



FABIANA DUARTE MENDES E MODOLO

**Estudo de Biodisponibilidade Comparativa de uma Formulação
Teste (Lipless [Ciprofibrato] - comprimido - 100mg, Biolab Sanus
Farmacêutica Ltda.) versus uma Formulação Referência (Oroxadin
[Ciprofibrato] comprimido - 100mg, Sanofi-Aventis) em Voluntários
Sadios de ambos os sexos**

**CAMPINAS
2012**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

Fabiana Duarte Mendes e Modolo

**ESTUDO DE BIODISPONIBILIDADE COMPARATIVA DE UMA
FORMULAÇÃO TESTE (LIPLESS [CIPROFIBRATO] -
COMPRIMIDO - 100MG, BIOLAB SANUS FARMACÊUTICA
LTDA.) VERSUS UMA FORMULAÇÃO REFERÊNCIA
(OROXADIN [CIPROFIBRATO] COMPRIMIDO - 100MG,
SANOFI-AVENTIS) EM VOLUNTÁRIOS SADIOS DE AMBOS
OS SEXOS**

Orientador: Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Tese de Doutorado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Clínica Médica da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção de título de
Doutora em Clínica Médica, área de
concentração Clínica Médica.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA
FABIANA DUARTE MENDES E MODOLO E
ORIENTADA PELO PROF. DR. GILBERTO DE
NUCCI

Assinatura do Orientador:

Campinas
2012

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

| | |
|-------|---|
| M721e | <p>Modolo, Fabiana Duarte Mendes e, 1973- Estudo de biodisponibilidade comparativa de uma formulação teste (Lipless [ciprofibrato] - comprimido – 100 mg; Biolab Sanus Farmacêutica Ltda.) versus uma formulação referência (Oroxadin [ciprofibrato] comprimido - 100 mg; Sanofi- Aventis) em voluntários sadios de ambos os sexos / Fabiana Duarte Mendes e Modolo. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.</p> <p style="text-align: center;">Orientador : Gilberto de Nucci. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.</p> <p style="text-align: center;">1. Equivalência terapêutica. 2. Disponibilidade biológica. 3. Medicamentos genéricos. I. Nucci, Gilberto de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.</p> |
|-------|---|

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Comparative Bioavailability Study of a Test Formulation (Lipless [Ciprofibrate] - tablet - 100 mg, Biolab Sanus Pharmacy Ltda.) versus a Reference Formulation (Oroxadin [Ciprofibrate] tablet - 100 mg, Sanofi-Aventis) in healthy volunteers of both sexes.

Palavras-chave em inglês: Therapeutic equivalence
Biological availability
Generic drugs

Área de Concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Clínica Médica

Banca Examinadora:

Gilberto de Nucci [Orientador]
Lilian Tereza Lavras Costallat
Helaine Maria Besteti Pires Mayer Milanez
José Cássio de Almeida Magalhães
Marcia Pereira Bueno

Data da Defesa: 27/08/2012

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno: Fabiana Duarte Mendes e Modolo

Orientador: Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Membros:

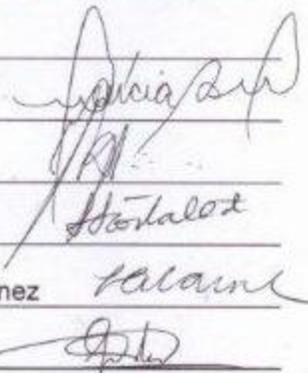
1. Profª. Drª. Márcia Pereira Bueno

2. Prof. Dr. José Cássio de Almeida Magalhães

3. Profª. Drª. Lilian Tereza Lavras Costallat

4. Profª. Drª. Helaine Maria Besteti Pires Mayer Milanez

5. Prof. Dr. Gilberto de Nucci



The image shows five handwritten signatures in black ink, each corresponding to one of the members listed on the left. The signatures are written over horizontal lines that separate the names. The first signature is for Márcia Pereira Bueno, the second for José Cássio de Almeida Magalhães, the third for Lilian Tereza Lavras Costallat, the fourth for Helaine Maria Besteti Pires Mayer Milanez, and the fifth for Gilberto de Nucci.

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

Data: 27/08/2012

“O valor das coisas não está no tempo
que elas duram, mas na intensidade com
que acontecem. Por isso existem momen-
tos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e
pessoas incomparáveis.”
(Fernando Pessoa)



Dedico este trabalho...

Aos meus pais Antônio Carlos e Cleuseni, que muito influenciaram na minha formação e personalidade.

Ao meu marido João Henrique, pelo árduo e constante empenho na minha formação, além do equilíbrio familiar.

Ao meu filho João Pedro, pelo amor incondicional. Minha vida, alegria e fonte de inspiração.

Aos meus irmãos Gustavo e Antônio Carlos, pelos anos de companheirismo e fidelidade.

À minha avó Jamile, pelo carinho maternal.

Agradecimentos

Aos meus pais, Antônio Carlos e Cleuseni, pelo exemplo de perseverança e honestidade, pela credibilidade, pelo amor, por todo o processo evolutivo de minha vida. Pela garra e pela infinita confiança que sempre depositaram em mim. Simplesmente, por toda minha vida.

Ao meu marido, João Henrique Modolo, pela paciência, credibilidade, amor e apoio em todos os momentos.

Ao meu filho, João Pedro, por entender os momentos de ausência, pelo amor incondicional e sorriso sempre presente.

Ao meu irmão Gustavo, pela paciência, orientação, carinho, disposição, ajuda e presença nos momentos difíceis.

À minha sobrinha Giovanna, a “Gili”, pela graça e alegria que me proporcionou durante os estudos.

Ao meu irmão Antônio Carlos, que sempre me apoiou e aconselhou na evolução da carreira.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gilberto de Nucci, pelo exemplo de ética durante toda minha vida acadêmica e profissional.

A todos os funcionários da Galeno, em especial a Lu Chen, pelos dias de paciência, ajuda e amizade.

Aos meus amigos, pelos momentos de ausência ao longo deste trabalho.

Aos voluntários que participaram deste estudo.

Sumário

| | |
|--|-------------|
| <i>Símbolos, Siglas e Abreviaturas</i> | <i>xi</i> |
| <i>Resumo</i> | <i>xv</i> |
| <i>Abstract</i> | <i>xvii</i> |
| 1. Introdução | 19 |
| 1.1. INDICAÇÕES..... | 21 |
| 1.2. CONTRAINDICAÇÕES | 22 |
| 1.3. INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS..... | 22 |
| 1.4. REAÇÕES ADVERSAS | 24 |
| 1.5. POSOLOGIA | 25 |
| 1.6. PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS | 26 |
| 1.7. METABOLISMO DOS LIPÍDEOS..... | 27 |
| 1.8. MECANISMO DE AÇÃO..... | 28 |
| 1.9. MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO..... | 29 |
| 2. Objetivos | 30 |
| 3. Publicação | 31 |
| 3.1. ARTIGO..... | 31 |

| | |
|--|-----------|
| 4. Discussão | 40 |
| 5. Conclusões | 43 |
| 6. Referências Bibliográficas..... | 45 |
| 7. Anexos..... | 50 |
| 7.1. ANEXO 1. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA..... | 50 |
| 7.2. ANEXO 2 . TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO | 52 |
| 7.3. ANEXO 3. TABELA DE ALEATORIZAÇÃO | 60 |
| 7.4. ANEXO 4. REGISTRO DE EVENTOS ADVERSOS | 61 |
| 7.5. ANEXO 5. OUTRAS PUBLICAÇÕES DURANTE O PERÍODO DE DOUTORADO | 62 |
| 7.6. ANEXO 6. PEDIDO DE AUTORIZAÇÃO À REVISTA PARA O ARTIGO SER INCLUÍDO NA TESE..... | 71 |
| 7.7. ANEXO 7. AUTORIZAÇÃO DA REVISTA PARA O TRABALHO SER INCLUÍDO NA TESE | 72 |

Lista de Figuras

| | | Páginas |
|-----------------|--|----------------|
| Figura 1 | <i>Estrutura molecular do ciprofibrato</i> | 19 |
| Figura 2 | <i>Perfil farmacocinético do ciprofibrato após a administração de 100mg/dia e de 200mg/dia de ciprofibrato</i> | 26 |
| Figura 3 | <i>Diagrama esquemático do transporte de colesterol no organismo</i> | 28 |

Lista de Tabelas

| | Página |
|---|---------------|
| <i>Tabela 1</i> <i>Classificação de Frederickson</i> | <i>21</i> |

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

| | |
|--|--|
| ANOVA | Análise de variância |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| ASC | Área sob a curva |
| ASC_{INF} | Área sob a curva de concentração da droga versus tempo do tempo 0 (zero) extrapolada ao infinito, calculada pelo método linear-log trapezoidal. $AUC_{[0-\infty]} = AUC_{[0-\text{ÚLTIMO}]} + Ct/Ke$, onde Ct é a última concentração quantificável |
| ASC_{ÚLTIMO} | Área sob a curva de concentração da droga versus tempo do tempo 0 (zero) ao tempo da última concentração acima do limite de quantificação (LOQ) comum a todos os períodos, calculada pelo método linear log trapezoidal. |
| % ASC_{0-INF} EXTRAPOLADA | Porcentagem de ASC _{INF} que é extrapolada do T _{ÚLTIMO} para o infinito $((ASC_{INF} - ASC_{ÚLTIMO})/ASC_{INF}) * 100$. |
| BLOQ | Abaixo do limite de quantificação |
| CI | Intervalo de confiança |
| CL_{CR} | Clearance de creatinina |
| C_{MAX} | Concentração correspondente ao T _{MAX} |
| CPK | Creatinofosfoquinase |
| CQA | Controle de qualidade alto |
| CQB | Controle de qualidade baixo |
| CQM | Controle de qualidade médio |
| C_{ÚLTIMO} | Concentração correspondente à última concentração quantificada |

| | |
|---------------------------------|--|
| CV | Coeficiente variação |
| CYP | Citocromo P450 |
| CYP3A4 | Citocromo P450, família 3, subfamília A, polipeptídeo 4 |
| EMA | European Medicines Agency |
| FDA | Food and Drug Administration |
| Hb | Hemoglobina |
| HDL | Lipoproteína de alta densidade |
| HMG-CoA | Hidroximetilglutaril coenzima A |
| HPLC-MS/MS | Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa |
| Ke | Constante de taxa de eliminação terminal determinada por análise de regressão log-linear |
| LC-MS/MS / CLAE-EM/EM | Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa |
| LDL | Lipoproteína de baixa densidade |
| Limite de Quantificação | (LOQ) comum a todos os períodos, calculada pelo método linear-log trapezoidal |
| Ln | Logaritmo |
| LOQ | Limite de quantificação |
| Max | Valor máximo |
| Média | Média aritmética |
| min | Minutos |
| N | Número |
| P | Período |
| PPAR-α | Receptor ativador proliferador de peroxissomo |
| RT | Tempo de retenção |
| SD | Desvio padrão |

| | |
|---------------------------|---|
| SI | Padrão interno |
| T/R | Teste/Referência |
| T_{1/2} | Tempo de meia vida = $\ln(2)/K_e$ |
| T_{MAX} | Tempo em que ocorre a concentração máxima |
| T_{ÚLTIMO} | Tempo da última concentração |
| u.m.a | unidade de massa atômica |
| UNICAMP | Universidade Estadual de Campinas |
| VLDL | Lipoproteína de muito baixa densidade |
| µg | Micrograma |

Resumo

Método rápido, sensível e específico foi desenvolvido para quantificar ciprofibrato no plasma humano, utilizando bezafibrato como padrão interno (SI). O analito e o padrão interno foram extraídos do plasma, por extração líquido-líquido, usando um solvente orgânico (éter etílico/diclorometano 70/30 (v/v)). Os extratos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (HPLC-MS/MS), do tipo eletrospray. A cromatografia foi realizada com coluna Gênese C18 4µm analítica (4,6 x 150mm id) em fase móvel composta de acetonitrila/água (70/30, v/v) e 1 mM de ácido acético. O método teve um tempo de corrida cromatográfica de 2,7min e curva de calibração linear no intervalo de 0,1 - 60 µg/mL ($R^2 > 0,99$). O limite de quantificação foi de 0,1µg/mL. Os valores de acurácia e precisão intra-corrída e inter-corrída foram inferiores a 13,5%. Os testes de estabilidade não indicaram degradação significativa. A recuperação do ciprofibrato foi de 81,2%, 73,3% e 76,2% para as concentrações de 0,3, 5,0 e 48,0 µg/mL, respectivamente. Para o ciprofibrato, os parâmetros otimizados da energia *declustering*, energia de colisão e energia de saída foram -51 (V), -16 (eV) e -5 (V), respectivamente. O método também foi validado sem o uso do padrão interno. Este procedimento HPLC-MS/MS foi usado para avaliar a bioequivalência de duas formulações de comprimidos ciprofibrato 100mg, em voluntários sadios de ambos

os sexos. Os seguintes parâmetros farmacocinéticos foram obtidos das curvas de concentração plasmática de ciprofibrato versus tempo: ASC_{ULTIMO} , ASC_{0-168h} , C_{MAX} e T_{MAX} . A média geométrica com intervalo de confiança correspondente a 90% (CI) para a razão de Teste / Referência foram: 93,80% (IC 90%= 88,16 – 99,79%) para C_{MAX} , 98,31% (90% CI = 94,91-101,83%) para ASC_{ULTIMO} e 97,67% (90% CI = 94,45-101,01%) para ASC_{0-168h} . Uma vez que o intervalo de confiança de 90% para a razão geométrica de C_{MAX} , ASC_{ULTIMO} e ASC_{0-168h} estavam dentro do intervalo de 80% -125% proposto pelo FDA dos EUA, concluiu-se que ciprofibrato (Lipless® 100mg comprimido) formulação fabricado pela Biolab Sanus Farmacêutica Ltda. é bioequivalente à formulação Oroxadin® (100mg comprimido) para a velocidade e a extensão da absorção.

Abstract

A rapid, sensitive and specific method for quantifying ciprofibrate in human plasma, using bezafibrate as the internal standard (IS) is described. The analyte and the IS were extracted from plasma, by liquid-liquid extraction using an organic solvent (diethyl ether / dichloromethane 70/30 (v/v)). The extracts were analyzed by high performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Chromatography was performed using Genesis C18 4 μ m analytical column (4.6mm x 150mm i.d.) and a mobile phase consisting of acetonitrile/water (70/30, v/v) and 1mM acetic acid. The method had a chromatographic run time of 2.7 min and a linear calibration curve over the range 0.1-60 μ g/ml ($R^2 > 0.99$). The limit of quantification was 0.1 μ g/ml. The intra and interday accuracy and precision values of the assay were less than 13.5%. The stability tests indicated no significant degradation. The recovery of ciprofibrate was 81.2%, 73.3% and 76.2% for the 0.3, 5.0 and 48.0 μ g/mL standard concentrations, respectively. For ciprofibrate, the optimized parameters of the declustering potential, collision energy and collision exit potential were -51 (V), -16 (eV) and -5 (V), respectively. The method was also validated without the use of the internal standard. This HPLC-MS/MS procedure was used to assess the bioequivalence of two ciprofibrate 100mg tablet formulations, in healthy volunteers of both sexes. The

following pharmacokinetic parameters were obtained from the ciprofibrate plasma concentration vs. time curves: AUC_{LAST} , AUC_{0-168h} , C_{MAX} and T_{MAX} . The geometric mean with corresponding 90% confidence interval (CI) for Test/Reference percent ratios were 93.80% (90% CI= 88.16 - 99.79%) for C_{MAX} , 98.31% (90% CI= 94.91 - 101.83%) for AUC_{LAST} and 97.67% (90% CI= 94.45 - 101.01%) for AUC_{0-168h} . Since the 90% CI for AUC_{LAST} , AUC_{0-168h} and C_{MAX} ratios were within the 80–125% interval proposed by the US FDA, it was concluded that ciprofibrate (Lipless[®] 100 mg tablet) formulation manufactured by Biolab Sanus Farmacêutica Ltda. is bioequivalent to the Oroxadin[®] (100mg tablet) formulation for both the rate and the extent of absorption.

1.Introdução

O ciprofibrato é um agente hipolipemiante, derivado fenoxi-isobutirato, é caracterizado por sua cadeia lateral de diclorociclopropil, que confere à droga uma meia-vida maior¹. Tem uma fórmula molecular $C_{13}H_{14}Cl_2O_3$ e peso molecular de 289.2 u.m.a².

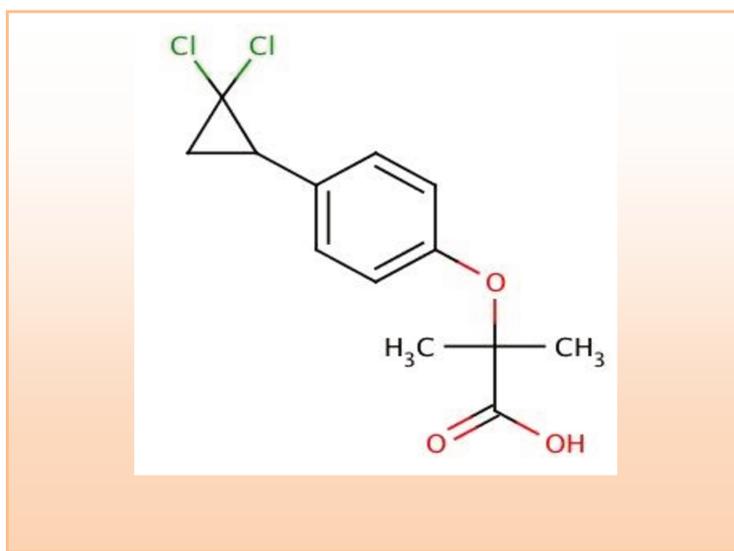


Figura 1. Estrutura molecular do ciprofibrato².

As principais ações são: promover menor fluxo de ácidos graxos livres para o fígado, menor síntese hepática de VLDL, estimular a atividade da lipase lipoprotéica (LDL) e aumentar a excreção biliar de colesterol hepático. Portanto, é um complemento eficaz da dieta no controle de concentrações elevadas do

colesterol, frações LDL e VLDL, e dos triglicerídeos; age reduzindo as lipoproteínas endógenas VLDL e LDL e mantém elevado o HDL^{3,4}.

Os fibratos reduzem os níveis plasmáticos de triglicerídeos em 30%-50% e, normalmente, aumentam os níveis de HDL-C em 5%-15%⁵, em média 10%⁶, dependendo do fenótipo lipídico e da concentração basal.

Podem também reduzir o LDL-C em até 15%-20%, embora o efeito também seja variável, dependendo do fenótipo lipídico e da concentração basal^{7,8}.

O ciprofibrato é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal. O metabolismo do ciprofibrato envolve dois tipos de reações: as reações de fase I (catabólicas) e as de fase II (anabólicas). Nas reações de fase I, o citocromo P450 combina-se com a molécula do ciprofibrato, sofre redução, oxidação, hidroxilação resultando num fármaco oxidado e regeneração da enzima P450. Este processo é conhecido como funcionalização, ou seja, introduz-se na molécula do ciprofibrato um grupo reativo, que serve de ponte de ataque para a conjugação. As reações de fase II são anabólicas, envolvem a conjugação deste grupo reativo introduzido na fase I com o glicuronídeo, é o processo de glicuronização, que ocorre no fígado. Conseqüentemente, há a formação de um conjugado glicurônico polar, que é excretado facilmente pelos rins⁹.

Possui alta ligação protéica¹⁰. É excretado na urina inalterado ou como conjugado glicurônico. A depuração plasmática está entre 1,35ml/h/kg e 1,55ml/h/kg. No período de dez dias, entre 80,22 ± 2,9% da dose administrada,

por via oral, é recuperada na urina¹¹. A meia-vida de eliminação é de aproximadamente 80 horas^{11,12}.

1.1.Indicações

Ciprofibrato é indicado para o tratamento da hiperlipidemia primária resistente às medidas dietéticas apropriadas, incluindo hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia e hiperlipidemia combinada tipos IIb, III, IV e V da classificação de Frederickson^{1,13-21}. Nestes fenótipos, há o aumento de VLDL isolado ou associado ao aumento de outra lipoproteína, e em todos os fenótipos há o aumento de colesterol e de triglicérides.

Tabela 1: Classificação de Frederickson

| Tipo | Lipoproteína Elevada | Colesterol | Triglicérides | Risco de Aterosclerose | Tratamento Medicamentoso |
|------|----------------------|------------|---------------|------------------------|--|
| I | Quilomicrons | + | +++ | SE | Não Existe |
| IIa | LDL | ++ | SE | Alto | Estatina com ou sem ezetimiba |
| IIb | LDL + VLDL | ++ | ++ | Alto | Fibratos, estatina, ácido nicotínico |
| III | β VLDL | ++ | ++ | Moderado | Fibratos |
| IV | VLDL | + | ++ | Moderado | Fibratos |
| V | Quilomicrons +VLDL | + | ++ | SE | Combinações de fibratos, niacina, óleo de peixe e estatina |

+ Concentração aumentada; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; SE: sem elevação; VLDL: Lipoproteína de densidade muito baixa; β VLDL: uma forma qualitativamente anormal de VLDL identificada por seu padrão eletroforético

1.2. Contraindicações

Ciprofibrato é contraindicado em casos de insuficiência hepática ou renal graves^{1,13-22}, na síndrome nefrótica, em todos os tipos de hipoalbuminemia, na gravidez, na lactação, em pacientes com hipersensibilidade ao ciprofibrato e em crianças¹.

As contraindicações correlacionadas com a função hepática, renal e a hipoalbuminemia são a fim de evitar o aumento da fração fisiologicamente ativa do fármaco, que pode conduzir a toxicidade no músculo¹.

Não há casos de teratogenicidade relatados. Fibratos são excretados no leite materno e, portanto, devem ser evitados na amamentação. Por precaução, não devem ser prescritos para crianças¹.

Deve-se ter parcimônia no uso de ciprofibrato em pacientes com doença na vesícula ou com colelitíase^{1,11,12}. Esta associação com colecistopatia é mais evidenciada em pacientes com uso de clofibrato²³.

Em idosos, a administração de ciprofibrato deve ser cautelosa, uma vez que as funções renais e hepáticas podem estar alteradas^{11,12}.

1.3. Interações Medicamentosas

Interações medicamentosas clinicamente importantes ocorrem devido à competição por sítios de ligação na albumina (varfarina e hipoglicemiantes orais) ou competição para CYP3A4 (inibidores da HMG-CoA redutase e ciclosporina)²⁴.

Devido à alta ligação às proteínas plasmáticas, o ciprofibrato pode deslocar outras substâncias de suas ligações protéicas. Em consequência, aumentam as concentrações da fração livre destas substâncias²⁵.

Pode ocorrer a potencialização do efeito da varfarina, com prolongamento do tempo de protrombina e risco de sangramento. Portanto, um eventual tratamento concomitante com anticoagulantes orais deve ser feito com posologia reduzida e com monitorização cuidadosa do tempo de protrombina^{24, 26-27}.

Apesar de não existirem dados disponíveis sobre a ocorrência de problemas clínicos significativos, existe um potencial de interação com hipoglicemiantes orais. A frequente coexistência de diabetes mellitus, não insulino dependente, com aumento de VLDL, num mesmo paciente, faz esta interação potencialmente comum²⁴.

Quando administrado com inibidores da HMG-CoA redutase (lovastatina, sinvastatina, pravastatina e fluvastatina) ou com outros fibratos, o risco de rabdomiólise, mioglobínúria e miopatia podem estar aumentados. O exato mecanismo subjacente a esta interação medicamentosa e a miotoxicidade subsequente é desconhecido²⁴.

Em pacientes com mialgia e fraqueza muscular, deve-se realizar a dosagem de CPK; o medicamento deverá ser suspenso em casos de miopatia e de níveis elevados de creatinofosfoquinase ¹¹.

Os estrogênios podem provocar hiperlipidemia, sendo que tal fato sugere uma interação farmacodinâmica com o ciprofibrato, porém ainda não há confirmação clínica ¹¹.

1.4. Reações Adversas

Em geral, o ciprofibrato é bem tolerado ^{1,28}.

Os efeitos colaterais mais comuns são dermatológicos e musculares. Podem ocorrer reações cutâneas, principalmente alérgicas, como: rash cutâneo, prurido, urticária e reações musculares como: mialgia e miopatia ³.

Há relatos de ocorrência ocasional de migrânea, vertigem, sintomas gastrintestinais (náuseas, vômito, dispepsia, sialose, diarreia, dor abdominal) e anormalidades nos testes de função hepática. Tais sintomas são usualmente leves ou moderados, ocorrem no início da terapia e tornam-se menos frequentes com a continuação da terapêutica ^{1,29}.

Dentre as manifestações adversas raras temos a fotossensibilidade, a sonolência, a pneumonite ¹¹, a fibrose pulmonar ¹¹, a fadiga ¹¹, a miosite e a rabdomiólise ²⁹.

A miosite apesar de rara, pode ser grave se associada a mioglobinúria, rabdomiólise e a insuficiência renal. Na maioria dos casos a toxicidade muscular é reversível, entre dez dias a três meses, com a suspensão do tratamento ^{30,31}. Os pacientes devem ser instruídos a avisar prontamente o seu médico; os níveis séricos de creatinoquinase (CPK) devem ser imediatamente verificados e a

suspensão do tratamento deverá ser realizada caso esteja elevada a CPK com sintomas de mialgia. A insuficiência renal crônica é um fator de risco para a rabdomiólise³².

Foi relatada uma baixa ocorrência de impotência, sem perda da libido e de alopecia, para medicamentos da mesma classe, que regridem com a suspensão da droga^{1,29}.

Não existem dados disponíveis que permitam avaliar os efeitos colaterais associados ao uso prolongado do medicamento, mais especificamente quanto ao risco de litíase biliar. O ciprofibrato parece ter pouco efeito sobre o índice litogênico biliar³³.

A hiperuricemia foi observada em pacientes com hiperlipidemia do tipo II ou IV, porém sua relação com o uso de ciprofibrato ainda não foi estabelecida¹¹.

1.5. Posologia

- **Adultos:** a posologia recomendada é de um comprimido de ciprofibrato (100mg) ao dia¹¹.
- **Idosos:** a mesma posologia para adultos, mas observando cuidadosamente as precauções e advertências¹¹.
- **Crianças:** O uso do ciprofibrato não é recomendado, pois não estão ainda estabelecidas a eficácia e tolerabilidade nessa faixa etária¹¹.
- **Insuficiência renal:** Em pacientes com insuficiência renal moderada, metade da dose poderá ser adequada, pela administração de um

comprimido (100mg) em dias alternados. Os pacientes devem ser cuidadosamente monitorados. O uso de ciprofibrato deve ser proscrito em casos de insuficiência renal grave ¹¹.

1.6. Parâmetros Farmacocinéticos

Com relação aos parâmetros farmacocinéticos, após a administração crônica de 100mg/dia de ciprofibrato, a concentração plasmática máxima é alcançada em cerca de uma hora em pacientes em jejum, ou com um retardo de duas a três horas em pacientes alimentados. A concentração plasmática máxima é de 66µg/mL a 88µg/mL ³⁴.

O tempo de meia vida terminal é de aproximadamente 80 a 100 horas. A eliminação renal pode ser significativamente mais lenta em pacientes com insuficiência renal grave. Nestes, há um aumento significativo no tempo de meia vida (clearance de creatinina CL_{CR} de 22ml/min/1,73m²). Entretanto, não há alteração no tempo de meia vida terminal em pacientes com insuficiência renal moderada (clearance de creatinina CL_{CR} de 49 ml/min/1,73m²) ^{22,35}.

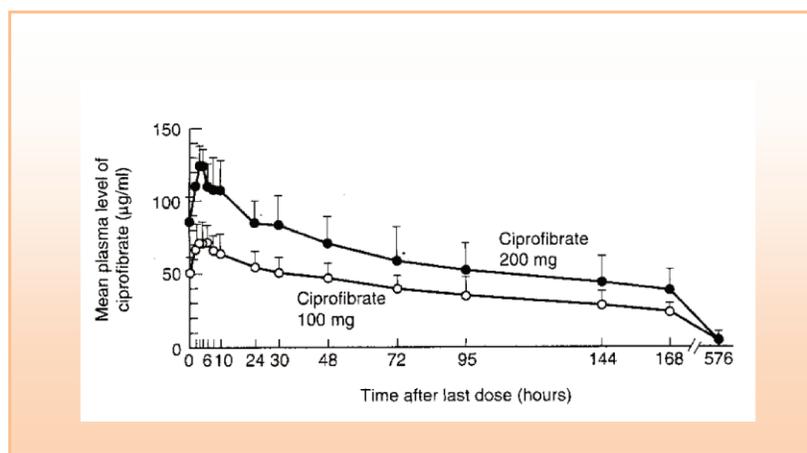


Figura 2. Perfil farmacocinético do ciprofibrato após a administração de 100 mg/dia e de 200 mg/dia de ciprofibrato ³⁴.

A concentração máxima do ciprofibrato é em torno de 70µg/ml, e o tempo de concentração máxima (Tmax) ocorre em torno de duas horas após a administração crônica de 100mg/dia de ciprofibrato³⁴, conforme pode ser observado no perfil farmacocinético acima.

Após a administração crônica de 200mg/dia de ciprofibrato, a concentração máxima é em torno de 130µg/ml, e o Tmax permanece o mesmo (duas horas)³⁴, demonstrando que o perfil farmacocinético do ciprofibrato é linear, ou seja, a medida que a dose aumenta, aumenta a concentração máxima.

1.7. Metabolismo dos Lipídeos

O colesterol e os triglicerídeos são transportados no plasma pelas lipoproteínas, que possuem quatro classes: os quilomícrons, a lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), a lipoproteína de baixa densidade (LDL) e a lipoproteína de alta densidade (HDL)²³.

Quilomícrons e VLDL transportam colesterol e triglicerídeos aos tecidos periféricos, onde o triglicerídeo é degradado pela lipase lipoproteica em ácidos graxos livres e glicerol; estes são captados nos tecidos periféricos (muscular e adiposo)²³.

O colesterol remanescente da VLDL é transportado pela LDL; parte deste colesterol é captado pelo tecido periférico (muscular e adiposo) e parte é captado pelo fígado, através dos receptores específicos de LDL. Os fibratos aumentam a ação da lipase lipoproteica e a captação hepática de LDL²³.

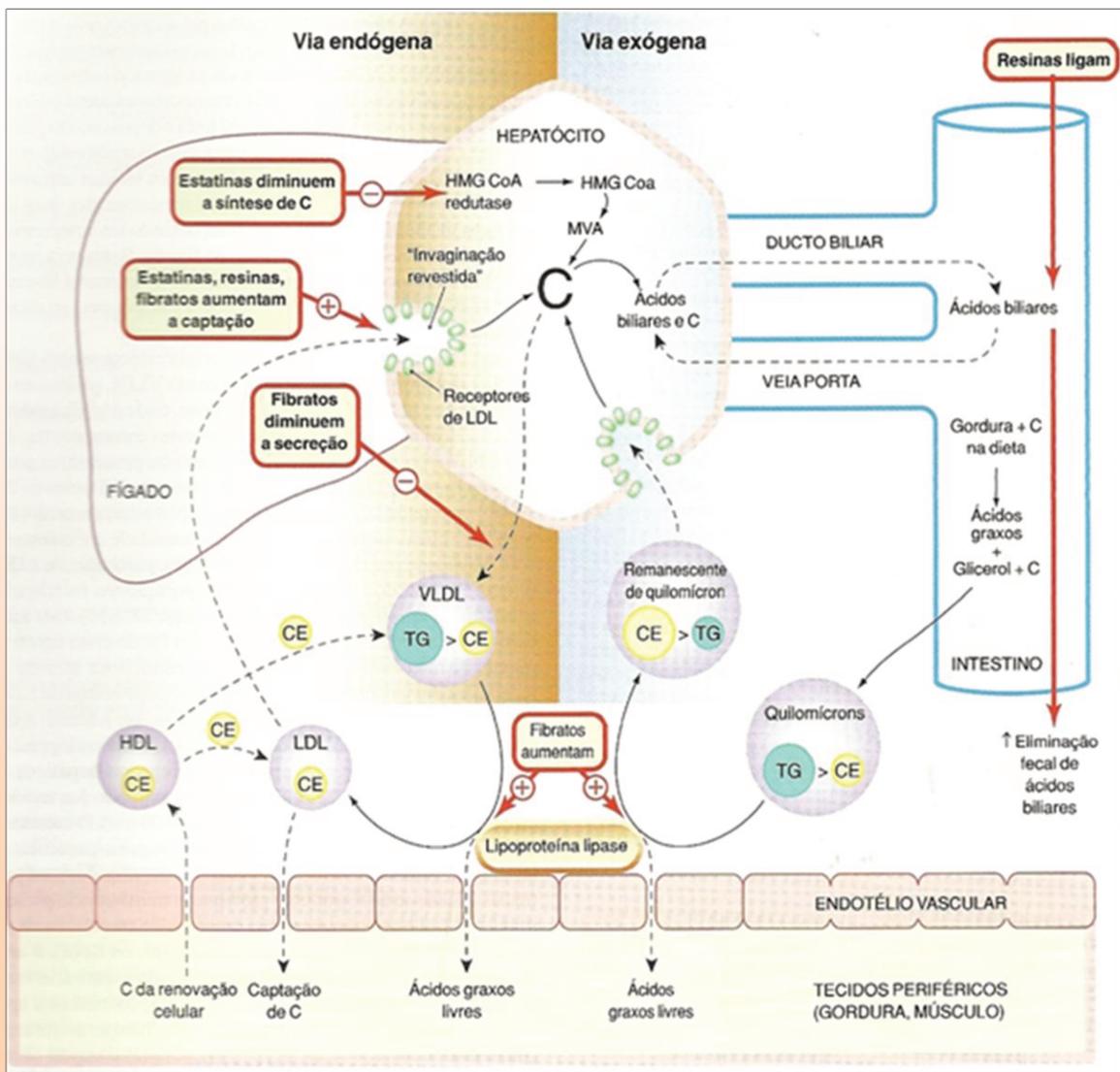


Figura 3. Diagrama esquemático do transporte de colesterol no organismo²³

1.8. Mecanismo de Ação

Até anos atrás, o mecanismo de ação do ciprofibrato ainda não estava amplamente esclarecido. Na última década, estudos moleculares revelaram que os fibratos ativam um grupo de receptores nucleares conhecidos como PPAR- α

(receptor proliferador ativador do peroxissoma / peroxisome proliferador activated receptors) ³⁶.

Esta ativação resulta em acentuada redução do VLDL circulante³⁶ e, por isso, de triglicérides, com redução discreta (aproximadamente 10%) do LDL e aumento discreto (aproximadamente de 10%) do HDL^{3,36-38}.

O mecanismo que o ciprofibrato ativa o PPRA- α foi proposto, por Martinsen e colaboradores em 2005, em um estudo realizado em ratos. Há um sinergismo entre o ciprofibrato e a célula G, localizada no antro gástrico, com a ativação do receptor PPAR alpha. Esta ativação vai aumentar a transcrição gênica para lipase de lipoproteínas e aumentar a captação hepática de LDL³⁶.

1.9. Método para Quantificação

Conforme a literatura, a quantificação de ciprofibrato data de 1992. As quantificações foram realizadas em plasma^{34,39}, soluções⁴⁰ e xarope⁴¹; todas determinadas por cromatografia líquida de alta performance.

No entanto, não havia método de quantificação de ciprofibrato em matriz biológica por cromatografia líquida de alta performance acoplada à espectrometria de massa.

2. Objetivos

- 2.1. Desenvolver metodologia analítica para quantificação de ciprofibrato em plasma por cromatografia líquida de alta performance, acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM/EM);
- 2.2. Demonstrar a técnica de cromatografia líquida de alta performance acoplada à espectrometria de massa (CLAE-EM/EM), com e sem o uso de padrão interno;
- 2.3. Estabelecer o perfil farmacocinético (C_{max}, ASC, T_{max},) do ciprofibrato após a administração de dose única 100mg, em voluntários sadios de ambos os sexos;
- 2.4. Estabelecer se há bioequivalência entre duas formulações de ciprofibrato de 100mg comprimido (Lipless - Biolab Sanus Farmacêutica Ltda x Oroxadin - Sanofi-Aventis).

3. Publicação

3.1. Artigo

Ciprofibrate quantification in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry for pharmacokinetic studies

**J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2011; 15;
879(24):2361-8.**



Ciprofibrate quantification in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry for pharmacokinetic studies

Fabiana D. Mendes^a, Lu Shi Chen^d, André Borges^d, Tainah Babadópulos^d, Jaime O. Ilha^d, Khalid M. Alkharfy^e, Gustavo D. Mendes^{b,c,d,*}, Gilberto De Nucci^{e,f}

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

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

^c Faculty of Odontology, University Camilo Castelo Branco (UNICASTELO), São Paulo, SP, Brazil

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

^e Department of Clinical Pharmacy, College of Pharmacy, King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia

^f Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 February 2011

Accepted 28 May 2011

Available online 12 June 2011

Keywords:

Ciprofibrate
Healthy volunteer
Plasma
Pharmacokinetic
HPLC–MS/MS

ABSTRACT

A rapid, sensitive and specific method for quantifying ciprofibrate in human plasma using bezafibrate as the internal standard (IS) is described. The sample was acidified prior extraction with formic acid (88%). The analyte and the IS were extracted from plasma by liquid–liquid extraction using an organic solvent (diethyl ether/dichloromethane 70/30 (v/v)). The extracts were analyzed by high performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS). Chromatography was performed using Genesis C18 4 μ m analytical column (4.6 \times 150 mm i.d.) and a mobile phase consisting of acetonitrile/water (70/30, v/v) and 1 mM acetic acid. The method had a chromatographic run time of 3.4 min and a linear calibration curve over the range 0.1–60 μ g/mL ($r > 0.99$). The limit of quantification was 0.1 μ g/mL. The intra- and interday accuracy and precision values of the assay were less than 13.5%. The stability tests indicated no significant degradation. The recovery of ciprofibrate was 81.2%, 73.3% and 76.2% for the 0.3, 5.0 and 48.0 ng/mL standard concentrations, respectively. For ciprofibrate, the optimized parameters of the declustering potential, collision energy and collision exit potential were –51 V, –16 eV and –5 V, respectively. The method was also validated without the use of the internal standard. This HPLC–MS/MS procedure was used to assess the bioequivalence of two ciprofibrate 100 mg tablet formulations in healthy volunteers of both sexes. The following pharmacokinetic parameters were obtained from the ciprofibrate plasma concentration vs. time curves: AUC_{last} , AUC_{0-168h} , C_{max} and T_{max} . The geometric mean with corresponding 90% confidence interval (CI) for test/reference percent ratios were 93.80% (90% CI = 88.16–99.79%) for C_{max} , 98.31% (90% CI = 94.91–101.83%) for AUC_{last} and 97.67% (90% CI = 94.45–101.01%) for AUC_{0-168h} . Since the 90% CI for AUC_{last} , AUC_{0-168h} and C_{max} ratios were within the 80–125% interval proposed by the US FDA, it was concluded that ciprofibrate (Lipless[®] 100 mg tablet) formulation manufactured by Biolab Sanus Farmacêutica Ltda. is bioequivalent to the Oroxadin[®] (100 mg tablet) formulation for both the rate and the extent of absorption.

© 2011 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Ciprofibrate belongs to the second generation of fibric acid derivatives [1] and is used to treat patients with dyslipidaemias of various types [2,3]. Ciprofibrate has been shown to reduce plasma triglycerides, total cholesterol and low-density lipoprotein

cholesterol, and increase plasma levels of high-density lipoprotein cholesterol [1–3]. The maximum concentration time is between 1 and 2.5 h and the long half life (80–100 h) permits daily dosing of the drug [1–5]. The maximum plasma concentration is between 66 and 88 μ g/mL after chronic administration of 100 mg/day of ciprofibrate [1,3,4]. Several analytical methods based on high-performance liquid chromatography (HPLC) in plasma [1,6], solution [7] and in pharmaceutical syrup [8] samples have been used for ciprofibrate quantification. Here, we describe a fast, sensitive, and specific method for quantification of ciprofibrate in human plasma using high-performance liquid chromatography

* Corresponding author at: 415 Jesuino Marcondes Machado Ave - Campinas, SP 13092-320, Brazil. Tel.: +55 19 3251 6928; fax: +55 19 3252 1516.
E-mail address: gugamendes@terra.com.br (G.D. Mendes).

coupled with tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS), using bezafibrate as an internal standard (I.S.). This HPLC–MS/MS procedure was used to assess the bioequivalence of two ciprofibrate 100 mg tablet formulations (Lipless® tablet 100 mg manufactured by Biolab Sanus Farmacêutica Ltda. and Oroxadin® tablet 100 mg manufactured by Sanofi-Aventis Farmacêutica) in healthy volunteers of both sexes.

2. Methods

2.1. Calibration standards and quality control

Stock solutions of ciprofibrate and internal standard (bezafibrate) were prepared in methanol–water (50:50, v/v) and methanol (100%) at concentrations of 1 mg/mL, respectively. Calibration curves of ciprofibrate were prepared by spiking blank plasma at concentrations of 0.1, 0.2, 0.5, 2, 10, 20, 40 and 60 µg/mL and the analysis was carried out in duplicate for each concentration. The quality control samples were prepared in blank plasma at concentrations of 0.3, 5.0 and 48.0 µg/mL (QCA, QCB, and QCC, respectively). The spiked plasma samples (standards and quality controls) were extracted from each analytical batch along with the unknown samples.

2.2. Chemicals and reagents

Ciprofibrate was provided by Heartwell International, British Virgin Island, lot number 100170-08005. Bezafibrate was obtained from Sigma, Switzerland, lot number 1412729. Acetonitrile (HPLC grade), methanol (HPLC grade), diethyl ether (Analytic Grade), dichloromethane (Analysis Grade), formic acid (88%; Analytic Grade) and acetic acid (88%; Analytic Grade) were purchased from Mallinckrodt (Paris, ST, USA). Ultra pure water was obtained from an Elga UHQ system (Elga, UK). Blank human blood was collected from healthy, drug-free volunteers. Plasma was obtained by centrifugation of blood treated with the anticoagulant sodium heparin. Pooled plasma was prepared and stored at –20 °C until needed.

2.3. Drug analysis

Blood samples (7 mL) from a suitable antecubital vein were collected at 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.33, 2.67, 3, 3.5, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 16, 24, 72, 120, 168 min post-dosing of reference or test ciprofibrate formulation. The blood samples were centrifuged at approximately 2000 × g for 1 min at 4 °C, and the decanted plasma stored at –20 °C until ciprofibrate analysis.

The extraction was performed by vortex-mixing 100 µL of each plasma sample, placed in glass tubes followed by the I.S. (50 µL of 5 µg/mL) and the samples vortex-mixed for 5 s. Formic acid (88%) was added (50 µL) to all tubes and the samples were vortex-mixed for 10 s. Diethyl ether/dichloromethane 70/30 (v/v) was then added (4 mL) to all tubes and performed the extraction by vortex-mixing for 40 s. The samples were centrifuged at 2000 × g for 2 min. The upper organic phase was transferred to another set of clean glass tubes and evaporated until dry under N₂ at 30 °C. The dry residues were dissolved with 1 mL of acetonitrile/water (50/50, v/v) by vortex-mixing for 40 s. The samples were centrifuged at 2000 × g for 5 min. The residues were transferred to 96-well plates using automatic pipettes with disposable plastic tips.

2.4. Chromatographic conditions

An aliquot (10 µL) of each plasma extract was injected into a Genesis C18 4 µm analytical column (4.6 × 150 mm i.d.). The compounds were eluted by with a mobile phase consisting of acetonitrile/water (70/30, v/v) and 1 mM acetic acid at a flow rate

of 1.2 mL/min. Under these conditions, typical standard retention times were 2.00 min for bezafibrate and 2.70 min for ciprofibrate, and back-pressure values of approximately 90–100 bar. The temperature of the auto-sampler was maintained at 15 ± 2 °C and the run-time was 3.0 min.

2.5. Mass-spectrometric conditions

The mass spectrometer (API 3000) equipped with an electrospray source using a cross-flow counter electrode in a negative mode (ES⁻), was set up in Multiple Reaction Monitoring (MRM) for the transitions of 287.00 > 85.00 and 360.10 > 274.00, for ciprofibrate and the I.S., respectively. Fig. 1 shows a full scan mass spectra of ciprofibrate in panel “A”, product ion spectra of ciprofibrate in panel “B”, full scan mass spectra of bezafibrate in panel “C”, and product ion spectra of bezafibrate in panel “D”. The source block temperature was set at 400 °C and the turboionspray capillary voltage to –2.5 kV. For both ciprofibrate and the I.S., the optimized parameters of the declustering potential, collision energy and collision exit potential were –51 V, –16 eV and –5 V, respectively. The corresponding values for bezafibrate were –51 V, –22 eV and –13 V, respectively. Data were acquired by Analyst software (1.4.1, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

2.6. Ion suppression

A procedure to assess the effect of ion suppression on the MS/MS was performed. The experimental set-up consisted of an infusion pump connected to the system by a “zero volume tee” before the split and the HPLC system pumping the mobile phase, which was the same as that used in the routine analysis of ciprofibrate, i.e. acetonitrile/water (50/50, v/v) by 1.2 mL/min. The infusion pump was set to transfer (50 µL/min) of a mixture of analyte and internal standard in mobile phase (both 50 µg/mL). A sample of human pooled blank plasma was extracted by the extraction procedure. The reconstituted extract was injected into the HPLC system while the standard mixture was being infused. In this system any ion suppression would be observed as a depression of the MS signal.

2.7. Method development

Linearity was determined to assess the performance of the method. A linear least-squares regression with a weighting index of 1/x was performed on the peak area ratios of ciprofibrate and the I.S. vs. ciprofibrate concentrations of the eight plasma standards (0.1, 0.2, 0.5, 2, 10, 20, 40 and 60 µg/mL) in duplicate to generate the calibration curve.

The recovery was evaluated by dividing the extracted sample mean by the unextracted (spiked blank plasma extract) sample mean of the corresponding concentration. The matrix effect experiments were performed using the ratio between spiked mobile phase solutions and unextracted samples, spiked on plasma residues.

Within- and between-run precision was determined as the relative standard deviation, $RSD(\%) = 100(SD/M)$, and the accuracy as the percentage relative error, $RE(\%) = (E - T)(100/T)$, where M is the mean, SD is the standard deviation of M , E is the experimentally determined concentration and T is the theoretical concentration.

2.8. Stability

Stability quality control plasma samples (0.3 and 48.0 µg/mL for ciprofibrate) were subjected to short-term (8 h 50 min) room temperature, four freeze/thaw (–20–25 °C) cycles, 52 h auto-sampler stability (15 °C) and long-term stability (140 days, –20 °C) tests.

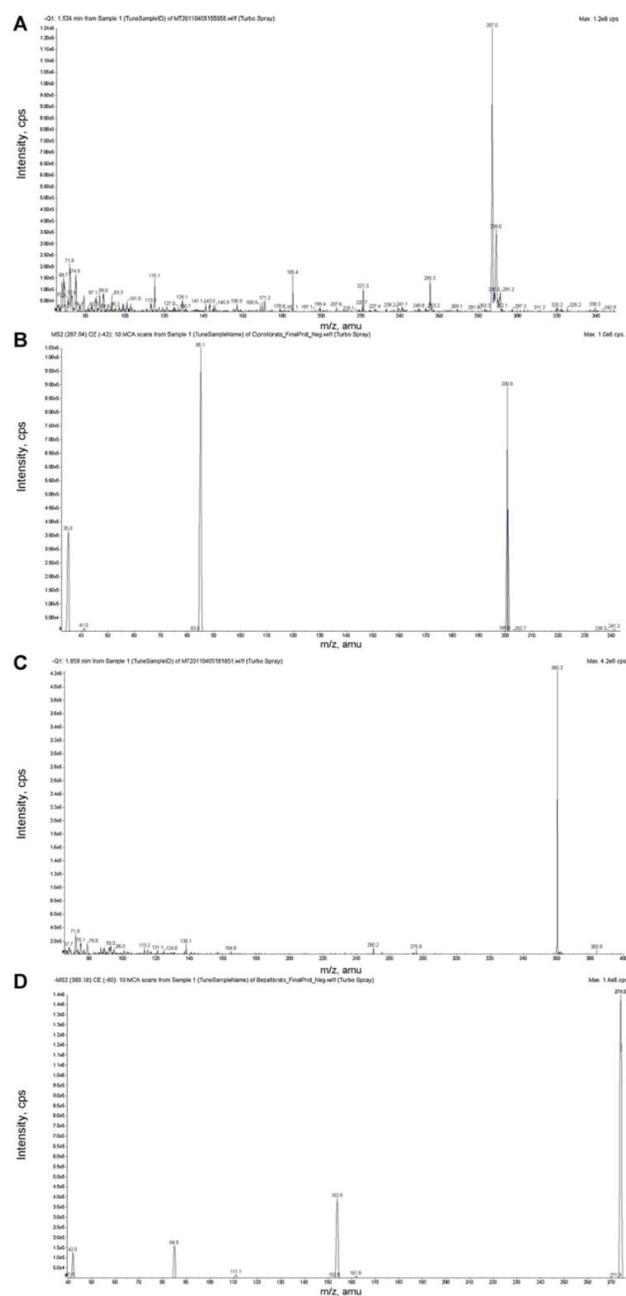


Fig. 1. Full scan mass spectra of ciprofibrate in panel "A", product ion spectra of ciprofibrate in panel "B", full scan mass spectra of bezafibrate in panel "C", product ion spectra of bezafibrate in panel "D".

Table 1

Accuracy and precision data for ciprofibrate from the pre-study validation in human plasma. The calculation was performed with and without the internal standard.

| Nominal concentration ($\mu\text{g/mL}$) | 0.1 | 0.3 | 5 | 48 |
|---|--------|--------|--------|-------|
| Intra-batch validation with/without IS ($n=7$) | | | | |
| Arithmetic mean ($\mu\text{g/mL}$) | 0.099 | 0.105 | 0.302 | 4.60 |
| Precision (%) | 7.90 | 6.98 | 7.44 | 2.55 |
| Accuracy (%) | 99.04 | 104.73 | 100.67 | 99.10 |
| Inter-batch validation with/without IS ($n=21$) | | | | |
| Arithmetic mean ($\mu\text{g/mL}$) | 0.102 | 0.11 | 0.305 | 4.97 |
| Precision (%) | 13.25 | 8.77 | 6.26 | 6.94 |
| Accuracy (%) | 101.54 | 107.60 | 101.73 | 99.84 |

Subsequently, the ciprofibrate concentrations were measured compared to freshly prepared samples. The significance of the results obtained was analyzed by Student's *t*-test ($p < 0.05$).

2.9. Clinical protocol

Twenty-eight healthy volunteers of both sexes, between 18 and 50 years of age and within 15% of the ideal body weight were selected for the study having their health status previously assessed by clinical evaluation (physical examination, ECG) and the following laboratory tests: blood glucose, urea, creatinine, AST, ALT, alkaline phosphatase, γ -GT, total bilirubin, albumin and total protein, triglyceride, total cholesterol, hemoglobin, hematocrit, total and differential white cell counts, and routine urinalysis. All subjects were negative for HIV, HCV and HBV (except for serological scar).

The study began with 28 volunteers and finished with 22 volunteers. Six volunteers dropped out of the study for personal reasons. The volunteers ($n=28$) had the following clinical characteristics (according to gender and expressed as mean \pm SD [range]): males: age: 28.36 ± 7.61 [20.00–45.00], height: 1.74 ± 0.08 m [1.64–1.90], body weight: 75.21 ± 12.00 [54.50–98.00]; females: age: 30.29 ± 8.80 [22.00–47.00], height: 1.63 ± 0.08 [1.51–1.75],

body weight: 60.94 ± 8.45 [50.00–79.60]. All subjects provided written informed consent and the Ethical Committee of the State University of Campinas – Unicamp approved the clinical protocol. The study was conducted in accordance with the provisions of the Declaration of Helsinki (1964), Tokyo (1975), Venice (1983), Hong Kong (1989), Somerset West (1996) and Edinburgh (2000) revisions. After a screening and washout period (of at least 2 weeks), individuals who qualified were confined for 2 periods of approximately 36 h.

The study was a single dose, two-period randomized design with at least a 30-day washout period between doses. During each period, the volunteers were hospitalized at 05:00 p.m. In order to evaluate their adherence to the requirements of the clinical protocol, volunteers received specialized assistance and care during all treatment periods, which included a brief investigation of their conditions upon confinement and at time of discharge. Standard meals were administered at 07:00 p.m. (dinner) and 10:00 p.m. (snack). After an overnight fast (approximately 8 h), subjects received an oral dose of ciprofibrate (100 mg of either formulation) at approximately 6:00 a.m. The following formulations were employed: Liplless[®] (ciprofibrate) tablet 100 mg (test formulation manufactured by Biolab Sanus Farmacêutica Ltda.; lot N^o 906071, expiration: 06/2011) and Oroxadin[®]

Table 2

Stability tests for ciprofibrate.

| Post-processing stability test (8 h 50 min; $\mu\text{g/mL}$) | | | | | | |
|--|--------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| ($n=5$) | Reference values Low sample | Values after 52 h | Reference values Medium sample | Values after 52 h | Reference values High sample | Values after 52 h |
| Arithmetic Mean | 0.276 | 0.291 | 4.49 | 4.7 | 45.6 | 47.8 |
| CV (%) | 4.1 | 4.8 | 1.3 | 2.4 | 1.1 | 3.7 |
| Variation | 5.4 | | 4.7 | | 4.8 | |
| Freeze-and-thaw stability test (20–25 °C; $\mu\text{g/mL}$) | | | | | | |
| ($n=5$) | Reference values Low sample | Values after 4 cycles | Reference values Medium sample | Values after 4 cycles | Reference values High sample | Values after 4 cycles |
| Arithmetic Mean | 0.292 | 0.326 | 4.59 | 4.88 | 47.8 | 48 |
| CV (%) | 7.3 | 4.3 | 3.9 | 13.8 | 2.4 | 5.4 |
| Variation | 11.6 | | 6.3 | | 0.4 | |
| Short-term stability test (52 h; $\mu\text{g/mL}$) | | | | | | |
| ($n=5$) | Reference values Low sample | Values after 8 h 50 min h | Reference values Medium sample | Values after 8 h 50 min h | Reference values High sample | Values after 8 h 50 min h |
| Arithmetic Mean | 0.292 | 0.331 | 4.59 | 5 | 47.8 | 46.6 |
| CV (%) | 7.3 | 4.2 | 3.9 | 1.1 | 2.4 | 0.7 |
| Variation | 13.4 | | 8.9 | | –2.5 | |
| Long-term stability test (140 days; –20 °C; $\mu\text{g/mL}$) | | | | | | |
| ($n=5$) | Reference values Low sample | Values after 140 days | Reference values Medium sample | Values after 140 days | Reference values High sample | Values after 140 days |
| Arithmetic Mean | 0.293 | 0.266 | 4.4 | 4.06 | 47.5 | 42.2 |
| CV (%) | 1.7 | 3.4 | 8.3 | 4.6 | 5.7 | 3.5 |
| Variation | –9.2 | | –7.7 | | –11.2 | |

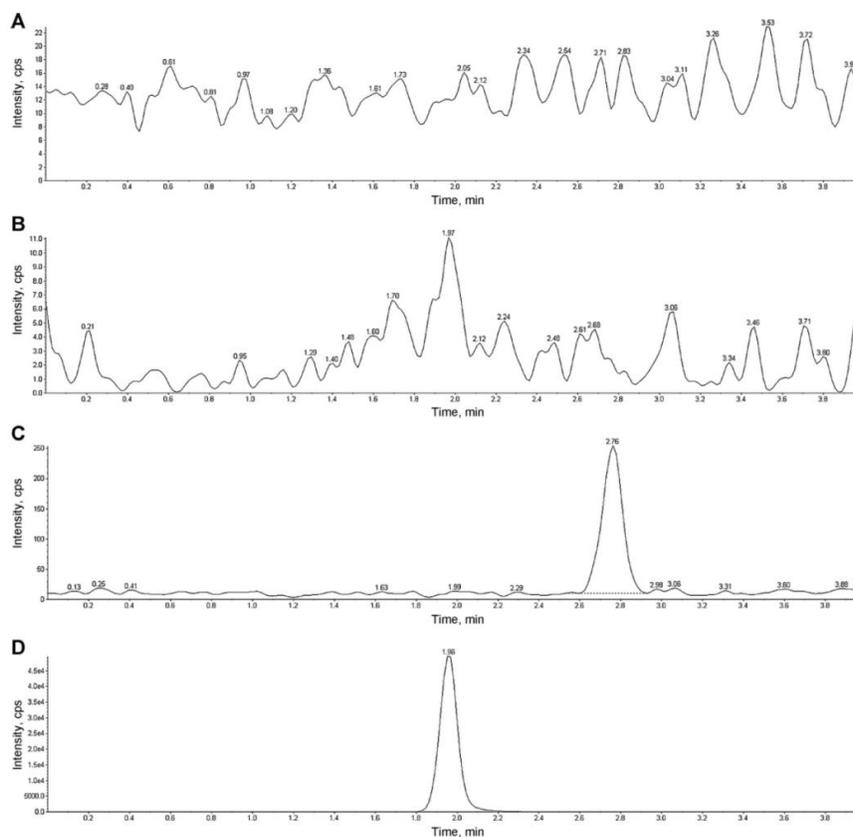


Fig. 2. MRM chromatograms of blank normal human plasma: ("A") ciprofibrate and ("B") bezafibrate; MRM chromatograms of the LOQ: ("C") ciprofibrate and ("D") bezafibrate.

(ciprofibrate) tablet 100 mg (standard reference formulation manufactured by Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda., lot N° L805879, expiration date 08/2011). Water (200 mL) was given immediately after the drug administration. All volunteers were required to remain fasting for 2 h after dose administration, when a xanthine-free standard breakfast was available. A xanthine-free standard lunch was provided after five (lunch), eight (afternoon snack),

twelve (lunch) and fifteen (dinner) hours after dose. After the 10 h blood withdrawal a standardized meal (breakfast) was served, and volunteers were discharged following a medical evaluation. A standard meal (lunch) consisting of rice, beans, vegetables, and fried chicken plus a fruit as dessert was consumed. A morning, afternoon and evening snack was also provided including crackers, bread, jelly, cakes and apples. No other food was per-

Table 3

Mean pharmacokinetic parameters obtained from 22 volunteers after administration of reference and test ciprofibrate (100 mg) formulations.

| Variable | Unit | N | Mean | SD | Min | Max | CV% |
|----------------------|-------------|----|--------|--------|--------|---------|-------|
| Reference | | | | | | | |
| AUC ₀₋₁₆₈ | ([µg h]/mL) | 22 | 840.15 | 147.13 | 481.62 | 1105.76 | 17.51 |
| AUC _{last} | ([µg h]/mL) | 22 | 838.06 | 154.41 | 424.49 | 1108.66 | 18.42 |
| C _{last} | (µg/mL) | 22 | 2.05 | 0.61 | 0.89 | 3.53 | 29.46 |
| C _{max} | (µg/mL) | 22 | 22.35 | 4.64 | 16.00 | 32.30 | 20.75 |
| T _{last} | (h) | 22 | 166.02 | 10.31 | 119.88 | 169.03 | 6.21 |
| T _{max} | (h) | 22 | 1.67 | 0.76 | 0.50 | 3.50 | 45.21 |
| Test | | | | | | | |
| AUC ₀₋₁₆₈ | ([µg h]/mL) | 22 | 818.58 | 164.65 | 504.11 | 1246.60 | 20.11 |
| AUC _{last} | ([µg h]/mL) | 22 | 819.20 | 164.82 | 504.02 | 1246.26 | 20.12 |
| C _{last} | (µg/mL) | 22 | 1.92 | 0.66 | 0.91 | 3.35 | 34.58 |
| C _{max} | (µg/mL) | 22 | 20.93 | 4.33 | 14.20 | 29.40 | 20.69 |
| T _{last} | (h) | 22 | 168.27 | 0.57 | 167.27 | 169.80 | 0.34 |
| T _{max} | (h) | 22 | 1.74 | 0.67 | 0.75 | 2.67 | 38.73 |

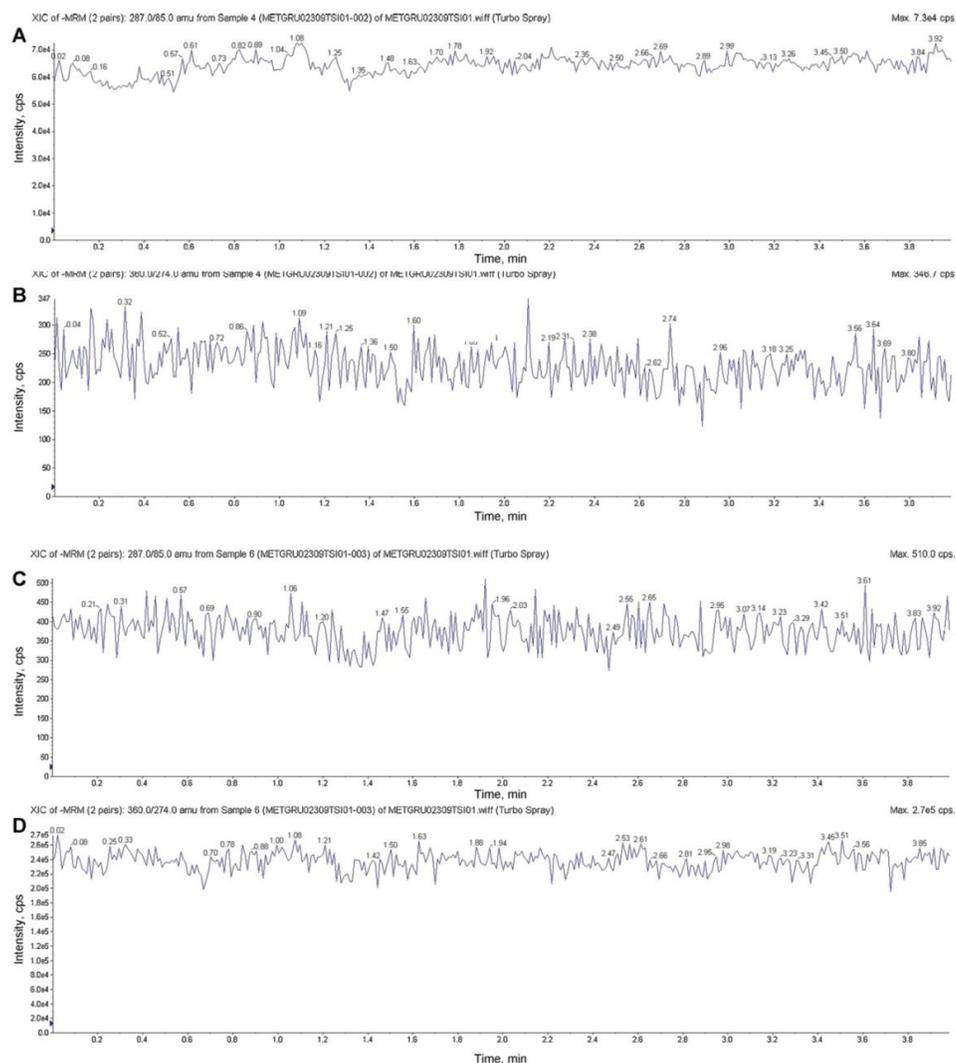


Fig. 3. Ion suppression procedure: (A) Ciprofibrate and (B) Bezafibrate sample injection.

mitted during the “in-house” period and liquid consumption was allowed *ad libitum* after lunch (with the exception of xanthine-containing drinks, including tea, coffee, and cola). At time intervals, systolic and diastolic arterial pressure (measured non-invasively with a sphygmomanometer), heart rate and temperature were recorded.

3. Pharmacokinetic and statistical analysis

Bioequivalence between the two formulations was assessed by calculating individual test/reference ratios for the peak of concentration (C_{max}), area under curve (AUC) of plasma concentration

until the last concentration observed (AUC_{last}) and area under curve (AUC) of plasma concentration until 168 h (AUC_{0-168h}). The C_{max} and the time taken to achieve this concentration (T_{max}) were obtained directly from the curves. The areas under the ciprofibrate plasma concentration vs. time curves were calculated by applying the linear-log trapezoid rule. The AUC_s and C_{max} data for the two formulations were analyzed by ANOVA to establish whether the 90% CI of the ratios was within the 80–125% interval, indicating bioequivalence as proposed by the US Food and Drug Administration. The software used included WinNonlin Professional Network Edition (Pharsight v. 5.3), Microsoft Excel (v. 7.0) and GraphPad Prism (v. 3.02).

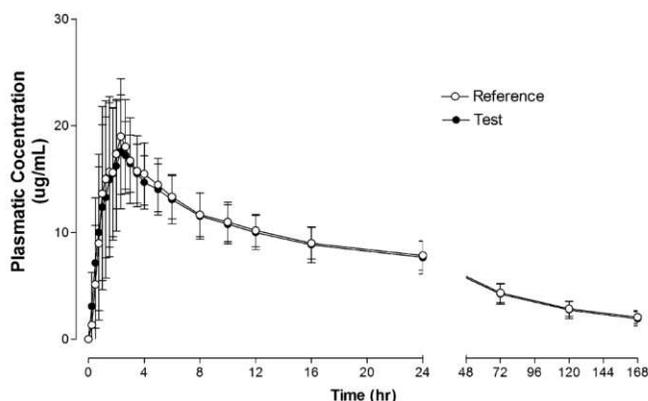


Fig. 4. Ciprofibrate plasma mean concentrations (SD) vs. time profile obtained after oral administration of 100 mg of ciprofibrate formulation.

4. Results and discussion

The calibration curve was linear over a range of 0.1–60 $\mu\text{g/mL}$ of ciprofibrate concentrations (calibration curve equation: $0.0655 \times x - 0.000448$, $r > 0.99$).

The recovery of ciprofibrate was 81.2%, 73.3% and 76.2% for the 0.3, 5.0 and 48.0 ng/mL standard concentrations, respectively. The recovery of internal standard was 94% for 5.0 $\mu\text{g/mL}$ standard concentration. The limit of quantification (LOQ), defined as the lowest concentration at which both the precision and accuracy were <20%, was 0.1 $\mu\text{g/mL}$. The within- and between-run precision and accuracy (with and without internal standard) for the LOQ and QCs are summarized in Table 1. The stability tests indicated no significant degradation under the described conditions (Table 2).

No endogenous peak was observed in the mass chromatogram of blank plasma. The mass chromatograms of a sample are shown in Fig. 2, in which the retention times of both ciprofibrate and bezafibrate were 2.70 and 2.00, respectively. In the case of ciprofibrate

and its internal standard, bezafibrate, there was no significant ion suppression in the region where the analyte and internal standard are eluted as shown in Fig. 3.

This is the first HPLC–MS/MS method developed for measuring ciprofibrate in human plasma. Ciprofibrate has been determined in plasma (LLOQ 0.25 $\mu\text{g/mL}$, RT 4.9 min, run-time 17 min) [1,6] and in pharmaceutical syrup (LLOQ 0.049 $\mu\text{g/mL}$, RT 4.9 min, run-time 16 min) [7,8] by high-performance liquid chromatography. Our method has good sensitivity (LLOQ of 0.1 $\mu\text{g/mL}$) and can be carried out in a short time (run time 3 min), permitting a high throughput. Furthermore, this method involves a very simple liquid–liquid extraction.

Internal standards are routinely used in bioanalytical methods and LC–MS–MS has enough selectivity to allow the use of deuterated standards. However, these standards are expensive and not easily available. Thus, they are commonly replaced by structurally related compounds. Considering that the extraction procedures for LC–MS–MS bioanalysis are very simple (protein precipitation is

Table 4

Geometric mean of the individual AUC_{last} , AUC_{inf} , and C_{max} ratios (test/reference), the respective 90% confidence intervals (CIs) and CVs.

| Ciprofibrate/Oroxadin 100 mg ($n = 22$) | Ciprofibrate | | | |
|--|------------------------|--------------|--------|------------------|
| | Parametric analysis | | | |
| | Geom. mean | 90% CI | Power | Intra-subject CV |
| C_{max} | 93.80 | 88.16–99.79 | 0.9999 | 11.90% |
| AUC_{last} | 98.31 | 94.91–101.83 | 1.0000 | 6.75% |
| $AUC_{0-168\text{h}}$ | 97.67 | 94.45–101.01 | 1.0000 | 6.44% |
| Ciprofibrate/Oroxadin 100 mg ($n = 8$) | Ciprofibrate – Males | | | |
| | Parametric analysis | | | |
| | Geom. mean | 90% CI | Power | Intra-subject CV |
| C_{max} | 101.02 | 90.56–112.69 | 0.9558 | 10.92% |
| AUC_{last} | 100.70 | 96.54–105.04 | 0.9999 | 4.21% |
| $AUC_{0-168\text{h}}$ | 100.68 | 96.56–104.97 | 0.9999 | 4.16% |
| Ciprofibrate/Oroxadin 100 mg ($n = 14$) | Ciprofibrate – Females | | | |
| | Parametric analysis | | | |
| | Geom. mean | 90% CI | Power | Intra-subject CV |
| C_{max} | 89.79 | 82.85–97.32 | 0.9959 | 11.99% |
| AUC_{last} | 96.45 | 91.83–101.30 | 0.9999 | 7.29% |
| $AUC_{0-168\text{h}}$ | 95.57 | 91.26–100.09 | 0.9999 | 6.86% |

routinely employed), it should be asked whether the use of a structurally related internal standard is really required or advisable. The method described above validated well (if not better) without the use of the internal standard. Whether this approach applies to other bioanalytical methods should be further investigated.

The ciprofibrate was well tolerated at the administered doses and no significant adverse reactions were observed or reported. A total of four adverse events were reported during the study, three of them were considered probably related to the administration of ciprofibrate (headache). The other adverse event was low hemoglobin (10.8 g/dL) in one female. The biochemical parameters presented no clinically relevant alterations.

The mean ciprofibrate plasma concentrations vs. time profiles after oral dose (100 mg) of ciprofibrate is shown in Fig. 4. Table 3 shows the mean pharmacokinetic parameters obtained from 22 volunteers after the administration of 100 mg ciprofibrate. Table 4 shows geometric mean of the individual C_{max} , AUC_{last} and AUC_{inf} (test/reference formulation), the respective 90% confidence intervals CI power, intra-subject CV for the 22 volunteers and by gender (male and female).

After oral administration of the ciprofibrate (100 mg) tablets to the volunteers, the peak plasma concentrations (C_{max}) and area under curve (AUC) of ciprofibrate were equivalent between the formulations (Table 4). In Table 4, we demonstrated that is possible bioequivalence using 8–14 volunteers and that there is no difference between genders was observed.

Since the 90% CI for C_{max} , AUC_{last} and AUC_{0-168h} ratios were all within the 80–125% interval proposed by the US Food and Drug Administration Agency, it was concluded that ciprofibrate formulation (Lipless® 100 mg tablet) produced by Biolab Sanus Farmacêutica Ltda. is bioequivalent to Oroxadin® formulation for both the rate and the extent of absorption [9,10].

Acknowledgements

The bioequivalence trial was paid by Biolab Sanus Farmacêutica Ltda. We wish to thank AcademicEnglishSolutions.com for revising the English.

References

- [1] J.P. Desager, Y. Horsmans, C. Vandenplas, C. Harvengt, *Atherosclerosis* 124 (1996) 65.
- [2] D.B. Miller, J.D. Spence, *Clin. Pharmacokinet.* 34 (1998) 155.
- [3] D.J. Batteridge, *Postgrad. Med. J.* 69 (1993) 42.
- [4] G. Turpin, E. Bruckert, *Atherosclerosis* 124 (1996) 83.
- [5] N. Ferry, N. Bernard, N. Pozet, E. Gardes, G. Cuisinaud, M. Labeeuw, P.Y. Zech, J. Sassard, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 28 (1989) 675.
- [6] L.D. Masnatta, L.A. Cuniberti, R.H. Rey, J.P. Werba, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 13 (1996) 437.
- [7] N.H. Anderson, D. Johnston, P.R. Vojvodic, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 10 (1992) 501.
- [8] E. Kublin, B. Kaczmarek-Graczyk, E. Malanowicz, A.P. Mazurek, *Acta Pol. Pharm.* 67 (2010) 455.
- [9] US Food and Drug Administration (1993) 6501.
- [10] US Food and Drug Administration (1998) 64222.

4. Discussão

A curva de calibração foi linear ao longo de um intervalo de 0,1µg/mL - 60µg/mL. Nosso método de extração utilizado foi à extração líquido-líquido. A recuperação do ciprofibrato foi de 81,2%, 73,3% e 76,2% para as concentrações padrões de ciprofibrato de 0,3µg/mL, 5,0µg/mL e 48,0µg/mL, respectivamente. A recuperação de padrão interno (bezafibrato) foi de 94% para a concentração padrão de 5,0µg/mL.

O limite de quantificação inferior, que é a menor concentração do ciprofibrato que o método foi capaz de quantificar com precisão e exatidão aceitáveis (<20%), foi de 0,1µg/mL.

A precisão e acurácia intra e intercorrida analítica, com e sem padrão interno, não variaram mais do que 15%, demonstrando que o método validado para a quantificação das amostras tem confiabilidade e reprodutibilidade, independente do uso ou não de padrão interno.

Os testes de estabilidade não indicaram degradação. Após todos os testes, estabilidade de curta e longa duração, estabilidade de congelamento e

descongelamento e estabilidade na condição de análise, as amostras não apresentaram degradação maior que 15% (exceção ao LIQ 20%).

Este é o primeiro método de HPLC MS/MS para quantificação de ciprofibrato. Ciprofibrato foi quantificado por HPLC, sem espectrometria de massa, em plasma (LLOQ 0.25 µg/mL, RT 4,9 min e tempo de corrida de 17 min)^{34,39} e em xarope (LLOQ 0,049µg/mL, RT 4,9 min e tempo de corrida de 16 min)^{40,41}.

Com relação à metodologia analítica empregada, nosso método, quando comparado com a literatura, demonstrou maior especificidade/sensibilidade (LLOQ de 0,1µg/mL) e maior rapidez na análise das amostras (RT 2,7 min e tempo de corrida de 4 min).

Nosso estudo comparado a um método realizado na mesma matriz biológica (plasma), quantificado por HPLC, sem espectrometria de massa, apresentou uma sensibilidade superior e um tempo de corrida quatro vezes menor do que o da literatura, implicando ser quatro vezes mais rápido na análise das amostras.

Existe outro método de quantificação do ciprofibrato por HPLC, sem espectrometria de massa, com limite inferior menor que o nosso. No entanto, para o nosso estudo, este método não é relevante, porque foi realizado em xarope e não em plasma humano.

Em geral, o ciprofibrato foi bem tolerado. Um total de quatro eventos adversos foi relatado durante o estudo, três voluntários apresentaram cefaléia,

provavelmente correlacionada com a administração do ciprofibrato, e uma voluntária apresentou nível baixo de hemoglobina (Hb de 10,8g/dl), provavelmente devido ao período menstrual concomitante. Nos parâmetros bioquímicos não houve alteração clinicamente relevante.

5. Conclusões

- 5.1.** O método desenvolvido por CLAE-MS/MS é simples, específico, seletivo e rápido para a quantificação de ciprofibrato em plasma humano, e pode ser usado para estudos de farmacocinética e de bioequivalência do ciprofibrato.
- 5.2.** A metodologia para quantificação do ciprofibrato sem padrão interno validou da mesma forma do que com padrão interno, e de acordo com os critérios estabelecidos pela Anvisa e FDA.
- 5.3.** Não houve diferença estatística entre os sexos. A análise estatística, por sexo, permite aferir que futuros estudos de bioequivalência, para ciprofibrato, possam ser realizados com número de voluntários menor do que 28, o estabelecido no nosso estudo. Nossa sugestão, é que o número de voluntários seja de 14, uma vez que, a ANVISA estabelece um mínimo de 12 voluntários para estudo de bioequivalência.
- 5.4.** Com relação a intercambialidade das formulações testadas pode-se concluir que a formulação Liplless, 100mg comprimido, elaborada por Biolab Sanus Farmacêutica Ltda é bioequivalente a formulação

Oroxadin, 100mg comprimido, do laboratório Sanofi-Aventis, para a velocidade e extensão de absorção.

6. Referências Bibliográficas

1. Turpin G, Bruckert E. Efficacy and safety of ciprofibrate in hiperlipoproteinaemias. *Atherosclerosis* 1996; 124(suppl):S83-S87.
2. Merck Index. Ciprofibrate. 13^a.ed. New Jersey: Merck & CO. Inc., 2001.402p.
3. Diament J, Forti N, Giannini SD. Fibratos: semelhanças e diferenças. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 1999; 1:83-91.
4. Tikkanen MJ. Fibric acid derivatives. *Curr Opin Lipidol* 1992 3(2):29-33.
5. Belalcazar LM, Ballantyne CM. Defining specific goals of therapy in treating dyslipidemia in the patient with low high-density lipoprotein cholesterol. *Prog Cardiovasc Dis* 1998; 41(2):151-74.
6. III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SOCESP) 2001.
7. Chapman MJ. Fibrates in 2003: therapeutic action in atherogenic dyslipidaemia and future perspectives. *Atherosclerosis* 2003; 171(1):1-13.
8. Steiner G. Fibrates and coronary risk reduction. *Atherosclerosis* 2005; 182(2):199-207.

9. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. Eliminação e farmacocinética de fármacos. In: Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. Farmacologia. 6^a edição. Rio de Janeiro: Editora Elsevier. 2007. p.113-27.
10. Xavier, HT. Farmacologia do fibratos. Arq Bras Cardiol 2005; 85(5):15-6.
11. Liplless: comprimido. Responsável técnico: do Laboratório Biolabfarma. Bula de remédio.
12. Oroxadin: comprimido. Responsável técnico: Antonia A Oliveira. Suzano: Laboratório Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda. Bula de remédio.
13. Betteridge DJ. Ciprofibrate: a profile. Postgrad Med J 1993; 69(Suppl1):S42
14. Brown DF, Beyler A, Daudiss K. Effective therapy in type II hyperlipoproteinaemia with a new long acting drug ciprofibrate. Am J Cardiol 1979; 43(2):409.
15. Cattin L, Da Col PG, Feruglio FS, Finazzo L, Rimondi S, Descovich GC et al. Efficacy of ciprofibrate in primary type II and IV hyperlipidaemia: the Italian multicenter study. Clin Ther 1990,12(6):482-8.
16. Dairou F, Regy C. Ciprofibrate multicentric study in 6.812 hyperlipidaemic patients. Florence: 9th Int Symp Drugs Lipid Metab, 1986; 62.
17. De Gennes JL, Truffert J, Dairou F. Evaluation of the serum lipid lowering effect and tolerance of ciprofibrate. Scm H6p Paris 1985; 61:2807
18. Illingworth DR, Olsen GD, Cook SF, Sexton CJ, Wendel HA, Connor WE. Ciprofibrate in the therapy of type II hypercholesterolemia. A double-blind trial. Atherosclerosis 1982; 44(2):211-21.

19. Oro L, Carlson LA, Olsson A, Poole PH. Long term efficacy and safety of ciprofibrate in patients with primary hyperlipidemia. *Curr Ther Res* 1992; 91 (Suppl):S21-8.
20. Rouffy J, Chanu B, Aubert I, Djian F. Effects of ciprofibrate on lipid, lipoprotein and apoprotein levels and Achilles tendon xanthoma diameters: on the basis of ten cases of severe hypercholesterolaemia with tendon xanthoma. *Scm H6p Paris* 1988; 64(2):2357-9.
21. Schifferdecker E, Rosak C, Schoffiing K. Long term treatment with the lipid lowering agent ciprofibrate. *Ann Int Med* 1984; 1:107
22. Ferry N, Bernard N, Pozet N, Gardes E, Cuisinaud G, Labeeuw M, et al. The influence of renal insufficiency and haemodialysis on the kinetics of ciprofibrate. *Br J Clin Pharmacol.* 1989; 28(6):675-81.
23. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. Aterosclerose e Metabolismo das Lipoproteínas In: Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. *Farmacologia*. 6ª edição. Rio de Janeiro. Editora Elsevier. 2007. p.321-30.
24. Miller DB, Spence JD. Clinical pharmacokinetics of fibric acid derivatives (fibrates). *Clin Pharmacokinet.* 1998; 34(2):155-62.
25. Bays HE, Dujovne CA. Drug interactions with lipid altering drugs. *Drug Saf.* 1998; 19(5):355-71.
26. Wells PS, Holbrook AM, Crowther NR, Hirsh J. Interactions of warfarin with drugs and food. *Ann Intern Med* 1994; 121(9):676-83.
27. Izar MCO, Kasinski N, Fonseca FAH. Dislipidemias: Diagnóstico e Tratamento In: Serrano CV, Timerman A, Stefanini E. *Tratado de Cardiologia SOCESP*. 2ª edição. Editora Manole. 2005. p.562-83.

28. Olsson A. Efficacy, long term tolerance and persistence of the effects of ciprofibrate. *J Am Med Assoc* 1987(Suppl):4.
29. Blane GF. Comparative toxicity and safety profile of fenofibrate and other fibric acid derivatives. *Am J Med* 1987; 83(5B):26-36.
30. Baglin A, Lasserre N, Prinseau J, Lebas M. Rhabdomyolysis under treatment with ciprofibrate during a nephrotic syndrome. *Therapie* 1987; 42(2):247-8.
31. Bourrier P, Subra JF, Cbennebault JM, Speisser R, Laine P. Toxic myopathy due to hypolipidaemic agents. *Therapie* 1990; 45(2):360.
32. Wu J, Song Y, Li H, Chen J. Rhabdomyolysis associated with fibrate therapy: review of 76 published cases and a new case report. *Eur J Clin Pharmacol* 2009; 65(12):1169-74.
33. Angelin B, Einarsson K, Leijd B. Effect of ciprofibrate treatment on biliary lipids in patients with hyperlipoproteinaemia. *Eur J Clin Invest* 1984; 14(1):73-8.
34. Desager JP, Vandenplas HC, Harvengt C. Pharmacodynamic activity of lipoprotein lipase and hepatic lipase, and pharmacokinetic parameters measured in normolipidaemic subjects receiving ciprofibrate (100 or 200mg/day) or micronized fenofibrate (200mg/day) therapy for 23 days. *Atherosclerosis*. 1996; 124(Suppl):S65-73.
35. Davison C, Benziger D, Fritz A, Edelson J. Absorption and disposition of 2-[4-(2,2-dichlorocyclopropyl)-phenoxy]-2-methylpropanoic acid, WIN 35.833, in rats, monkeys and men. *Drug Metab Dispos*. 1975; 3(6):520-4.
36. Martinsen TC, Bakke I, Chen D, Sandvik AK, Zahlsten K, Aamo T et al. Ciprofibrate stimulates the gastrin-producing cell by acting luminally on antral PPAR- α . *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005; 289(6):G1052-60.

37. Tikkanen MJ. Fibric acid derivatives. *Curr Opin Lipidol* 1992; 3(2):29-33.
38. Gervois P, Torra IP, Fruchart JC, Stales B. Regulation of lipid and lipoprotein metabolism by PPAR activators. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38(1):3-11.
39. Masnatta LD, Cuniberti LA, Rey RH, Werba JP. Determination of bezafibrate, ciprofibrate and fenofibric acid in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996; 687(2):437-42.
40. Anderson NH, Johnston D, Vojvodic PR. The enantiomeric resolution of ciprofibrate and related compounds by HPLC using chiral stationary phases. *J Pharm Biomed Anal* 1992; 10(7):501-5.
41. Kublin E, Kaczmarska-Graczyk B, Malanowicz E, Mazurek AP. Methods of chromatographic determination of medicines decreasing the level of cholesterol. *Acta Pol Pharm* 2010; 67(5):455-61.

7. Anexos

7.1. Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

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

CEP, 28/04/09.
(Grupo III)

PARECER CEP: N° 279/2009 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 1090.0.000.146-09

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "ESTUDO DE BIODISPONIBILIDADE COMPARATIVA DE UMA FORMULAÇÃO DE TESTE (LIPLESS [CIPROFIBRATO] - COMPRIMIDO - 100 MG; BIOLAB SANUS FARMACÊUTICA LTDA.) VERSUS UMA FORMULAÇÃO DE REFERÊNCIA (OROXADIN [CIPROFIBRATO] - COMPRIMIDO - 100 MG; SANOFI-AVENTIS) EM VOLUNTÁRIOS SADIOS DE AMBOS OS SEXOS" (GDN 003/09).
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Gilberto de Nucci
INSTITUIÇÃO: ADHESP
APRESENTAÇÃO AO CEP: 08/04/2009
APRESENTAR RELATÓRIO EM: 28/04/10 (O formulário encontra-se no site acima)

II - OBJETIVOS

Avaliar comparativamente a biodisponibilidade de dois produtos (teste e referência) a fim de determinar se são bioequivalentes.

III - SUMÁRIO

É um estudo aberto, aleatorizado, cruzado, balanceado, com 2 tratamentos, 2 períodos, onde 28 voluntários de ambos os sexos, com idade entre 18 e 50 anos, recebem, em cada período distinto, o medicamento teste ou o medicamento referência, havendo por conseguinte dois braços de tratamento. As formulações são administradas em dose única, via oral, em jejum, seguidos de coletas de sangue. Planeja-se um intervalo mínimo de 30 dias entre as administrações.

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 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, resolve aprovar sem

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-857 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

- 1 -



restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

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 IV Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de abril de 2009.


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

7.2. Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Estudo de Biodisponibilidade Comparativa de uma Formulação de Teste (Lipless [Ciprofibrato] - comprimido - 100 mg; Biolab Sanus Farmacêutica Ltda.) *versus* uma Formulação de Referência (Oroxadin [Ciprofibrato] - comprimido - 100 mg; Sanofi-Aventis) em Voluntários Sadios de ambos os sexos.

Protocolo número 003/09

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.

Responsável: Prof. Dr. Gilberto De Nucci

O abaixo-assinado, anos, RG nº declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, de responsabilidade do médico/pesquisador Prof. Dr. Gilberto De Nucci (Galeno Desenvolvimento de Pesquisas Ltda). O abaixo-assinado está ciente que:

NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO

O objetivo da pesquisa é verificar se a formulação teste (Lipless [Ciprofibrato] - comprimido - 100mg; Biolab Sanus Farmacêutica Ltda.) atinge níveis no sangue, equivalentes a formulação referência (Oroxadin [Ciprofibrato] - comprimido - 100mg; Sanofi-Aventis). Você receberá as duas medicações, cada uma em uma ocasião diferente. A ordem que você tomará cada medicação obedecerá a um sorteio.

O ciprofibrato é um medicamento (remédio) indicado para o tratamento da hiperlipidemia (excesso de gordura no sangue).

PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS E RESPONSABILIDADES

Antes de sua participação no estudo e após a sua participação você será convidado a ir até a Unidade Ambulatorial para avaliar a sua condição de saúde. Você será examinado por um médico que lhe fará um exame completo, medindo o seu pulso, sua temperatura, sua pressão arterial. Também será feito um exame do coração (eletrocardiograma). O médico lhe perguntará se você teve ou tem alguma doença e se você faz uso de algum medicamento. Após a consulta médica o voluntário será encaminhado para coleta de exames laboratoriais em laboratório conveniado. Os exames laboratoriais incluem exame de sangue completo como hemograma completo; bioquímica sangüínea (glicose no sangue, proteínas totais, transaminases oxalacética e pirúvica, gamaglutamil transferase, creatinina, uréia, ácido úrico, colesterol e triglicerídeos), b-HCG para mulheres e exame sumário de urina (Urina I). Exames para a hepatite B e C e para AIDS (HIV 1 e HIV2), no sangue, e exame de fezes (protoparasitológico), serão feitos somente no pré-estudo.

O teste de gravidez será repetido dentro de dois dias antes da administração da medicação.

Durante o estudo, você será internado duas vezes por aproximadamente 36 horas cada período, na Unidade Clínica (Associação Assistencial dos Direitos Humanos e Sociais do Estado de São Paulo - ADHESP [Campinas]), com intervalo mínimo de 30 dias. Em cada internação, a) será administrado 100mg de Ciprofibrato, acompanhado de 200mL de água mineral sem gás; b) serão coletadas 24 amostras de sangue de 7mL cada, através de agulha introduzida em veia superficial para a dosagem do medicamento e mais uma amostra de 40mL antes da administração da medicação (somente na primeira internação) para o controle do método. c) em intervalos regulares, será verificada sua pressão, pulso e temperatura; d) serão também servidas refeições padronizadas (jantar, ceia, na noite da internação [se não interferir com o jejum]; desesjum, almoço, lanche da tarde,

jantar e ceia no dia de administração do medicamento; desjejum, almoço, lanche e jantar no dia de alta) ou bebidas em horários preestabelecidos. Após a coleta de 24 horas da medicação você receberá alta da Unidade Clínica. Um total aproximado de 394mL de sangue será colhido durante todo o estudo.

Você deverá retornar à Unidade Ambulatorial para as demais coletas (72h, 120h e 168h após a administração).

A duração total de sua participação na pesquisa está estimada em 60 dias, a contar da primeira internação, após o processo de seleção.

RESPONSABILIDADES

É condição indispensável, para participação no ensaio clínico, que esteja em boa saúde e, portanto, não esteja no momento sob tratamento médico ou fazendo uso de quaisquer drogas ou medicações e que tampouco tenha participado de outro estudo clínico com medicamentos nos últimos seis meses. Algumas regras deverão ser seguidas para sua participação no estudo: a) não pode ser dependente de drogas ou álcool e caso o Pesquisador tenha alguma suspeita, poderá solicitar exame de urina para detecção do uso de drogas; b) não pode ter doado (ou retirado/perdido por qualquer motivo) sangue ou plasma dentro dos três meses que antecedem o estudo ou ter efetuado três doações (mulheres) / quatro doações (homens) no período de um ano antes do estudo; c) não pode ter dado a luz ou efetuado aborto no período de 12 semanas antes do estudo (mulheres); d) 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) permanecer em jejum pelo tempo previsto (pelo menos oito horas) em cada internação; c) tomar toda a medicação prevista; d) Ingerir toda a alimentação e líquidos que tenham sido previstos; e) retornar à Unidade Clínica na data, horário e locais combinados, para realização da consulta e exames de alta,

independentemente de haver sido interrompida sua participação no estudo ou de sua desistência.

POSSÍVEIS RISCOS E DESCONFORTOS

A administração por boca de ciprofibrato de maneira continuada pode causar reações como: cefaléia ("dor de cabeça"), vertigem ("sensação anormal ao movimentar a cabeça"), náuseas ("vontade de vomitar"), vômito, dor no estômago ("dor na barriga"), boca seca e diarreia. Entretanto o aparecimento de efeitos indesejáveis após administração em dose única de ciprofibrato tem menor probabilidade de aparecer. 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, além de uma mancha roxa pequena no local da picada que frequentemente resolve sem maiores problemas.

BENEFÍCIOS OU COMPENSAÇÕES

A participação neste estudo, não tem 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 desta Instituição, 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. 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 e efetivação da internação, você estará segurado (seguro de vida em grupo).

RESSARCIMENTO

De acordo com valores previamente estabelecidos (R\$ 670,00 [seiscentos e setenta reais]), os voluntários serão ressarcidos das despesas e tempo despendido na realização do supracitado 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. O não comparecimento às coletas de sangue após a internação será motivo de dispensa do voluntário. Entende também que a desistência ou dispensa antes do comparecimento para a primeira internação não dá direito a ressarcimento.

Caso você tenha sido convocado para o estudo na condição de "voluntários reserva" e seja dispensado da internação em função do comparecimento de número suficiente do conjunto de voluntários normalmente convocados, caberá a você o ressarcimento de R\$ 50,00 (cinquenta reais) por conta deste comparecimento, a ser quitado somente no encerramento do estudo.

Estima-se que durante o período de participação no Estudo você terá como despesa apenas os gastos de deslocamento de sua residência ou trabalho até a Unidade Ambulatorial para a realização de exames e consultas, ou ao Hospital, nos dias de internação. Ainda deve ser previsto eventuais visitas posteriores para acompanhamento de eventos adversos. O ressarcimento destas despesas já está incluído no valor estabelecido no item acima.

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 nesta Instituição.

Obteve todas as informações e esclarecimentos necessários para poder decidir conscientemente sobre a participação no referido ensaio clínico.

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.

O Centro de Bioequivalência 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 do Centro de Bioequivalência.

DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES QUANTO A PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

Os registros que possam identificar sua identidade serão mantidos em sigilo, a não ser que haja obrigação legal de divulgação. O Centro de Bioequivalência 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 do(s) órgão(s) governamentais envolvido(s) 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, deverá procurar o Centro de Bioequivalência (Fone (19) 3243 2767) e solicitar que o mesmo contate os médicos responsáveis pelo ensaio clínico ou então entrar em contato diretamente com os mesmos nos telefones indicados no final deste *Termo de Consentimento*.

Poderá contatar o Dr. Gilberto De Nucci, a Farmacêutica, Marinalva Sampaio, ou o Médico Atendente para receber informações adicionais, relacionadas à pesquisa ou quanto aos seus direitos como voluntário.

Poderá contatar a Secretaria do Comitê em Pesquisas com Seres Humanos da Universidade Estadual de Campinas fone 19-3521-8936 para apresentar recursos ou reclamações em relação ao ensaio clínico.

Se você concorda com o exposto acima leia e assine o documento abaixo:

Eu declaro que li cuidadosamente todo este documento denominado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após, tive nova oportunidade de fazer perguntas sobre o conteúdo do mesmo o também sobre o Estudo e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas e reafirmo estar livre e espontaneamente decidindo participar do Estudo.

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, conforme explicitado anteriormente.

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 |
| | | |
| PESSOA QUE ESTÁ OBTENDO O TERMO DE CONSENTIMENTO | DATA | Assinatura |
| | | |
| TESTEMUNHA (Somente necessário se o voluntário não souber ler) | DATA | Assinatura |

TELEFONES PARA CONTATO

Dr. GILBERTO DE NUCCI

Residência: (19) 3251-6928 e

Celular: (19) 9178-8879 / 8139-7522

Clínica: (19) 3243-2767

7.3. Anexo 3. Tabela de Aleatorização

| Número do estudo: | | GDN 003/09 | Data: | 2-Feb-09 |
|-------------------|------|---------------------|-----------|-----------|
| Voluntários | Sexo | Número de sequência | Período 1 | Período 2 |
| 1 | M | 2 | T | R |
| 2 | M | 1 | R | T |
| 3 | M | 2 | T | R |
| 4 | M | 1 | R | T |
| 5 | M | 1 | R | T |
| 6 | M | 2 | T | R |
| 7 | M | 1 | R | T |
| 8 | M | 2 | T | R |
| 9 | M | 2 | T | R |
| 10 | M | 1 | R | T |
| 11 | M | 2 | T | R |
| 12 | M | 1 | R | T |
| 13 | M | 1 | R | T |
| 14 | M | 2 | T | R |
| 15 | F | 1 | R | T |
| 16 | F | 2 | T | R |
| 17 | F | 2 | T | R |
| 18 | F | 1 | R | T |
| 19 | F | 2 | T | R |
| 20 | F | 1 | R | T |
| 21 | F | 2 | T | R |
| 22 | F | 1 | R | T |
| 23 | F | 2 | T | R |
| 24 | F | 1 | R | T |
| 25 | F | 1 | R | T |
| 26 | F | 2 | T | R |
| 27 | F | 1 | R | T |
| 28 | F | 2 | T | R |

Teste: Lipless [Ciprofibrato] – comprimido – 100mg; Biolab Sanus Farmacêutica Ltda.

Referência: Oroxadin [Ciprofibrato] – comprimido – 100mg; Sanofi-Aventis

7.4. Anexo 4. Registro de Eventos Adversos

Documento Fonte de Dados Clínicos Código de Identificação do Voluntário _____ Nº Voluntário _____

GDN / Estudo: _____

FOLHA DE EVENTO ADVERSO Código de Rastreamento 

Caso se trate de nova versão de um evento já relatado (Follow-Up), anote abaixo o código de rastreamento original ^o.

| Detalhes Evento | | Código de Rastreamento Original: _____ | |
|--|--|---|---|
| Início do EA* | Data | Hora | <input type="checkbox"/> Atendimento na Galeno <input type="checkbox"/> Atendimento Externo <input type="checkbox"/> Relato do Voluntário |
| Queixa / Diagnóstico | <small>(Código)</small> | | |
| <small>* Ocorrências antes da administração do Produto sob Investigação no 1º Período não são Eventos Adversos</small> | | | |
| Classificações | | | |
| Seriedade | <input type="checkbox"/> Não Sério <input type="checkbox"/> Sério | → Nº Identificação do Ev. Adv. Sério: _____ | |
| Intensidade | <input type="checkbox"/> Fraco <input type="checkbox"/> Moderado <input type="checkbox"/> Intenso | | |
| Relação c/ Terapia | <input type="checkbox"/> Provável <input type="checkbox"/> Possível <input type="checkbox"/> Não Relacionado <input type="checkbox"/> Não Classificável | | |
| Expectativa* | <input type="checkbox"/> Esperado <input type="checkbox"/> Não Esperado | → Quando a natureza, intensidade ou frequência não é consistente com a informação disponível na literatura | |
| <small>*Prever ser somente quando a relação com a Terapia do EA for classificada como "Provável" ou "Possível"</small> | | | |
| Conduta Imediata* | | <small>* Conduta tomada logo após a ocorrência do evento que se trate de atendimento na Galeno, Externo ou simples Relato do Voluntário</small> | |
| Dose: | <input type="checkbox"/> Reduzida <input type="checkbox"/> Aumentada <input type="checkbox"/> Interrompida <input type="checkbox"/> Encerrada <input type="checkbox"/> Não se Aplica | <small>(Sem única/já administrada)</small> | |
| <input type="checkbox"/> Tratamento Farmacológico <input type="checkbox"/> Observação | | <input type="checkbox"/> Hospitalização <input type="checkbox"/> Outros <input type="checkbox"/> N/A | |
| | | <small>(ou nenhuma ação imediata)</small> | |
| Detalhes: | | <small>Rubrica*</small> | |
| <small>* Deixar se diferente de assinatura abaixo</small> | | | |
| Dados Complementares | | <small>A ser preenchido somente se houver informação específica</small> | |
| Evolução: (Data / Hora) | | | <small>Rubrica*</small> |
| Evolução: (Data / Hora) | | | |
| <input type="checkbox"/> Solicitado Exames: | | <input type="checkbox"/> Retorno em: | |
| Desligamento | <input type="checkbox"/> O médico retirou o Voluntário do Estudo em função do Evento | | |
| | <input type="checkbox"/> O Voluntário resolveu interromper sua participação no estudo em função do Evento | | |
| Outras Informações | | | |
| <small>Se o desfecho está sendo preenchido em conjunto com a avaliação acima, assinar somente na última linha deste formulário</small> | | | |
| Médico Responsável pelas Informações | | Assinatura | Data |
| Desfecho | | <small>Preenchido em conjunto com/ a avaliação acima</small> | |
| | Data: | <input type="checkbox"/> <> <input type="checkbox"/> | |
| Término | Data | Hora | Duração <input type="checkbox"/> Não Encerrado (Ver abaixo) |
| Status (escolha apenas 1 opção) | Recuperação: <input type="checkbox"/> Total (recuperado) <input type="checkbox"/> Com Sequelas <input type="checkbox"/> Não Recuperado | | |
| | <input type="checkbox"/> Desconhecido* (Não compareceu aos retornos solicitados) <input type="checkbox"/> Falecimento | | |
| Outras Informações | | | |
| <small>* (Voluntário não compareceu ao agendamento e/ou não deu retorno a telefonemas, etc.)</small> | | | |
| Médico Responsável pelas Informações / Conclusão | | Assinatura | Data |
| <small>NDN = Nada Digno de Nota N/A = Não se Aplica n.d. = Não Disponível n.r. = Não Requerido neste Protocolo n.c.s. = Não Clinicamente Significativo</small> | | | |
| <small>PDF gerado em 15/10/2008, 12:44:39</small> | | | |
| <small>Formulário SDF - Versão 6.8 de 2008/2009</small> | | <small>Galeno Desenvolvimento de Pesquisas Ltda. - Campinas - SP - Brasil</small> |  X EA |

7.5. Anexo 5. Outras Publicações Durante o Período de Doutorado

Mendes GD, **Mendes FD**, Domingues CC, Oliveira RA, da Silva MA, Chen LS, Ilha JO, Fernandes CE, Nucci GD. Comparative bioavailability of three ibuprofen formulations in healthy human volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2008; 46(6):309-18.

To assess the bioequivalence of three ibuprofen formulations (Test formulation: ibuprofen (400mg capsule) manufactured by Cardinal Health Brasil 402 Ltda. (Sorocaba, Brazil) and licensed to Boehringer Ingelheim do Brasil Quim. e Farm. Ltda. (SA poudo Paulo, Brazil); Reference formulation (1): ibuprofen (AdvilA(R); 2 A 200mg coated tablet) from Wyeth-Whitehall Ltda. (Itapevi, Brazil); Reference formulation (2): ibuprofen (AliviumA; 8ml A 50mg/ml solution) from Schering Plough S.A. (Rio de Janeiro, Brazil)) in 24 healthy volunteers of both sexes. The study was conducted using an open, randomized, three-period crossover design with at least 5-day washout interval. Plasma samples were obtained over a 24-h period. Plasma ibuprofen concentrations were analyzed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with negative ion electrospray ionization using multiple reactions monitoring (MRM). The following pharmacokinetic parameters were obtained from the ibuprofen plasma concentration vs. time curves: AUC (last), AUC(trunctmax), AUC (inf) and C(max). The limit of quantification for ibuprofen was 0.1microg A ml(1). The geometric mean with corresponding 90% confidence interval (CI) for Test/Reference (1) percent ratios were 114.24% (90% CI = 105.67, 123.50%) for C (max), 98.97% (90%

CI = 94.69, 103.44%) for AUC (last) and 99.40% (90% CI = 95.21, 103.78%) for AUC (inf). The geometric mean and respective 90% confidence interval (CI) for Test/Reference (2) percent ratios were 108.38% (90% CI = 100.19, 117.25%) for C(max), 100.79% (90% CI = 96.39, 105.40%) for AUC(last) and 101.26% (90% CI = 96.94, 105.77%) for AUC (inf); t(max) for the 400mg Test capsule was shorter than that for the 2 A 200mg Reference (1) tablets ($p < 0.002$). Conclusion: Since the 90% CI for AUC (last), AUC (inf) and Cmax ratios were within the 80% - 125% interval proposed by the US FDA, it was concluded that ibuprofen formulation manufactured by Cardinal Health Brasil 402 Ltda. and licensed to Boehringer Ingelheim do Brasil Quim. e Farm. Ltda. is bioequivalent to the AdvilA and AliviumA formulations with regard to both the rate and the extent of absorption.

Mendes FD, Patni AK, Reyer S, Monif T, Moreira LD, Ilha JO, Mendes GD, De Nucci G. Comparative bioavailability study with two pantoprazole delayed-released tablet formulations administered with and without food in healthy subjects. *Arzneimittelforschung* 2008; 58(3):141-8.

Objective: *To assess the comparative bioavailability of two formulations (40 mg delayed-released [DR] tablet; test and reference) of pantoprazole (CAS 102625-70-7) in healthy volunteers of both sexes, with and without food.*

Methods: *The study was conducted using an open, randomized, two-period crossover design with a 1-week washout interval, in two groups, with and without food. Plasma samples were obtained for up to 24 h post dose. Plasma pantoprazole concentrations were analyzed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) with positive ion electrospray ionization using multiple reactions monitoring (MRM). From the pantoprazole plasma concentration vs. time curves, the pharmacokinetic parameters AUC(last) and C(max) were obtained, with and without food.* **Results:** *The limit of quantification was 5ng/mL for plasma pantoprazole analysis. The geometric mean and 90% confidence interval CI of test/reference percent ratios were, without and with food, respectively: 104.6540% (90.8616%-120.5401%) and 99.9708% (90.9987%-109.8275%) for C (max), 95.6634% (85.2675%-107.3267%) and 89.3500% (83.6630%-95.4237%) for AUC (last).* **Conclusion:** *Since the 90% CI for AUC(last) and C(max) ratios were within the 80%-125% interval proposed by the US FDA, it was concluded that pantoprazole 40mg DR tablet (test formulation) with and without food was*

bioequivalent to the reference 40mg DR tablet for both the rate and extent of absorption.

da Silva MA, **Mendes FD**, de Oliveira RA, Monif T, Patni A, Reyar S, Mendes GD, De Nucci G. Comparative bioavailability study with two chlorpropamide tablet formulations in healthy volunteers. *Arzneimittelforschung* 2007; 57(9):591-8.

Objective: *The aim of this study was the assessment of the bioequivalence of two formulations (250 mg tablet) of chlorpropamide (CAS 94-20-2) in 36 healthy volunteers of both sexes.* **Methods:** *The study was conducted using an open, randomized, two-period crossover design with a 3-week washout interval. Plasma samples were obtained over a 72-h period. Plasma chlorpropamide concentrations were analyzed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) with positive ion electrospray ionization using multiple reactions monitoring (MRM). From the chlorpropamide plasma concentration vs time curves, the following pharmacokinetic parameters were obtained: AUC (0-72h), AUC (inf) and C(max).* **Results:** *The limit of quantification was 0.1microg/mL for plasma chlorpropamide analysis. The geometric mean and respective 90 % confidence interval (CI) of Test/ Reference percent ratios were 93.99% (87.11%-101.41%) for C (max), 92.45% (85.96%-99.44%) for AUC (0-72h) and 90.30% (83.35%-97.82%) for AUC (0-inf).* **Conclusion:** *Since the 90 % CI for AUC(0-72h), AUC(0-inf) and C(max) ratios were within the 80-125% interval proposed by the US FDA, it was concluded that chlorpropamide 250mg tablet (test formulation) was bioequivalent to the reference 250mg tablet for of both the rate and extent of absorption.*

da Silva MA, **Mendes FD**, de Oliveira RA, Monif T, Patni A, Reyar S, Mendes GD, De Nucci G. Comparative bioavailability study with two chlorpropamide tablet formulations in healthy volunteers. *Arzneimittelforschung* 2007; 57(9):591-8.

Objective: *The aim of this study was the assessment of the bioequivalence of two formulations (250mg tablet) of chlorpropamide (CAS 94-20-2) in 36 healthy volunteers of both sexes.* **Methods:** *The study was conducted using an open, randomized, two-period crossover design with a 3-week washout interval. Plasma samples were obtained over a 72-h period. Plasma chlorpropamide concentrations were analyzed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) with positive ion electrospray ionization using multiple reactions monitoring (MRM). From the chlorpropamide plasma concentration vs time curves, the following pharmacokinetic parameters were obtained: AUC (0-72h), AUC (inf) and C(max).* **Results:** *The limit of quantification was 0.1microg/mL for plasma chlorpropamide analysis. The geometric mean and respective 90% confidence interval (CI) of Test/ Reference percent ratios were 93.99% (87.11%-101.41%) for C (max), 92.45% (85.96%-99.44%) for AUC (0-72h) and 90.30% (83.35%-97.82%) for AUC(0-inf).* **Conclusion:** *Since the 90% CI for AUC(0-72h), AUC (0-inf) and C (max) ratios were within the 80%-125% interval proposed by the US FDA, it was concluded that chlorpropamide 250mg tablet (test formulation) was bioequivalent to the reference 250mg tablet for of both the rate and extent of absorption.*

Mendes GD, Moreira LD, Pereira Ados S, Borges A, Yui F, **Mendes FD**, de Nucci G. A bioequivalence study of gliclazide based on quantification by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2007; 45(3):175-85.

Objective: *The aim of this study was to evaluate, in human volunteers, the performance of one gliclazide tablet formulation (gliclazide 80mg tablet from EMS Indústria Farmacêutica Ltda.) against two reference gliclazide tablet formulations (Diamicron 80mg tablet from Servier do Brazil Ltda. and Diamicron 80mg tablet from Servier (Ireland) Industries Limited).* **Methods:** *The study had an open, randomized, three-period crossover design with a one-week washout interval between doses. The samples were obtained over a 48-h interval after each oral administration of gliclazide. The samples were extracted from plasma using diethylether: hexane (80: 20, v/v) and the extracts were analyzed by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry (HPLC-MS/ MS). Chromatography was performed isocratically using a Jones Chromatography Genesis C8 120A 4u. The method had a chromatographic run-time of 2.5min and a calibration curve of the range of 0.02- 10 microg x ml(-1) ($r(2) > 0.9993$). The limit of quantification was 0.02 microg x ml(-1).* **RESULTS:** *The geometric mean and 90% confidence intervals (CI) for the Gliclazide/Diamicron (Ireland) ratio were 588.68% (90% CI= 491.16, 705.58%) for AUClast, 423.50% (90% CI = 338.25, 530.23%) for AUCinf, and 1395.77% (90% CI= 1116.62, 1744.72%) for Cmax. The geometric mean and 90% confidence intervals (CI) for the Gliclazide/Diamicron (Brazil) ratio were 249.16% (90% CI = 207.96, 298.54%)*

for AUClast, 249.16% (90% CI = 207.96 - 298.54%) for AUCinf, and 188.04% (90% CI - 151.72, 233.05%) for Cmax. CONCLUSION: Since the 90% CI for Cmax, AUClast and AUC(0-infinity) ratios were all outside the 125% interval proposed by the US Food and Drug Administration, we concluded that the gliclazide test formulation were not bioequivalent to either reference formulation. Interestingly, the pharmacokinetic parameters such as Cmax, AUClast of both reference formulations are compatible with neither the literature nor the profile of an immediate release formulation. In addition, both reference formulations were not bioequivalent in themselves, indicating significant differences in reference product formulation.

Cavedal LE, **Mendes FD**, Domingues CC, Patni AK, Monif T, Reyar S, Pereira Ados S, Mendes GD, De Nucci G. Clonazepam quantification in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry in a bioequivalence study. J Mass Spectrom. 2007 Jan;42(1):81-8.

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

7.6. Anexo 6. Pedido de Autorização à Revista para o Artigo ser Incluído na Tese

Campinas, September 12, 2012.

To the editor:

This is to request for copyright release of the following article published in Journal of Chromatography B for purpose of including in my Ph.D. thesis dissertation:

Ciprofibrate quantification in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry for pharmacokinetic studies

Fabiana D. Mendes^a, Lu Shi Chen^d, André Borges^d, Tainah Babadópulos^d, Jaime O. Ilha^d, Khalid M. Alkharfy^e, Gustavo D. Mendes^{b,c,d,*}, Gilberto De Nucci^{e,f}

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

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

^c Faculty of Odontology, University Camilo Castelo Branco (UNICASTELO), São Paulo, SP, Brazil

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

^e Department of Clinical Pharmacy, College of Pharmacy, King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia

^f Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, São Paulo, Brazil

F.D. Mendes et al. / J. Chromatogr. B 879 (2011) 2361–2368

This thesis is for academic use only and it is not going to be used for commercial, advertising or promotion purposes. I am planning in making (15) copies of my thesis. One of this copies will be displayed in The University (Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, BRAZIL) library. In addition, an electronic version of the thesis will be made available at the University Thesis Database.

I thank you very much in advance.

Sincerely,

Fabiana Duarte Mendes

Adress Rua: Dr Fernando Fernandes Duarte de Souza, 59 apto 41 Torre 2

Campinas/SP. Brazil. CEP13087-726

E-mail: mendesfd@gmail.com

7.7. Anexo 7. Autorização da Revista para o Trabalho ser incluído na Tese

----- Forwarded message -----

From: **EP Support** <support@elsevier.com>

Date: 2012/9/13

Subject: Authorization/PhD thesis [Reference: 120913-000413]

To: mendesfd@gmail.com

Subject

Authorization/PhD thesis

Discussion

Response Via Email(Jessrael Genesis) - 13/09/2012 10.49 AM

Dear Dr Mendes,

Thank you for your e-mail.

As an author, you retain rights for a large number of author uses, including use by your employing institute or company. These rights are retained and permitted without the need to obtain specific permission from Elsevier.

- The right to include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially).

Further information about "WHAT RIGHTS DO I RETAIN AS AN AUTHOR? ", you may find Elsevier Customer Support solution useful using:
http://support.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/565

Please ensure that the reference number remains in the subject line when responding to this email.

Why not also visit our self-help site at <http://support.elsevier.com>? Here you can find FAQs, online tutorials and instructions relating to manuscript submissions and articles in production. You will also find 24/7 support contact details, including live chat, should you require further assistance.

Kind regards,

Jessrael Genesis
EP Customer Support

Customer By Email (Fabiana Duarte Mendes) - 13/09/2012 02.59 AM

Dear Editors, good morning:

Attached authorization request for inclusion in the magazine article on my PhD thesis.

Please confirm receipt of email.

I look forward to returning.

Thank fully, Fabiana Mendes Duarte.

=====
application File Attachment =====
autorização da revista.docx, 147595 bytes, added to incident