuticas. Rio de Janeiro. Editora Guanabara, 2009, p.124-126.
82. Chellini PR. Boas Práticas Estatísticas em Estudos de Bioequivalência com Delineamento Crossover 2x2. 2007; 82p. Dissertação (Mestrado em Estatística) Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.
83. De Oliveira SE. Estudo de Bioequivalência entre duas formulações de Oxcarbazepina de 600 mg em Voluntários Sadios de ambos os sexos. 2006. 118p. Dissertação (Mestre em Clínica Médica) Universidade Estadual de Campinas. Campinas.
84. Freitas AAR. Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para detecção e quantificação da Amoxicilina em músculo, por LC-MS/MS. 2008. 82p. Dissertação (Mestre em Química). Instituto Superior Técnico – Universidade Técnica de Lisboa.

85. Gil ES, Batista Filho ROP. Validação de Processos. Controle físico-químico de qualidade de medicamentos, São Paulo, 2007, Ed. Pharmabooks, 2ª Edição, 41-52.
86. Pinto TJA, Ferrarini M, Gatti RM. Proposta de roteiro prático para a validação de métodos analíticos. Farmácia e Química, São Paulo, 2003, 36 (1) 26-36.
87. Chiann C. Planejamento e análise estatística dos estudos de biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos. In: Storpiritis S, Gonçalves JE, Chiann C, Gai MN. Biofarmacotécnica, Ciências Farmacêuticas. Rio de Janeiro. Editora Guanabara, 2009, p. 124-127.
88. Velazquez H. Thiazide diuretics. Renal Physiology 1987,10 (3-4):184-97.
89. Friedman PA. Biochemistry and pharmacology of diuretics. Seminars in Nephrology 1988, 8:198-212.
90. BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899 de 29/05/2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Publicado em DOU em 02/06/2003.
91. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH (CDER). Guidance for industry: Bioanalytical Method Validation, 2001.
92. Pereira M, Lunet N, Azevedo A, Barros H. Differences in prevalence, awareness, treatment and control of hypertension between developing and developed countries. J Hypertension. 2009;27(5):963-75.
93. Mion Jr. D, Kohlman Jr. O, Machado CA, Amodeo C, Gomes MAM, Prachedes JN, et al., organizadores. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. São Paulo: Sociedade Brasileira de Cardiologia/Sociedade Brasileira de Hipertensão/Sociedade Brasileira de Nefrologia; 2006.

94. Malta DC, Moura L, Souza FM, Rocha FM, Fernandes FM. Doenças crônicas não transmissíveis: mortalidade e fatores de risco no Brasil, 1990 a 2006. In: Saúde Brasil 2008 Ministério da Saúde, Brasília. p. 337-62, 2009.
95. Dickson TZ, Zangrobelny J, Lin CC, Ritter MA, Snavely D, Ramjit D, Shahinfar S, Lo MW. Pharmacokinetics, Safety, and Antihypertensive Efficacy of Losartan in Combination with Hydrochlorothiazide in Hypertensive Patients with Renal Impairment. J Clin Pharmacol, 2003 43:591-603.
96. Mccrea JB, Lo MW, Tomasco L, Lin CC, Hsieh JYK, Capra NL, Goldberg MR. Absence of pharmacokinetics interaction between losartan and hydrochlorothiazide. Journal of Clinical Pharmacology, 1995 35:1200-1206.
97. Townsend R, Haggert BS, Liss C, Edelman JM. Efficacy and tolerability of losartan versus enalapril alone or in combination with hydrochlorothiazide in patients with essential hypertension. Clinical Therapeutics, 1995 17 (5).
98. Alderman MH, Budner N, Cohen H, Lamport B, Ooi WL. Prevalence of drug resistant hypertension. Hypertension 1988,11 (II):II71-75.
99. Monane M, Bohn RL, Gurwitz JH, Glynn RJ, Levin R, Avorn J. The effects of initial drug choice and co-morbidity on antihypertensive therapy compliance. Results from a population-based study in the elderly. Am J Hypertens, 1997 10:697-704.
100. Siuzdak WMA. Mass Spectrometry for biotechnology. Academic Press,1996.
101. Silverstein RM, Bassler GC, Morril TC. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 5ª edição (Traduzido por Alencastro, RB), Guanabara Koogan, 1994.
102. Muck W. Quantitative analysis of pharmacokinetic study sample by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (lc-ms-ms). Pharmazie, 1999 54(9): 639-644.

103. Lagerwerf FM, Vandongen WD, Steen Voorden RJJM, Honing M, Jpnkman, JHG. Exploring the boundaries of bioanalytical quantitative lc-ms-ms. Pharma bio – research international B. V., science park, 9471 GP Zuidlaren, the Netherlands. Trends in analytical Chemistry, 2000, 19(7):418-427.
104. Niessen WM. State of art in liquid chromatography – mass spectrometry. Journa of Chromatography A, 1999, 856:179-197.
105. Choi BK, Hercules D, Gusev AI. Effect of liquid chromatography separation of complex matrices on liquid chromatography – tandem mass spectrometry signal supression. Journal of Chromatography A, 2001, 907:337-342.
106. Kolocouri F, Dotsikas Y, Apostolou C, Kousoulos C, Loukas YL. imultaneous determination of losartan, EXP-3174 and hydrochlorothiazide in plasma via fully automated 96-well-formatbased solid-phase extraction and liquid chromatography-negative electrospray tandem mass spectrometry. Anal Bioanal Chem 2007;387:593–601.
107. Koytchev R, Ozalp Y, Erenmemisoglu A, van der Meer MJ, Alpan RS. Combination of losartan and hydrochlorothiazide: In vivo bioequivalence. Arzneimittelforschung 2004;54:611–617
108. ABC Farma – Revista da Associação Brasileira do Comércio Farmacêutico, 2011, 237:104-106.

8. ANEXOS



ANEXO 1

PARECER COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP.

(0_19) 3788-8936

FAX (0_19) 3788-7187

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

cep@fcm.unicamp.br

CEP, 20/12/05.
(Grupo III)

PARECER PROJETO: Nº 754/2005
CAAE: 1264.0.000.146-05

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA DE DUAS FORMULAÇÕES DE LOSATAN COMPRIMIDO REVESTIDO DE 100 MG, ASSOCIADO A HIDROCLOROTIAZIDA 25 MG, EM VOLUNTÁRIOS SADIOS DE AMBOS OS SEXOS, SENDO A FORMULAÇÃO TESTE PRODUZIDA PELA EUROFARMA LABORATÓRIOS LTDA E A FORMULAÇÃO REFERÊNCIA (HYZAAR®) PELO LABORATÓRIO MERCK SHARP & DOHME FARMACÊUTICA LTDA” (SPH 53/05).

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Ronilson Agnaldo Moreno

INSTITUIÇÃO: Synchrophar

APRESENTAÇÃO AO CEP: 29/11/05

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 20/12/06

II - OBJETIVOS

Avaliar se a formulação de Losartan comprimido revestido de 100 mg associado a hidroclorotiazida 25 mg produzido pela Eurofarma atinge níveis plasmáticos equivalentes a formulação referência.

III - SUMÁRIO

O estudo será aberto, randomizado, cruzado, com 2 tratamentos, 2 seqüências, 2 períodos, nos quais 28 voluntários de ambos os sexos, recebem, em cada período, a formulação teste ou a formulação referência. As formulações serão administradas em dose única por via oral, seguidas de coletas de sangue de pelo menos 3 a 5 meias vidas. Os períodos de tratamento devem obedecer a um intervalo mínimo de 7 meias-vidas entre eles. O volume total de sangue coletado por voluntário será de 438 ml.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O estudo está bem estruturado. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é adequado e contém todas as informações para que o voluntário decida se quer ou não participar do estudo. Os critérios de inclusão e exclusão são adequados, bem como a forma de recrutamento e de ressarcimento dos voluntários.

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 XII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 20 de dezembro de 2005.


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

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“Estudo de bioequivalência de duas formulações de losartana comprimido revestido de 100 mg, associado a hidroclorotiazida 25 mg em voluntários sadios de ambos os sexos, sendo a formulação teste produzida pela Eurofarma Laboratórios Ltda e a formulação referência (Hyzaar[®]) pelo laboratório Merck Sharp & Dohme Farmacêutica Ltda”

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa. Sua participação é importante, porém, você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO

O objetivo da pesquisa é verificar se 1 comprimido revestido de losartana (100 mg) + hidroclorotiazida (25 mg) produzido pela Eurofarma Laboratórios Ltda - *Formulação Teste* - atinge níveis do medicamento no sangue equivalente a 1 comprimido revestido de (Hyzaar[®]) de losartan (100 mg) + hidroclorotiazida (25 mg) produzido pela Merck Sharp & Dohme Farmacêutica Ltda - *Formulação Referência*. Você receberá um comprimido revestido de cada uma das duas medicações, cada uma em um período de internação diferente. A ordem que você tomará cada medicação obedecerá a um sorteio.

Este medicamento é indicado para tratamento de edema, controle da hipertensão arterial, auxiliar no tratamento do diabetes e osteoporose.

PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS E RESPONSABILIDADES

Antes de sua participação no estudo será avaliada a sua condição de saúde. Uma enfermeira fará seu histórico clínico (se você teve ou tem alguma doença e se você faz uso de algum medicamento, etc), medirá o seu pulso, sua temperatura, sua pressão arterial. Também será feito um exame do coração (eletrocardiograma). Um médico lhe fará um exame físico. Durante a visita serão coletadas amostras de sangue, urina e fezes para exames laboratoriais. Os exames laboratoriais incluem exame de sangue completo como hemograma completo, bioquímica sangüínea (glicose no sangue, proteínas totais, albumina, transaminases oxalacética e pirúvica, gamaglutamil transferase, creatinina, uréia, ácido úrico, colesterol e triglicerídeos); exame sumário de urina (Urina I). Exames para a hepatite B e C e para AIDS (HIV1 e HIV2), no sangue, e exame de fezes (protoparasitológico), serão feitos somente no pré-estudo. O teste de gravidez (β HCG) será feito no pré-estudo e na noite das internações será realizado o teste de HCG na urina.

Durante o estudo, você será internado duas vezes por aproximadamente 26 horas cada período, com intervalo mínimo de 7 dias.

Em cada período de internação:

- a) Você deverá permanecer em jejum por pelo menos 10 horas antes da medicação;
- b) Será retirada uma amostra de 20 mL antes da administração da medicação;
- c) Será administrado um 1 comprimido revestido de losartana (100 mg) + hidroclorotiazida (25 mg) acompanhado de 200 mL de água sem gás;
- d) Serão coletadas 23 amostras de sangue de 8 mL cada, através de agulha introduzida em veia superficial para a dosagem do medicamento em tempos pré-determinados para o estudo;
- e) Em intervalos regulares, será verificada sua pressão, pulso e temperatura.

Serão também servidas refeições padronizadas (jantar na noite da internação, almoço, lanche da tarde, jantar e ceia no dia da administração da medicação) e bebidas em horários preestabelecidos.

Após a coleta de 14 horas você receberá alta do hospital.

Um total de 438 mL de sangue serão colhidos durante todo o estudo. A duração total de sua participação na pesquisa está estimada em 30 dias, a contar da primeira internação, após o processo de seleção.

RESPONSABILIDADES DO VOLUNTÁRIO

É condição indispensável, para participação no ensaio clínico, que você esteja em boas condições de saúde e, portanto, não esteja no momento sob tratamento médico ou fazendo uso de quaisquer drogas ou medicações. Algumas regras deverão ser seguidas para sua participação no estudo: a) não pode ser dependente de drogas ou álcool e caso o investigador tenha alguma suspeita, poderá solicitar exame de urina para detecção do uso de drogas; b) não pode ter doado sangue ou plasma dentro dos três meses que antecedem o estudo ou ter doado 1500 mL (um litro e meio) no período de um ano antecedendo ao estudo; c) não pode tomar bebidas contendo cafeína e xantinas (café, chá, coca-cola, etc) nas 12 horas que antecedem as internações até a última coleta.

É ainda de sua responsabilidade em relação a sua participação no ensaio clínico: a) comparecer às internações na data e horários informados; b) retornar a Synchrophar nas datas e horários combinados; c) tomar toda a medicação prevista; d) ingerir toda a alimentação e líquidos que tenham sido previstos; e) retornar à unidade na data e horário combinados para a realização da consulta e exames de alta, independentemente de haver sido interrompida sua participação no estudo ou de sua desistência.

Aos voluntários do sexo feminino é condição indispensável para participação no ensaio clínico que não estejam grávidas, isso será comprovado por exame de gravidez no sangue (β HCG). Sua participação não será permitida caso você

engravide após a realização dos exames clínico-laboratoriais, se você estiver amamentando ou se estiver pretendendo engravidar durante o prazo de duração do estudo. Caso, mesmo tendo considerado estas precauções, vier a suspeitar que engravidou durante a participação no estudo, deverá comunicar imediatamente o fato à equipe e deverá interromper sua participação sem prejuízo dos seus direitos.

RESPONSABILIDADES DA SYNCHROPHAR

É de responsabilidade do investigador garantir que os voluntários envolvidos recebam um tratamento definitivo para qualquer evento adverso, se necessário. Os eventos deverão ser seguidos clinicamente e por análises laboratoriais (quando indicados) até que os parâmetros voltem ao normal. Estas atividades podem permanecer mesmo após o estudo ter sido completado.

A equipe da Unidade Clínica deverá monitorar a segurança dos voluntários desde a ocorrência de um evento adverso até a recuperação satisfatória. Em casos de emergência a unidade tem local próprio, equipado com desfibrilador, monitor, oxímetro, respirador, material para pequena cirurgia e com medicação de urgência para qualquer eventualidade. Além disso, conta em anexo com uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI).

POSSÍVEIS RISCOS E DESCONFORTOS

A administração oral de losartana + hidroclorotiazida pode causar efeitos colaterais como: tontura, queda excessiva da pressão arterial quando ao se levantar, erupção na pele, aumento da concentração de potássio no sangue, diminuição da concentração de sódio no sangue, diminuição da concentração de magnésio no sangue, inflamação do pâncreas, fraqueza muscular, fraqueza e eventualmente paralisia. Aumento de glicose no sangue pode ocorrer em alguns casos, principalmente associada a infecções do trato urinário. Aumento de ácido úrico no sangue é comum e geralmente é assintomático, mas pode aparecer como um ataque

agudo de gota. Outro sintoma associado ao medicamento é a impotência, principalmente em pacientes diabéticos.

Em casos de superdosagem, podem ocorrer distúrbios do metabolismo, podendo causar sonolência e até coma. Raramente é observado caso de anemia e outras reações de hipersensibilidade.

Além dos efeitos citados, a administração de qualquer medicamento pode causar reações imprevisíveis.

A retirada de sangue é um procedimento seguro e pode causar um leve desconforto, e ocasionalmente, uma mancha roxa pequena no local da picada sem maiores problemas.

BENEFÍCIOS OU COMPENSAÇÕES

A participação neste estudo, não tem o objetivo de submetê-lo a um tratamento terapêutico. Conseqüentemente, não se espera que a participação no estudo traga qualquer benefício em função do tratamento.

INTERCORRÊNCIAS (efeitos indesejáveis)

Se você sofrer algum malefício em decorrência direta de sua participação no estudo, você receberá tratamento, sem qualquer custo. Não haverá no entanto qualquer compensação de ordem financeira em função do ocorrido, a não ser que a condição faça jus da indenização prevista no Seguro de Vida em Grupo mencionado abaixo. Contudo, ao assinar este termo, você não está renunciando qualquer direito legal que você possui.

Durante o período de 180 dias a partir da data da assinatura deste termo, o voluntário estará assegurado (Seguro de Vida em Grupo) pela empresa Executivos Seguros (Sul América Aetna)

RESSARCIMENTO

De acordo com valores previamente estabelecidos R\$ 440,00 (quatrocentos e quarenta reais), os voluntários serão ressarcidos das despesas e tempo despendido na realização do estudo clínico após a consulta de alta. Caso desista, ou seja, dispensado antes do estudo ser finalizado o voluntário receberá proporcionalmente ao tempo despendido, no final do estudo. A desistência ou dispensa antes do comparecimento para a primeira internação não dá direito a ressarcimento.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Sua participação é voluntária e você tem a liberdade de desistir ou interromper a participação neste estudo no momento que desejar. Neste caso, você deve informar imediatamente sua decisão ao pesquisador ou a um membro de sua equipe, sem necessidade de qualquer explicação e sem que isto venha interferir no seu atendimento médico.

Independente de seu desejo e consentimento, sua participação no ensaio clínico poderá ser interrompida, em função: a) da ocorrência de eventos adversos; b) da ocorrência de qualquer doença que, a critério médico, prejudique a continuação de sua participação no estudo; c) do não cumprimento das normas estabelecidas; d) de qualquer outro motivo que, a critério médico, seja do interesse de seu próprio bem estar ou dos demais participantes; e) da suspensão do Estudo como um todo.

A Synchrophar o manterá informado, em tempo oportuno, sempre que houver alguma informação adicional que possa influenciar seu desejo de continuar participando no estudo e prestará qualquer tipo de esclarecimento em relação ao progresso da pesquisa, conforme sua solicitação.

A interrupção não causará prejuízo ao seu atendimento, cuidado e tratamento pela equipe da Synchrophar.

DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES QUANTO A PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

Os registros que possam identificar sua identidade serão mantidos em sigilo. A Synchrophar não identificará o voluntário por ocasião da publicação dos resultados obtidos.

Contudo, o(s) monitor(es) do Estudo, auditor(es), membros do Comitê de Ética e Pesquisa Clínica, ou autoridades dos órgãos governamentais envolvidos na fiscalização e acompanhamento do estudo terão direito de ter acesso aos registros originais de dados clínicos de sua pessoa, coletados durante a pesquisa, na extensão em que for permitido pela Lei e regulamentações aplicáveis, com o propósito de verificar os procedimentos e dados do ensaio, sem no entanto violar a condição de que tais informações são confidenciais. Ao assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, você está também autorizando tal acesso, mesmo se você se retirar do Estudo.

CONTATOS E PERGUNTAS

Caso surja alguma intercorrência você deverá procurar a Synchrophar (Fone XXXX-XXXX) e pedir que façam contato com os médicos responsáveis pelo ensaio clínico ou então entrar em contato diretamente com os médicos nos telefones indicados no final deste *Termo de Consentimento*.

Poderá contatar o Dr. Ney Carter do Carmo Borges para receber informações adicionais, relacionadas à pesquisa ou quanto aos seus direitos como voluntário, e também secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp fone 3788-8936 para apresentar recursos ou reclamações em relação ao ensaio clínico.

Após uma reunião junto com a coordenadora do estudo, e após ler este documento, você obteve todas as informações e esclarecimentos necessários para poder decidir conscientemente sobre a participação no referido ensaio clínico.

Se você concorda com as condições do estudo, leia e assine o documento abaixo.

Eu, _____, _____ anos, RG _____, declaro que li cuidadosamente todo este documento denominado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que tive oportunidade de fazer

perguntas sobre o seu conteúdo e também sobre o Estudo. Recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas e reafirmo estar livre e espontaneamente decidindo participar do Estudo, sob responsabilidade do Dr. Ney Carter do Carmo Borges, do Dr. Ronilson A. Moreno e das enfermeiras Angélica de Toledo e Lucelena Vieira Dezorde da Synchrophar Assessoria e Desenvolvimento de Projetos Clínicos S/S Ltda.

Ao assinar este Termo de Consentimento eu também estou certificando que toda a informação que eu prestei, incluindo minha história médica, é verdadeira e correta até onde é de meu conhecimento, e declaro estar recebendo uma cópia assinada deste documento.

Ao assinar este Termo de Consentimento estou autorizando o acesso às minhas informações de saúde aos membros da equipe e a monitores, auditores, membros do Comitê de Ética em Pesquisa e membros de órgãos regulamentares envolvidos, nas condições descritas acima.

Ao assinar este Termo de Consentimento eu não renunciei qualquer direito legal que eu venha a ter ao participar deste Estudo.

Nome do Voluntário	Data	Assinatura
--------------------	------	------------

Enfª Angélica de Toledo COREN: 036205

Responsável pela obtenção do termo de consentimento	Data	Assinatura
---	------	------------

Enfª Lucelena V. Dezorde COREN: 0107104

Responsável pela obtenção do termo de consentimento	Data	Assinatura
---	------	------------

Testemunha	Data	Assinatura
------------	------	------------

(Necessário somente se o voluntário não souber ler)

CONTATOS:

Dr. Ney Carter do Carmo Borges (XX) XXXX-XXXX	Dr. Ronilson Agnaldo Moreno (XX) XXXX-XXXX
--	---

ANEXO 3

ELETROCARDIOGRAMAS – NORMAL E ANORMAL

Estudo: Leontam + hidroclorotiazida Número do voluntário: 04
SPH: 53105 Identificação do voluntário: 58200373 m
Synchrophar Assessoria e Desenvolvimento de Projetos Clínicos

Eletrocardiograma – Pré Estudo

Relatório - Pré Estudo

Data do ECG: 16/11/05

Ritmo Cardíaco: sinus

HR: 64 bpm

SAP: 748 *

PR intervalo: 0,13 seg

SAQRS: -7 *

QRS duração: 0,12 seg

SAT: +49 *

QT: 0,38 seg

Conclusão: ☒ Normal

☐ Anormal, clinicamente não significativo

☐ Anormal, clinicamente significativo

Especificações das anormalidades:

Ney Carter do C. Borges - CRM 50535

Médico responsável

Assinatura

Data

SYNCHROPHAR ASSESSORIA E DESENVOLVIMENTO DE PESQUISA CLINICA Ltda

Nome: [REDACTED]

Sexo: Masc

Data: 16-11-05 16:10

Código: 1246

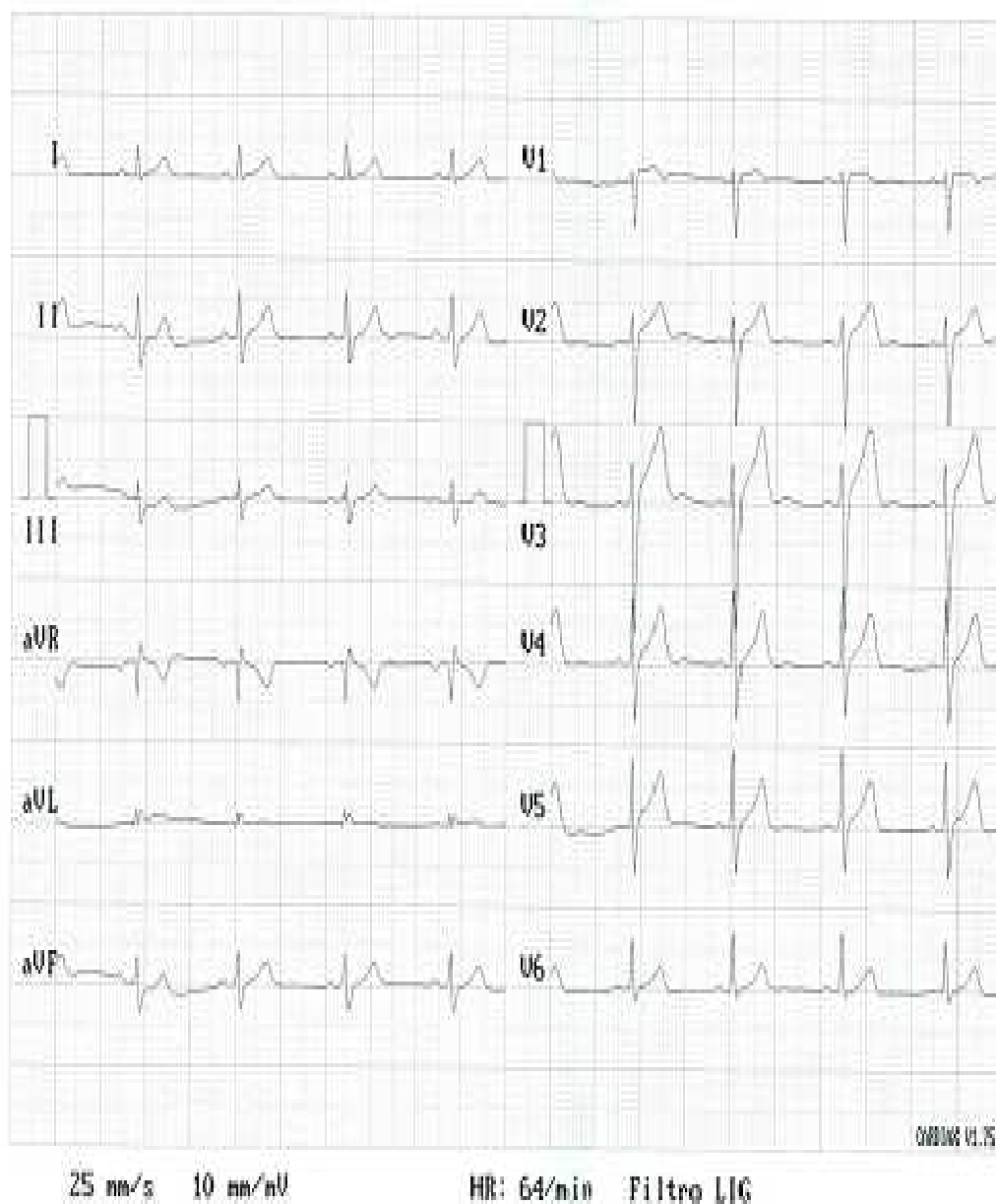
Altura: 163cm

Méd.: MEY CARTER DO C. BORGES

Idade: 42 anos

Peso: 59 kg

Obs.:



SYNCHROPHAR ASSESSORIA E DESENVOLVIMENTO DE PESQUISA CLINICA Ltda

Nome: [REDACTED]

Sexo: Masc

Data: 16-11-05 16:10

Código: 1246

Altura: 163cm

Méd.: NEY CARTER DO C. BORGES

Idade: 42anos

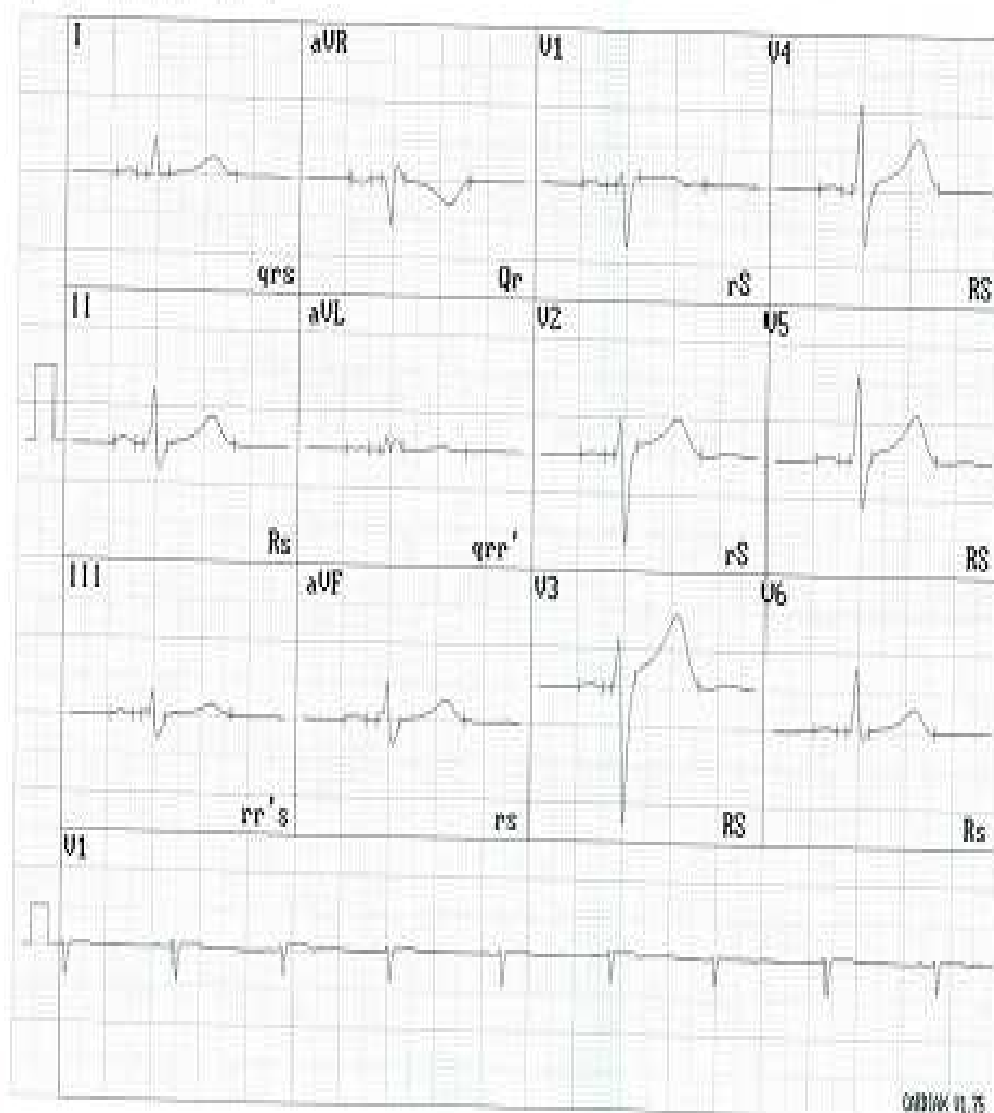
Peso: 59 kg

Obs.:

HR: 64 QRS: 114 ms P ax: 49

PR: 96 ms QT: 380 ms QRS ax: -1

PP: 136 ms QTc: 374 ms T ax: 49



Estudo: Levetiracetam + Hidroclorotiazida Número do voluntário: 01
SPH: 53105 Identificação do voluntário: 28/21279m
Synchrophar Assessoria e Desenvolvimento de Projetos Clínicos

Eletrocardiograma – Pré Estudo

Relatório - Pré Estudo

Data do ECG: 16/11/05

Ritmo Cardíaco: Bradicardia

HR: 59 bpm

SAP: -33 *

PR intervalo: 0.14 seg

SAQRS: +76 *

QRS duração: 0.09 seg

SAT: +50 *

QT: 0.38 seg

- Conclusão: ☐ Normal
☒ Anormal, clinicamente não significativo
☐ Anormal, clinicamente significativo

Especificações das anormalidades:

Bradicardia sinus

Ney Carter do C. Borges - CRM 50535

Médico responsável

Assinatura

17/11/05

Data

SYNCHROPHAR ASSESSORIA E DESENVOLVIMENTO DE PESQUISA CLINICA Ltda

Nome: [REDACTED]

Sexo: Masc

Data: 16-11-05 13:04

Código: 390

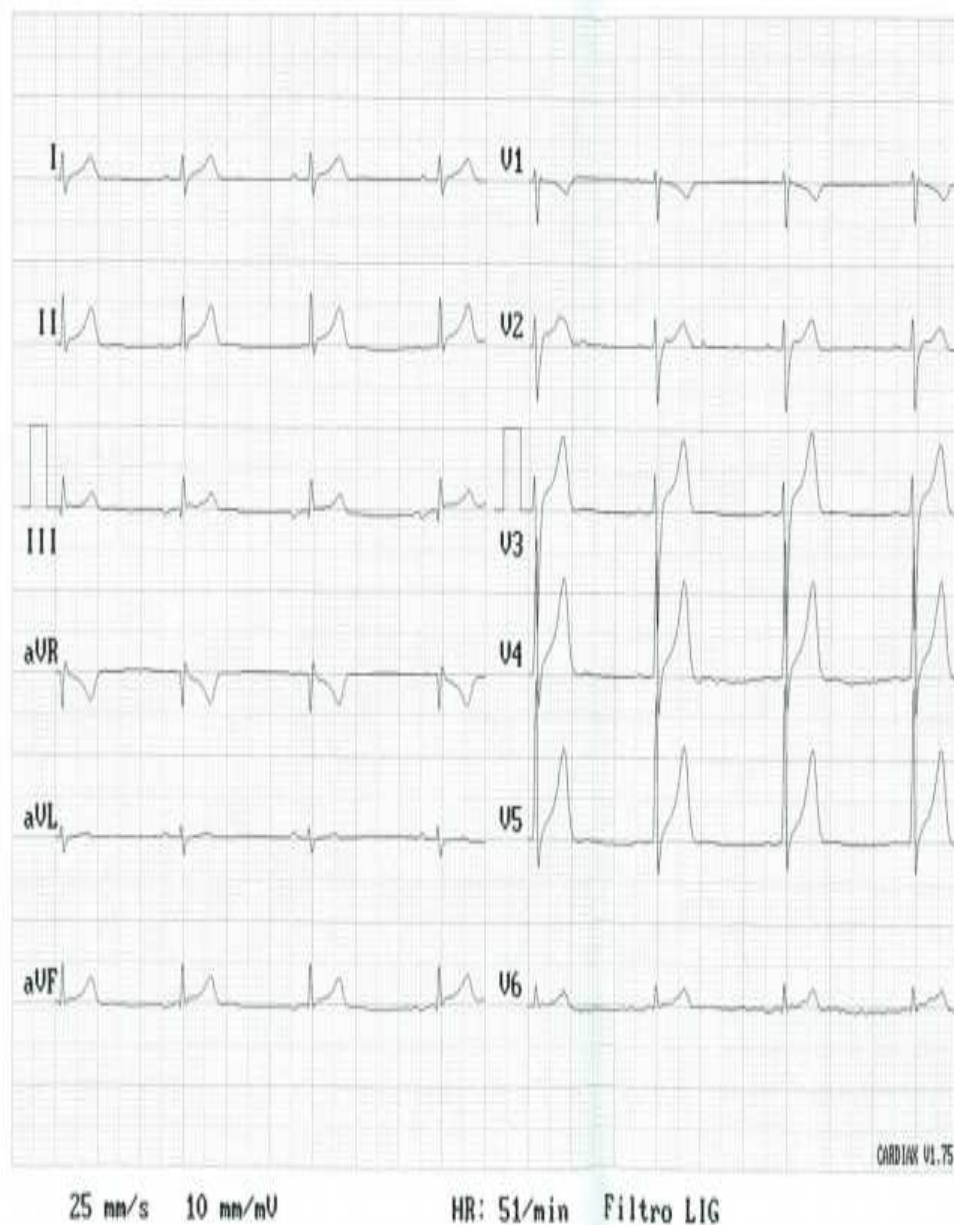
Altura: 182cm

Méd.: NEY CARTER DO C. BORGES

Idade: 26 anos

Peso: 70 kg

Obs.:



SYNCHROPHAR ASSESSORIA E DESENVOLVIMENTO DE PESQUISA CLINICA Ltda

Nome: [REDACTED]

Sexo: Masc

Data: 16-11-05 13:04

Código: 390

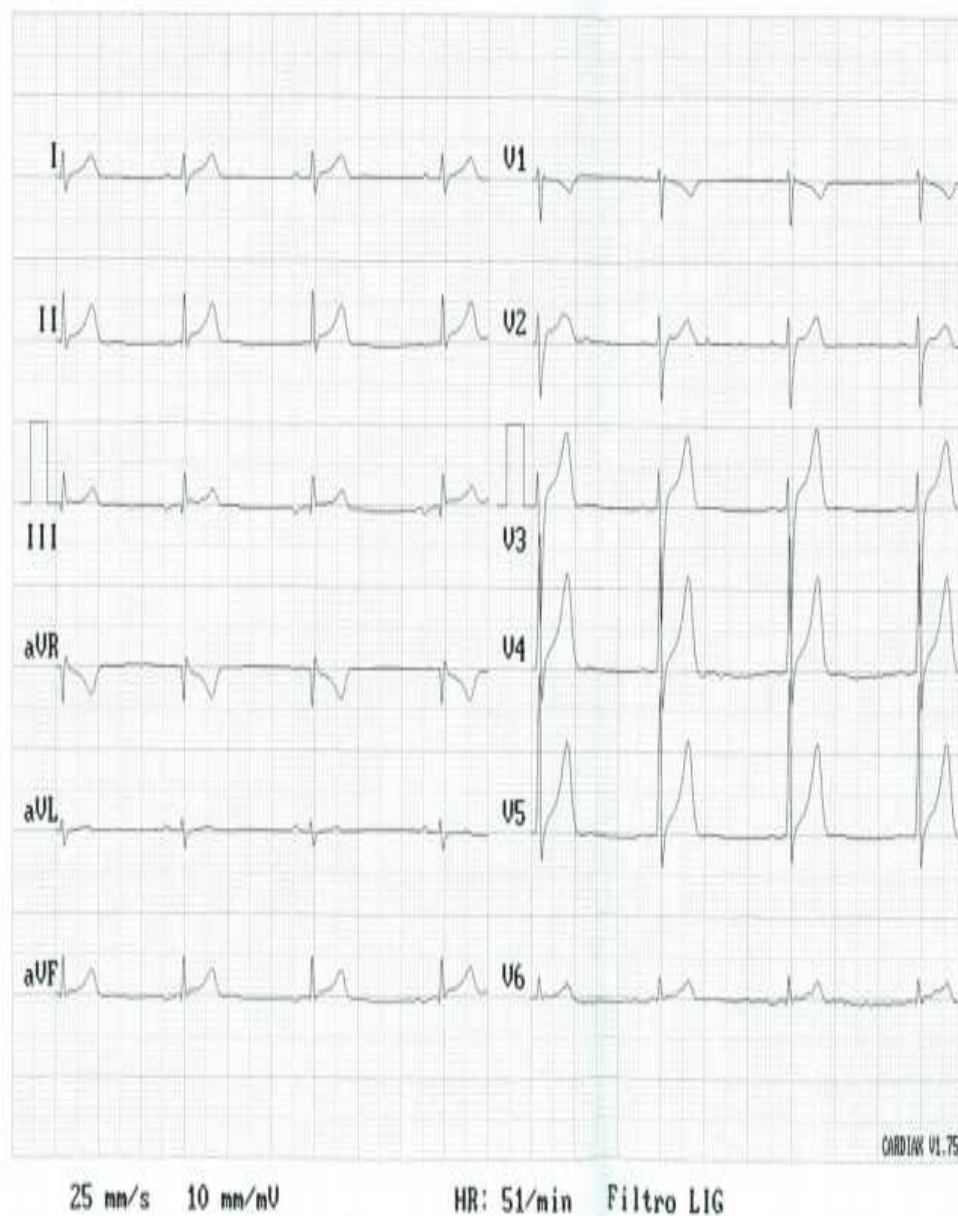
Altura: 182cm

Méd.: NEY CARTER DO C. BORGES

Idade: 26 anos

Peso: 70 kg

Obs.:



ANEXO 4

ARTIGO CIENTÍFICO

Clinical and Experimental Hypertension, 31:415–427, 2009
Copyright © Informa Healthcare USA, Inc.
ISSN: 1064-1963 print / 1525-6006 online
DOI: 10.1080/10641960802668714

informa
healthcare

Simultaneous Determination of Losartan and Hydrochlorothiazide in Human Plasma by LC/MS/MS with Electrospray Ionization and Its Application to Pharmacokinetics

MYRIAM C. SALVADORI,¹ ROBERTO F. MOREIRA,²
BRUNO C. BORGES,³ MARISTELA H. ANDRAUS,¹
CRISTINA P. AZEVEDO,¹ RONILSON A. MORENO,^{4,5} AND
NEY C. BORGES^{2,4}

¹ChromAnalysis - MCM Análises Laboratoriais SA, São Paulo-SP, Brazil

²Department of Clinical Medicine, UNICAMP, Campinas, Brazil

³College of Medicine, Pontificia Universidade Católica, Sorocaba, SP, Brazil

⁴Synchrophar - Assessoria e Desenvolvimento de Projetos Clínicos Ltda, Campinas – SP, Brazil

⁵Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas, Brazil

A method based on a simple liquid-liquid extraction (LLE) followed by high-performance liquid chromatography with negative ion electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS) detection was developed for the simultaneous determination of losartan (LOS) and hydrochlorothiazide (HCTZ) in human plasma, using valsartan (VAL) and chlorthalidone (CHTD) as an internal standard, respectively. The acquisition was performed in multiple reactions monitoring (MRM) and the limit of quantification was 4 ng/mL for both LOS and HCTZ. The method was linear in the studied range (4–800 ng/mL for LOS and 4–500 ng/mL for HCTZ). The intra-assay precisions ranged from 2.6–11.9% for LOS and 1.4–8.2% for HCTZ, while the inter-assay precisions ranged from 1.0–8.0% for LOS and 2.5–7.7% for HCTZ. The intra-assay accuracies ranged from 91.3 to 107.6% for LOS and 91.5 to 105.8% for HCTZ, while the inter-assay accuracies ranged from 99.9 to 106.4% for LOS and 97.4 to 101.4% for HCTZ. The analytical method was applied to a bioequivalence study, in which 28 healthy adult volunteers (14 men) received single oral doses (100 mg LOS + 25 mg HCTZ) of reference and test formulations, in an open, two-period, balanced randomized, crossover protocol. Based on the 90% confidence interval of the individual ratios for C_{max} and AUC_{0-inf} , it was concluded that the test formulation is bioequivalent to the reference Hyzaar® formulation with respect to the rate and extent of absorption of both LOS and HCTZ.

Keywords losartan, hydrochlorothiazide, pharmacokinetics, LC-MS/MS, bioequivalence

Received May 21, 2008; revised June 19, 2008; accepted July 7, 2008.

Address correspondence to Ney C. Borges, 24 Cesar Bierrenbach Street, Campinas, SP, Brazil, 13015025. E-mail: medney@synchrophar.com.

Introduction

Losartan (LOS), chemically described as 2-butyl-4-chloro-1-[p-(o-1Htetrazol-5-ylphenyl)benzyl] imidazole-5-methanol, is an effective, synthetic, orally active, nonpeptide angiotensin II receptor antagonist (1). Losartan and its principal active metabolite block the vasoconstrictor and aldosterone-secreting effects of angiotensin II by selectively blocking the binding of angiotensin II to the AT1 receptor (2,3). This molecule undergoes first-pass metabolism by cytochrome P450 enzymes. Its biotransformation results, in part, to an active carboxylic acid metabolite that is 10–40 times more potent than losartan. This acid metabolite is responsible for most of the angiotensin II receptor antagonism that follows losartan treatment (4).

Following oral administration, losartan is well absorbed with a reported systemic bioavailability of 32.6% with a 50 mg tablet (geometric mean) (5). The mean peak plasma concentrations of losartan and its metabolite are reached in 1 h and in 3–4 h, respectively (5–7). Both losartan and its metabolite are highly bound to plasma proteins: 98.6–98.8% and 99.7%, respectively, in the concentration range of 0.5–5 $\mu\text{g/mL}$ (8,9). Upon oral administration, about 4% of the dose is excreted unchanged in the urine and about 6% is excreted in urine as active metabolite. Biliary excretion contributes to the elimination of losartan and its metabolites.

Hydrochlorothiazide (HCTZ) is a thiazide diuretic and an anti-hypertensive that interferes with the renal tubular mechanism of electrolyte reabsorption. The primary action of the thiazides is to increase diuresis by blocking the reabsorption of sodium and chloride in the distal tubule and therefore an accompanying amount of water. In the early distal tubule, the thiazides compete at the sodium chloride co-transporter, which actively pumps sodium and chloride, against its concentration gradient, out of the tubule. Following oral administration, hydrochlorothiazide is rapidly absorbed at 60% to 80% of the dose (10). The elimination half-life is 10 to 12 h, with a range of 2 to 15 h. The primary route of elimination is renal excretion as unchanged drug, with 50% to 70% of an oral dose excreted within 24 h (10,11). To achieve the target of low blood pressure, it is now common practice to apply a combination of anti-hypertensive agents, particularly two drugs with different mechanisms of action (12,13). Nowadays, drug administration is tending to become simpler (in terms of the number of administered formulations), and therefore two or more drugs are often included in the same tablet. Hyzaar® 100–25 combines the action of both drugs, containing 100 mg of losartan potassium and 25 mg of hydrochlorothiazide.

The combination liquid chromatography/mass spectrometry is currently accepted as being the method of choice for the determination of organic molecules from complex biological matrices (14–17). The high selectivity and sensitivity of LC/MS/MS has allowed the development of high throughput methods, which are an essential in pharmacokinetics studies. Analytical methods consisting of separate quantitative determination of LOS and HCTZ using UV (18–20), fluorescence (21,22), or electrochemical detection (23) are not convenient for clinical studies. A method was published describing the simultaneous quantification of LOS and HCTZ in human plasma and using a fully automated solid-phase extraction (SPE) protocol to isolate LOS, its major circulating metabolite EXP-3174, HCTZ, and furosemide (internal standard [IS]) from human plasma (24). The authors described a very low limit of quantification for both LOS (1.0 ng/mL) and HCTZ (0.5 ng/mL).

The objective of this study was to develop a simple, rapid, sensitive, specific and robust method combining a simple liquid-liquid extraction (LLE) protocol with high-performance liquid chromatography (HPLC) and negative electrospray tandem mass

spectrometry (ESI/MS/MS) for the simultaneous quantification of these drugs in hundreds of plasma samples obtained from a bioequivalence study of a test LOS-HCTZ formulation (100 mg losartan associated with 25 mg hydrochlorothiazide) against the reference Hyzaar® (Merck Sharp & Dohme Pharmaceuticals Ltd., Campinas, SP, Brazil).

Experimental

Chemicals and Reagents

Losartan-LOS (lot number 05044244) and hydrochlorothiazide-HCTZ (lot number 1003) were provided by Biosintetica Farmacêutica Ltda (São Paulo, SP, Brazil) and INCQS/Fiocruz (Rio de Janeiro, RJ, Brazil), respectively, while the internal standards valsartan-VAL (lot number CO336) and chlorthalidone-CHTD (lot number 7E38F) were provided by Novartis International Pharmaceutical Ltd. (Ringaskiddy Co., Cork, Ireland). Hexane, ethyl ether, methanol, and acetonitrile (HPLC-grade) and 96% formic acid (analytical-grade) were purchased from Tedia Brasil (Rio de Janeiro, RJ, Brazil), while ethylacetate (HPLC-grade) and acetic acid (glacial, analytical-grade) from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ). Ultra-pure water was obtained from a Gehaka Master system (São Paulo, SP, Brazil). Human blank plasma samples for the development, validation, and control of the method were obtained from healthy, drug-free volunteer blood donors at the Banco de Sangue do Hospital do Rim (São Paulo, Brazil). For the bioequivalence assessment of losartan and hydrochlorothiazide formulations, plasma samples were collected from the volunteers enrolled in the study.

Instrumentation

An LC/MS/MS system consisting of a liquid chromatograph (model 1100, Agilent, Santa Clara, CA) coupled to an electrospray tandem triple quadrupole mass spectrometer (model API 2000, AB/MDS-Sciex, Concord, ON, Canada) was used for detection and mass analysis operating with Analyst 1.4.1 software.

Calibration Standards and Quality Control Samples

Stock solutions of each compound (LOS and HCTZ) were initially prepared by dissolving each of the accurately weighed reference compounds in methanol (0.1 mg/mL). Working solutions were prepared by diluting these solutions with methanol/water 50/50 (v/v), as appropriate, to obtain final working solutions of 40.0, 20.0, 5.0, 2.5, 0.75, 0.4, and 0.2 µg/mL for LOS and 25.0, 12.5, 5.0, 2.5, 0.75, 0.4, and 0.2 µg/mL for HCTZ. As internal standard, VAL and CHTD were used for LOS and HCTZ, respectively. Stock solutions of VAL and CHTD (1 mg/mL) were also prepared in methanol and were subsequently diluted with distilled water to a final concentration of 156.25 and 125 ng/mL of VAL and CHTD, respectively. Calibration curves were prepared by spiking blank plasma with the working solutions to provide calibration samples at concentrations of 800, 400, 100, 50, 15, 8, and 4 ng/mL for LOS and 500, 250, 100, 50, 15, 8, and 4 ng/mL for HCTZ. In order to prepare quality control (QC) samples, dilutions of stock solutions were made with methanol/water 50/50 to obtain working solutions of 65.0, 40.0, 1.2, and 0.4 ng/µL for LOS and 40.0, 20.0, 1.2 and 0.4 ng/µL for HCTZ. Quality control (QC) plasma samples were prepared by spiking blank plasma with the above working solutions to provide four different concentrations, namely, at the limit of quantification (QC-LQ: 4 ng/mL for both,

LOS and HCTZ), at low concentration (QCL: 12 ng/mL for both, LOS and HCTZ), at medium concentration (QCM: 400 and 200 ng/mL for LOS and HCTZ, respectively), and at high concentration (QCH: 650 and 400 ng/mL for LOS and HCTZ, respectively).

Assay Procedure

The frozen plasma samples were thawed at room temperature and aliquots of 0.2 mL of each calibrator, QC, or volunteer sample were extracted with 4 mL of ethylacetate - hexane - ethyl ether (70:15:15, v/v), after the addition of 0.025 mL of internal standard solution (VAL+CHTD, 156.25 and 125 ng/mL, respectively) and 0.025 mL of 1.3% formic acid. After agitation at 200 rpm/5 min and centrifugation (3500 rpm/2 min), the aqueous phase was frozen in a dry ice bath (10 min) and the organic phase was transferred to a clean tube for evaporation at 50°C under nitrogen flow. The residues were taken with 0.2 mL of mobile phase (acetonitrile – 0.05% acetic acid, 1.4:1 v/v), vortex-mixed for 10 seconds and taken to the auto sampler.

Chromatographic Conditions

An aliquot of 0.03 mL was injected into an Agilent Zorbax Eclipse® C8 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA), 150 × 4.6 mm, 5 µm i.d. analytical column, coupled to a Phenomenex Gemini® C18 (Phenomex Inc., Torrance, CA), 4 × 3 mm, 5 µm i.d. guard-column, operated at 25°C and split 1:2. The auto sampler rack temperature was kept at –10°C. The isocratic elution mobile phase was composed of acetonitrile – 0.05% acetic acid (70:30, v/v). A flow rate of 0.6 mL/min was used for sample analysis and the total runtime was set to 4.5 min.

Mass Spectrometer Conditions

The mass spectrometer equipped with electrospray ionization (ESI) source was operated in the negative ion mode (ES⁻) and multiple reactions monitoring (MRM) mode. The tuning parameters were optimized for LOS, HCTZ, valsartan (VAL) and chlorothalidone (CHTD) by infusing a 1 ng/µL standard solution of each compound into the stainless steel sample capillary of the electrospray source at a constant flow-rate of 10 µL/min, using a syringe pump. The electrospray capillary potential was set to 4500 eV and nitrogen was used as drying gas for solvent evaporation. The ESI source and drying gas temperatures were kept at 100°C and 450°C, respectively. The dwell time was 80 msec for all drugs. The collision energies were –24, –32, –4, and –24 eV for LOS, HCTZ, VAL, and CHTD, respectively. Based on the full scan MS/MS spectrum of each drug, the most abundant ions were selected and the mass spectrometer was set to monitor the transitions of the precursors to the product ions, as follows: m/z 421.0 → 127.0 for LOS, m/z 434.2 → 179.1 for VAL, m/z 295.9 → 205.1 for HCTZ, and m/z 337.0 → 145.9 for CHTD. Data acquisition and analysis were performed using the Analyst 1.4.1 software.

Method Validation

For method validation, the tests were performed on replicates of QC samples in three different assays. The analytical runs included a blank plasma, a blank plasma spiked with internal standard solution, blank plasma samples for the specificity test, seven concentration levels of calibration samples (n = 2) for the calibration curve, QC samples (QC-LQ,

QCL, QCM, and QCH) in replicates ($n = 7$) for the determination of precision, accuracy, and recovery, and QCL and QCH ($n = 3$) for testing the stability of both LOS and HCTZ.

For the specificity test, six blank human plasma samples (including one lipemic and one with hemolysis) were obtained as described. Each blank sample was tested for interference using the proposed method.

The limit of quantification (LOQ) in plasma was defined as the lowest concentration of the analyte in plasma measured with acceptable accuracy and precision (% bias and $RSD \leq 20\%$). The linearity of the calibration curves was determined by the least-squares $1/x^2$ (LOS) and $1/x$ (HCTZ) weighted linear regression approach. The recovery (extraction efficiency) of LOS and HCTZ from plasma after the extraction procedure was determined by comparing the responses obtained from extracted QCL, QCM, and QCH samples ($n = 5$) with extracted blank plasma samples to which the analytes were added after extraction (corresponding to 100% of recovery). The results were expressed as recovery (%) = (area of extracted analyte/area of nonextracted analyte) $\times 100$.

The intra- and inter-assay precisions were determined as the % CV and the intra- and inter-assay accuracies were expressed as percentages of the nominal concentration, i.e., as accuracy (%) = (found concentration/nominal concentration) $\times 100$. Intra-assay precision and accuracy were calculated using the average of the five measured concentrations in each validation group obtained in the same assay; inter-assay precision and accuracy were calculated using the average of all replicates obtained in three different assays for each validation group. The precision was also determined for 2 and 4 times the dilution of samples with blank plasma, in order to contemplate those cases where the volunteer sample exceeds the concentration of the highest calibrator. The following criteria were used to assess the suitability of precision and accuracy: the % CV determined at each concentration level should not exceed 15%, except at the limit of quantification where deviations should not exceed 20%; the accuracy should be within 80–120%.

The stability of LOS and HCTZ in plasma was assessed by analyzing replicates ($n = 3$) of QCL and QCH exposed to different time and temperature conditions. The results were compared with those for freshly prepared QC samples, and the percentage of concentration deviation was calculated. The protocol for the stability study included: a) freeze-thaw stability, which samples were stored at -20°C followed by thawing at room temperature and analyzed after the third cycle on consecutive days; b) exposure of the samples at the bench to room temperature ($\sim 23^\circ\text{C}$) for 6:30 h; c) exposure of the extracted samples to the auto sampler rack temperature (-10°C) for 2 days; d) stability of LOS and HCTZ standard solutions, kept at rack temperature (-10°C) for 21 days. The long-term stability was assessed after storage of the test samples at -20°C for 99 days.

Pharmacokinetics and Statistical Analysis

The validated method was applied to evaluate the bioequivalence of two formulations of LOS/HCTZ (100 mg + 25 mg, respectively, as tablets), namely, the reference Hyzaar® (Merck Sharp & Dohme Farmacêutica Ltd., Brazil) and the generic (test) formulation containing the same dosage of both compounds. The study was conducted in accordance with the revised Declaration of Helsinki, the rules of Good Clinical Practice (ICH-GCP) and the Resolutions No. 196/96 and 251/97 of the National Health Council – Health Ministry, Brazil. The clinical protocol was approved by the Research Ethics Committee of University of Campinas – UNICAMP, São Paulo, Brazil, and all participants provided written, informed consent.

Twenty-eight (14 male) healthy volunteers were selected for this study according to medical history, physical examination, blood pressure, temperature, heart frequency, electrocardiogram, and standard laboratory test results (blood cell count, biochemical profile, β -HCG, hepatitis B and C, HIV, urinalysis, and microscopic examination of stool specimens). The demographic data of these volunteers were: age 19–45 (mean 31.82 ± 7.44) years, height 150–182 (mean 163.9 ± 8.20) cm, weight 51–76.3 (mean 60.87 ± 7.82) kg, and Index of Corporal Mass 19.43 – 27.99 kg/m² (mean 22.84 ± 2.33).

A standard crossover two-period randomized single-dose model, with a 7-day wash-out interval between doses was used. Fourteen volunteers were randomly allocated for the sequence reference/test and 14 for test/reference. The volunteers entered the Clinical Pharmacology Unit 10 h before drug administration and left the Unit 14 h after sampling. In each period, after 8 h fast, a heparinized catheter was introduced in a superficial vein and a predosing blood sample was collected. After time 0 sampling, each volunteer was then orally administered one LOS+HCTZ tablet (100+25 mg) of the reference or the test formulations with 200 mL of water. The volunteers continued to fast for 4 h after drug administration. Venous blood samples (8 mL) were collected at 00:15, 00:20, 00:30, 00:40, 00:45, 01:00, 01:20, 01:40, 02:00, 02:20, 02:30, 02:40, 03:00, 03:30, 04:00, 05:00, 06:00, 08:00, 10:00, 14:00, 24:00, and 48:00 h post-dosing. The plasma was then separated by centrifugation at 3000 rpm for 10 min, and was stored at -20°C until assayed for the LOS and HCTZ content.

The value of $C_{\max}$ (peak plasma concentration) and its corresponding time ($T_{\max}$) were determined from the individual plasma concentration data. The pharmacokinetic parameter AUC_{0-t} (area under the plasma drug concentration–time curve between time 0 and time of the last observed concentration higher than LOQ) was calculated by the trapezoid method. The extrapolated parameter $\text{AUC}_{0-\infty}$ (AUC from 0 to infinity) was calculated by adding the value of (C_t / K_e) to the calculated AUC_{0-t} , where C_t is the last determined concentration higher than LOQ and K_e is the first-order terminal elimination rate constant, determined by the least-square linear regression approach, using the four last points, which describe the elimination phase on a log-linear plot.

The terminal half-life parameter ($t_{1/2}$) was derived from this rate constant ($t_{1/2} = \ln(2) / K_e$). A two-ways ANOVA test was used to verify the effects of formulations, periods, sequence, and subjects within the sequence on the log-transformed parameters $C_{\max}$, AUC_{0-t} , and $\text{AUC}_{0-\infty}$ obtained from a crossover model. The average bioequivalence was assessed whether the 90% CI of the ratios for the parameters $C_{\max}$, AUC_{0-t} , and $\text{AUC}_{0-\infty}$ was within the 80–125% interval indicating bioequivalence as proposed by the U.S. Food and Drug Administration. EquivTest v.2.0 (Statistical Solution Ltd., Saugus, MA) and WinNonlin™ v.3.1 softwares were used for calculation of the studied pharmacokinetic parameters (Pharsight Corp., Mountain View, CA).

Results

Sample Analysis

The application of this simple LLE protocol allowed a rapid and reproducible method for the simultaneous extraction of LOS, HCTZ, and both internal standards VAL and CHTD to be further quantified. After extraction, samples showed to be cleaned enough to be analyzed in a LC/MS/MS system. A large number of samples can be determined daily using this approach.

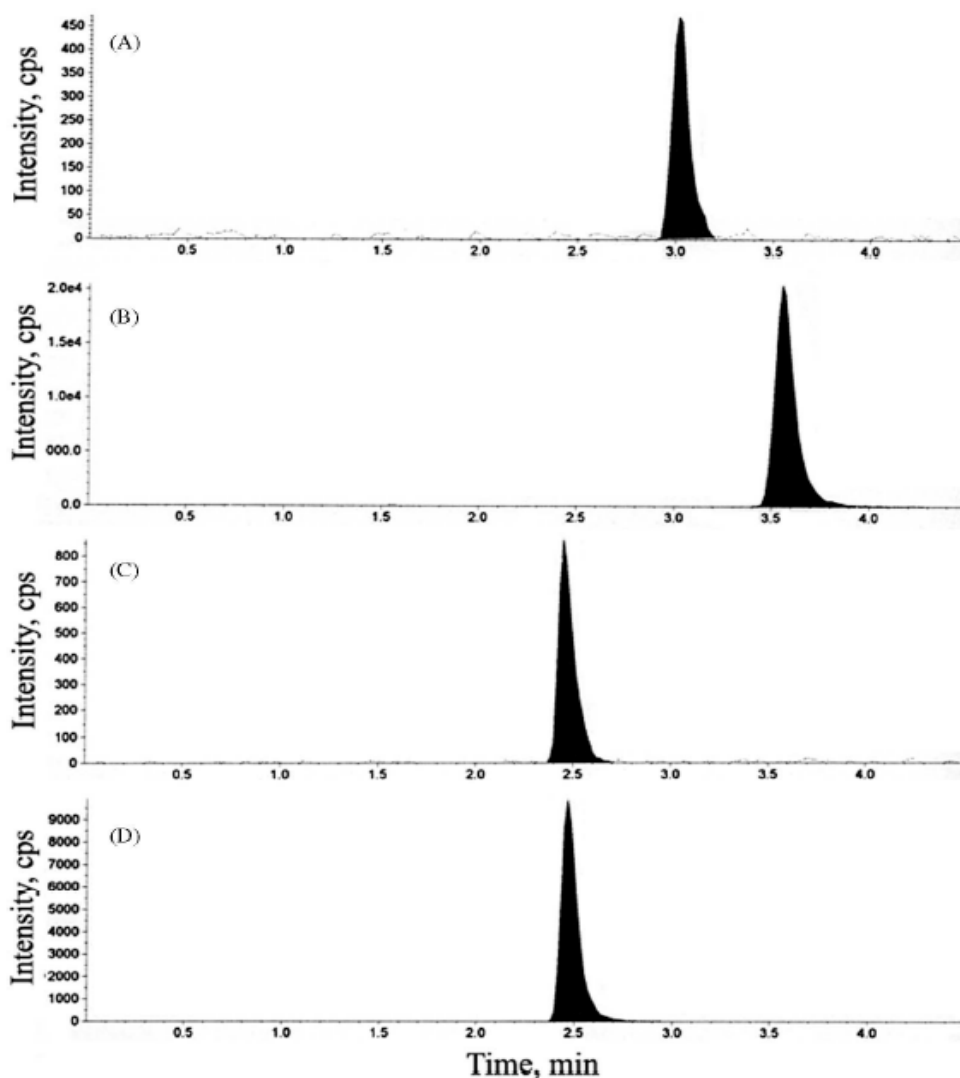


Figure 1. MRM chromatogram of extracted losartan and hydrochlorothiazide. Plasma samples spiked at the LOQ concentration (4 ng/mL) of LOS or HCTZ were extracted and analyzed as described in the experimental procedure. The internal standards chromatograms are also included. (A) losartan, (B) valsartan, (C) hydrochlorothiazide, and (D) chlorthalidone.

No significant co-elution of plasma elements were observed in the MRM using a C8, 150 × 4.6 mm column and a runtime of 4.5 min. Chromatograms obtained using hemolyzed and lipemic blank plasma did not exhibit any real differences from those for normal blank plasma. Representative MRM LC/MS/MS chromatograms are shown in Figure 1. The retention times of LOS, HCTZ, VAL, and CHTD were 2.96, 2.46, 3.44, and 2.48 min, respectively. The retention times of all compounds and the column backpressure remained practically constant by the end of study validation and quantification of all the samples.

Standard Curves

A full validation was performed according to the U.S. Food and Drug Administration (FDA) guidance on bioanalytical method validation. During the method validation, the regression coefficients (R^2) for the three runs were greater than 0.9957 and 0.9994 for LOS and HCTZ, respectively. The standard curves obtained for the three molecules are presented in Table 1.

The recoveries observed ($n = 3$) for QCL, QCM, and QCH were 71.5, 84.5, and 65.7% for LOS, and 65.1% for VAL, respectively. Furthermore, the recoveries observed were 73.2, 82.8, and 64.9% for HCTZ, and 78.5% for CHTD, respectively.

The LOQ defined as the lowest concentration of the analyte in plasma measured with acceptable accuracy and precision was 4 ng/mL for both LOS and HCTZ.

Accuracy and Precision

During method validation, the precision and accuracy were also assessed by analyzing QC samples over three runs. Data for both types of accuracy and precision (expressed as CV%) are presented in Table 2 for both LOS and HCTZ. These results, as well as the respective values for the percentage accuracy, were within the acceptance criteria for precision and accuracy.

Stability Studies

The stability of the analytes in both plasma and stock solutions were examined as part of the method validation to ensure that LOS and HCTZ were stable at distinct timing and temperature conditions. The protocol for stability in plasma samples included: a) three cycles of freeze-thawing; b) exposure of the samples at the bench to room temperature for 6:30 h; c) exposure of the extracted samples to the autosampler rack temperature for 2 days. Losartan and HCTZ stock solution stability was estimated by comparing fresh and old dilutions kept at rack temperature for 21 days. Under all these conditions both molecules were stable (< 15% variation).

The long-term stability showed that both molecules were stable after 99 days at -20°C , showing a variation of only -8.7% .

Bioequivalence Study

The results of this study confirm that both formulations of LOS/HCTZ were well tolerated at the administered doses and there were not significant adverse reactions. None of the

Table 1
Calibration equation parameters obtained during the validation of the method used for the simultaneous quantification of LOS and HCTZ in human plasma

Validation Run	LOS		HCTZ	
	Regression Equations	r^2	Regression Equations	r^2
1	$y = 0.00422x + 0.000337$	0.9957	$y = 0.0179x + 0.00377$	0.9995
2	$y = 0.00393x + 0.00127$	0.9957	$y = 0.0185x + 0.00135$	0.9988
3	$y = 0.00374x + 0.00181$	0.9977	$y = 0.0182x + 0.00694$	0.9994

Table 2

Summary of % intra- and inter-batch precision and accuracy results for the quantification of quality control (QC) samples of both LOS and HCTZ in human plasma

	Intra-Run Accuracy*	Inter-Run Accuracy [†]	Intra-Run Precision [‡] (% CV)	Inter-Run Precision [‡] (% CV)
LOS QC Samples				
QC-LQ	91.3	99.9	11.9	8.0
QCL	105.8	106.4	6.9	1.0
QCM	106.4	104.5	2.6	3.0
QCH	102.4	101.3	5.7	1.6
HCTZ QC Samples				
QC-LQ	91.5	97.4	7.7	7.7
QCL	95.7	98.5	3.1	2.5
QCM	97.3	101.4	1.4	3.7
QCH	97.4	99.6	4.5	2.8

* (n = 7), expressed as (found concentration/nominal concentration) × 100.

[†] Values obtained from all 3 runs (n = 21).

[‡] n = 7.

biochemical parameters presented any clinically relevant alterations. A total of 28 volunteers finished the study. Mean pharmacokinetic parameters of LOS and HCTZ from all the 28 volunteers after administration of each LOS/HCTZ formulation (100 mg + 25 mg, respectively, as tablets) are presented in Figure 2. The plasma concentration of LOS as well as for HCTZ did not differ significantly after administration of both formulations, i.e., LOS/HCTZ test tablet and the reference one.

The pharmacokinetic parameters of LOS and HCTZ after oral administration of both formulations are summarized in Tables 3–5. The geometric mean and respective 90% CI of LOS test/reference percent ratios were 100.42% (83.00–121.50%) for $C_{\max}$ and 108.59% (98.27–119.98%) for AUC_{last} . Furthermore, the 90% confidence intervals for HCTZ were 92.72% (82.41–104.32%) for $C_{\max}$ and 98.74% (91.21–106.90%) for AUC_{last} .

Discussion

The objective of this work was to develop a simple, rapid, and specific method for simultaneously quantifying LOS and HCTZ in a large number of human plasma samples deriving from a pharmacokinetic study. These studies require highly selective and sensitive analytical methods that provide high accuracy and precision for the determination of drug concentrations. The combination liquid chromatography/mass spectrometry is currently accepted as being a powerful means of determining organic molecules from complex biological matrices (14–17). The selectivity and sensitivity of LC/MS/MS allowed analysis times to be reduced, such that sample preparation time often exceeds the analysis time of samples. LC/MS/MS was the method of choice because it offers high specificity and sensitivity, good precision and accuracy, and a wide dynamic range, in addition to high throughput, which is an essential characteristic in bioequivalence studies. Several analytical methods for the separate quantitative determination of LOS and HCTZ using UV (18–20), fluorescence (21,22), or electrochemical detection (23) have been reported.

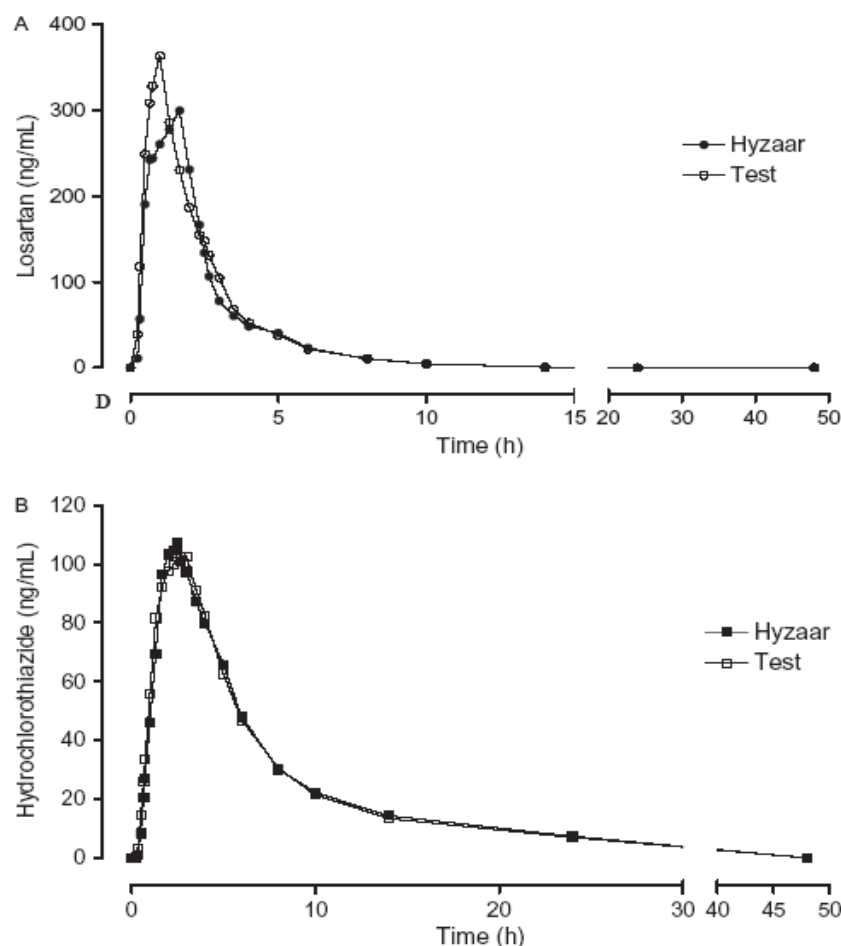


Figure 2. (A) Mean LOS and (B) HCTZ plasma concentrations vs. time curve after oral administration of LOS/HCTZ (test product) or Hyzaar® (reference product) tablet formulations (n = 28).

A pharmacokinetics study reporting the detection of both molecules in human plasma by a combination of HPLC-fluorescence for losartan and LC/MS/MS for hydrochlorothiazide detection was recently published (21). The main disadvantage of this study is to apply two different methods for the quantification of LOS and HCTZ. All samples need to be analyzed twice, applying two different extraction methods followed by two different detection systems. Despite showing a lower LOQ for hydrochlorothiazide (0.41 ng/mL), the LOQ for losartan was higher than our method (6.4 ng/mL).

A method published in the literature before our research describing the simultaneous quantification of LOS and HCTZ in human plasma, makes use of a fully automated solid-phase extraction (SPE) protocol, based on a 96-well apparatus, to isolate LOS, its major circulating metabolite EXP-3174, HCTZ, and furosemide (internal standard [IS]) from human plasma (24). In that work, the authors described a lower limit of quantification for

Table 3

Arithmetic mean and 90% CI of the pharmacokinetics parameters of LOS obtained from 28 volunteers after administration of each 100 mg losartan tablet formulation

Pharmacokinetics parameters	LOS 100 mg		Hyzaar®	
	Mean	SD	Mean	SD
T _{max} (h)	1.21	0.67	1.39	0.88
C _{max} (ng/mL)	523.54	259.87	531.96	263.77
AUC _{last} ([ng x h]/mL)	808.26	281.69	747.76	253.52
T _{1/2} (h)	1.91	0.40	1.98	0.51
AUC _{all (0-48h)} ([ng x h]/mL)	821.02	284.64	759.97	256.69
AUC _{inf} ([ng x h]/mL)	826.17	281.86	766.54	255.43

Table 4

Arithmetic mean and 90% CI of the pharmacokinetics parameters of HCTZ obtained from 28 volunteers after administration of each 25 mg HCTZ tablet formulation

Pharmacokinetics parameters	HCTZ 25 mg		Hyzaar®	
	Mean	SD	Mean	SD
T _{max} (h)	2.54	1.14	2.33	0.99
C _{max} (ng/mL)	121.81	40.07	131.92	47.72
AUC _{last} ([ng x h]/mL)	724.84	232.46	729.19	205.71
T _{1/2} (h)	8.11	2.21	8.52	2.14
AUC _{all (0-48h)} ([ng x h]/mL)	809.36	268.54	818.33	228.47
AUC _{inf} ([ng x h]/mL)	814.50	294.62	821.75	230.35

both LOS (1.0 ng/mL) and HCTZ (0.5 ng/mL) compared to the LOQ described in this work (4.0 ng/mL). The disadvantage of this approach is the high price of SPE columns and the automatic apparatus needed to perform the extractions, making it impossible for all laboratories to afford this extraction system in a routine analysis. However, our method is very simple, it eliminates the need of any sophisticated apparatus, and can be performed in any analytical laboratory. The pharmacokinetic results demonstrated that our method is suitable for simultaneous measuring of these drugs in plasma samples obtained during a pharmacokinetic or bioequivalence study.

Conclusion

A very simple and fast method involving the LLE protocol and LC/MS/MS analysis was developed for the simultaneous quantification of LOS and HCTZ in human plasma. Losartan and HCTZ are formulated together and both are detected in the blood after it has been administered. Using the protocol developed in this work, hundreds of samples can be analyzed daily, while only small quantities of plasma and solvent are consumed. The method developed here was validated over the concentration ranges of 4–800 ng/mL for LOS and 4–500 ng/mL for HCTZ. These ranges are suitable for measuring these drugs in plasma

Table 5
LOS and HCTZ geometric mean of the individual
 AUC_{last} , AUC_{0-inf} and C_{max} ratios (test/reference formulation)
and the respective 90% confidence intervals (CI)

	Geometric Mean	90% CI	ANOVA CV (%)
LOS/ Hyzaar®			
C_{max} % ratio	100.42%	83.00–121.50	43.69
AUC_{last} % ratio	108.59	98.27–119.98	22.13
HCTZ/ Hyzaar®			
C_{max} % ratio	92.72	82.41–104.32	26.28
AUC_{last} % ratio	98.74	91.21–106.90	17.54

samples obtained for a pharmacokinetic or bioequivalence study. The method possessed excellent precision and accuracy and proved to be reliable.

Based on the calculated 90% CI for C_{max} and AUC_{last} LOS-HCTZ/Hyzaar®, individual ratios for both LOS and HCTZ are within 80–125% interval defined by the U.S. Food and Drug Administration, it can be concluded that tested LOS-HCTZ formulation (100 mg losartan associated with 25 mg hydrochlorothiazide) is bioequivalent to Hyzaar® (Merck Sharp & Dohme Pharmaceuticals Ltd.), in regard to both extent and rate of absorption of both LOS and HCTZ.

Declaration of Interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

1. Sica DA, Gehr TW, Ghosh S. Clinical pharmacokinetics of losartan. *Clin Pharmacokinet* 2005; 44:797–814.
2. Brunner HR, Nussberger J, Waeber B. Angiotensin II blockade compared with other pharmacological methods of inhibiting the renin-angiotensin system. *J Hypertens Suppl* 1993;11:S53–58.
3. Rush JE, Rajfer SI. Theoretical basis for the use of angiotensin II antagonists in the treatment of heart failure. *J Hypertens Suppl* 1993;11:S69–71.
4. Sachinidis A, Ko Y, Weisser P, Meyer zu Brickwedde MK, Dusing R, Christian R, Wiecek AJ, Vetter H. EXP3174, a metabolite of losartan (MK 954, DuP 753) is more potent than losartan in blocking the angiotensin II-induced responses in vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* 1993;11:155–162.
5. Lo MW, Goldberg MR, McCrea JB, Lu H, Furtek CI, Bjornsson TD. Pharmacokinetics of losartan, an angiotensin II receptor antagonist, and its active metabolite EXP3174 in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1995;58:641–649.
6. Kazierad DJ, Martin DE, Blum RA, Tenero DM, Ilson B, Boike SC, Etheredge R, Jorkasky DK. Effect of fluconazole on the pharmacokinetics of eprosartan and losartan in healthy male volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 1997;62:417–425.
7. Ohtawa M, Takayama F, Saitoh K, Yoshinaga T, Nakashima M. Pharmacokinetics and biochemical efficacy after single and multiple oral administration of losartan, an orally active non-peptide angiotensin II receptor antagonist, in humans. *Br J Clin Pharmacol* 1993;35:290–297.

8. Christ DD. Human plasma protein binding of the angiotensin II receptor antagonist losartan potassium (DuP 753/MK 954) and its pharmacologically active metabolite EXP3174. *J Clin Pharmacol* 1995;35:515–520.
9. Munger MA, Furniss SM. Angiotensin II receptor blockers: Novel therapy for heart failure? *Pharmacotherapy* 1996;16:59S–68S.
10. Beermann B, Groschinsky-Grind M, Rosen A. Absorption, metabolism, and excretion of hydrochlorothiazide. *Clin Pharmacol Ther* 1976;19:531–537.
11. Beermann B, Groschinsky-Grind M. Pharmacokinetics of hydrochlorothiazide in man. *Eur J Clin Pharmacol* 1977;12:297–303.
12. Asmar R. Targeting effective blood pressure control with angiotensin receptor blockers. *Int J Clin Pract* 2006;60:315–320.
13. McIntyre M, Caffè SE, Michalak RA, Reid JL. Losartan, an orally active angiotensin (AT1) receptor antagonist: A review of its efficacy and safety in essential hypertension. *Pharmacol Ther* 1997;74:181–194.
14. Kerns EH, Di L. Utility of mass spectrometry for pharmaceutical profiling applications. *Curr Drug Metab* 2006;7:457–466.
15. Marzo A, Bo LD. Tandem mass spectrometry (LC-MS-MS): A predominant role in bioassays for pharmacokinetic studies. *Arzneimittelforschung* 2007;57:122–128.
16. Maurer HH. Current role of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. *Anal Bioanal Chem* 2007;388:1315–1325.
17. Zhong D, Chen X, Gu J, Li X, Guo J. Applications of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in drug and biomedical analyses. *Clin Chim Acta* 2001; 313:147–150.
18. Soldner A, Spahn-Langguth H, Mutschler E. HPLC assays to simultaneously determine the angiotensin-AT1 antagonist losartan as well as its main and active metabolite EXP 3174 in biological material of humans and rats. *J Pharm Biomed Anal* 1998;16:863–873.
19. Yeung PK, Jamieson A, Smith GJ, Fice D, Pollak PT. Determination of plasma concentrations of losartan in patients by HPLC using solid phase extraction and UV detection. *Int J Pharm* 2000;204:17–22.
20. Zendelovska D, Stafilov T, Milosevski P. Development of solid-phase extraction method and its application for determination of hydrochlorothiazide in human plasma using HPLC. *Biomed Chromatogr* 2004;18:71–76.
21. Koytchev R, Ozalp Y, Erenmemisoglu A, van der Meer MJ, Alpan RS. Combination of losartan and hydrochlorothiazide: In vivo bioequivalence. *Arzneimittelforschung* 2004;54:611–617.
22. Tamimi JJ, Salem II, Mahmood Alam S, Zaman Q, Dham R. Comparative pharmacokinetics of two tablet formulations of Losartan: Bioequivalence assessment. *Biopharm Drug Dispos* 2005;26:205–210.
23. Richter K, Oertel R, Kirch W. New sensitive method for the determination of hydrochlorothiazide in human serum by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr A* 1996;729:293–296.
24. Kolocouri F, Dotsikas Y, Apostolou C, Kousoulos C, Loukas YL. Simultaneous determination of losartan, EXP-3174 and hydrochlorothiazide in plasma via fully automated 96-well-format-based solid-phase extraction and liquid chromatography-negative electrospray tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2007;387:593–601.

ANEXO 5

COMPROVANTE DE AUTORIZAÇÃO

LICENSE YOUR CONTENT PRODUCTS AND SOLUTIONS PARTNERS EDUCATION ABOUT US		
Back to view orders Copy order Print this page Print terms & conditions Print citation information (What's this?) Confirmation Number: 10399221 Order Date: 05/06/2011 Customer Information Customer: Roberto Moreira Account Number: 3000409169 Organization: Unicamp Email: robertomoreir@yahoo.com.br Phone: +55 (19)78091024 Payment Method: Invoice Search order details by: Choose One Go Order Details Clinical and experimental hypertension <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="vertical-align: top; width: 50%;"> Order detail ID: 54500217 ISSN: 1525-6006 Publication year: 2009 Publication Type: e-Journal Publisher: TAYLOR & FRANCIS INC Author/Editor: Myriam C. Salvadori; Roberto F. Moreira; et al Your reference: Roberto's thesis </td> <td style="vertical-align: top; width: 50%;"> Permission Status: ✔ Granted Permission type: Republish or display content Type of use: Dissertation Requested use: Dissertation Republication title: DETERMINAÇÃO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO DE FARMACOS COM AÇÃO ANTI-HIPERTENSIVA APLICADOS À CLÍNICA Republishing organization: UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas Organization status: Non-profit 501(c)(3) Republication date: 08/12/2011 Circulation/ Distribution: 20 Type of content: Full article/chapter Description of requested content: Simultaneous Determination of Losartan and Hydrochlorothiazide in Human Page range(s): 415-427 Translating to: No Translation Requested content's publication date: 08/01/2009 </td> </tr> </table> Billing Status: Invoiced: 1244098 Copy \$ 3.50 Total order items: 1 Order Total: \$3.50	Order detail ID: 54500217 ISSN: 1525-6006 Publication year: 2009 Publication Type: e-Journal Publisher: TAYLOR & FRANCIS INC Author/Editor: Myriam C. Salvadori; Roberto F. Moreira; et al Your reference: Roberto's thesis	Permission Status: ✔ Granted Permission type: Republish or display content Type of use: Dissertation Requested use: Dissertation Republication title: DETERMINAÇÃO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO DE FARMACOS COM AÇÃO ANTI-HIPERTENSIVA APLICADOS À CLÍNICA Republishing organization: UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas Organization status: Non-profit 501(c)(3) Republication date: 08/12/2011 Circulation/ Distribution: 20 Type of content: Full article/chapter Description of requested content: Simultaneous Determination of Losartan and Hydrochlorothiazide in Human Page range(s): 415-427 Translating to: No Translation Requested content's publication date: 08/01/2009
Order detail ID: 54500217 ISSN: 1525-6006 Publication year: 2009 Publication Type: e-Journal Publisher: TAYLOR & FRANCIS INC Author/Editor: Myriam C. Salvadori; Roberto F. Moreira; et al Your reference: Roberto's thesis	Permission Status: ✔ Granted Permission type: Republish or display content Type of use: Dissertation Requested use: Dissertation Republication title: DETERMINAÇÃO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO DE FARMACOS COM AÇÃO ANTI-HIPERTENSIVA APLICADOS À CLÍNICA Republishing organization: UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas Organization status: Non-profit 501(c)(3) Republication date: 08/12/2011 Circulation/ Distribution: 20 Type of content: Full article/chapter Description of requested content: Simultaneous Determination of Losartan and Hydrochlorothiazide in Human Page range(s): 415-427 Translating to: No Translation Requested content's publication date: 08/01/2009	