

Universidade Estadual de Campinas

Érika Perez Guimarães

**Bioequivalência de duas formulações de
anlodipino em voluntários sadios**

*Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado,
apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas -
UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da
Farmacêutica – Érika Perez Guimarães.*

Campinas, 26 de janeiro de 2005.


Prof. Dr. Ronilson Agnaldo Moreno
- Orientador -

Orientador: Prof. Dr. Ronilson Agnaldo Moreno

Campinas

2005

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Universidade Estadual de Campinas

Érika Perez Guimarães

**Bioequivalência de duas formulações de
anlodipino em voluntários sadios**

Orientador: Prof. Dr. Ronilson Agnaldo Moreno

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Curso de Pós-
Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do título
de Mestre em Farmacologia.

Campinas

2005

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE BC
Nº CHAMADA T/UNICAMP
G947b
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 64797
PROC 16.2.00086.05
C _____ OK
PREÇO 11,00
DATA 20/07/05
Nº CPD _____
Pr:h:d 358512

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

G947b

Guimarães, Érika Perez

Bioequivalência de duas formulações de anlodipino em voluntários
sadios / Érika Perez Guimarães. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador : Ronilson Agnaldo Moreno

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Biodisponibilidade. 2. Farmacocinética. I. Ronilson Agnaldo
Moreno. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

SLP



UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Ronilson Agnaldo Moreno

Membros:

Prof. Dr. Ronilson Agnaldo Moreno

Prof. Dr. Stephen Hyslop

Prof. Dr. Paulo Eduardo Moretti.

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

Data: 26/01/2005

**“Fazer de cada momento
uma vida e da vida, um
único momento: isto é
felicidade.”**

*Aos meus pais, **Morvan e Isabel**,
Às minhas irmãs, **Karina e Cláudia**.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Morvan e Isabel**, pela oportunidade dos estudos de ensino médio e graduação; pelo amor, carinho e dedicação incondicionais; e pelo incentivo eterno nos desafios e obstáculos de minha vida.

Às minhas irmãs, **Karina e Cláudia**, pelo apoio, compreensão, otimismo e incentivo em todos os momentos, principalmente, durante às vezes em que pensei em desistir.

Ao **Prof. Dr. Ronilson Agnaldo Moreno**, pela orientação durante a realização deste trabalho e pela oportunidade concedida.

À **tia Joana**, pelos conselhos e carinho sempre.

À amiga **Cristiane Miziara Mussi**, pelo apoio, incentivo, ajuda, carinho e paciência durante o desenvolvimento deste trabalho.

À amiga **Juliana Zamoner**, pela amizade sincera nos momentos alegres e tristes, pelo carinho, dedicação, companheirismo e compreensão incondicionais. Minha eterna gratidão.

Às amigas: **Isabela, Karen, Silvia Helena, Viviane**, que contribuíram cada uma da sua maneira, apoiaram-me, ajudaram-me e me incentivaram na conquista deste objetivo.

Aos funcionários da **Synchrophar**, pela colaboração.

Ao **Wanderlei da Cunha Claro**, do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pela atenção e colaboração.

A **Deus**, pela conquista de mais um objetivo nesta vida.

Sumário

PÁG.

1-Resumo.....	x
Abstract.....	xiii
2-Introdução.....	15
2.1-Características Fisiológicas da contração muscular cardíaca.....	16
2.2-Características Fisiológicas da contração muscular lisa.....	16
2.3-Anlodipino – características e descrição.....	17
2.3.1. Estrutura química.....	18
2.4-Farmacologia.....	19
2.5-Farmacologia Clínica.....	20
2.5.1-Insuficiência cardíaca congestiva.....	20
2.5.2-Hipertensão arterial.....	21
2.5.3-Angina pectoris.....	21
2.6-Farmacocinética.....	22
2.7-Forma Farmacêutica.....	23
2.8-Indicação terapêutica.....	23
2.9-Contra-indicações.....	23
2.10-Interações medicamentosas.....	24
2.11-Reações Adversas.....	24
3-Genéricos.....	26
3.1-Globalização Mundial dos Genéricos.....	27
3.2-Genéricos no Brasil.....	28
3.3-Lei 9787/99.....	29
3.4- Curva Concentração vs tempo.....	30
3.5- Parâmetros Farmacocinéticos.....	31
3.6-Influência na biodisponibilidade da droga.....	32
3.6.1-Aspectos farmacotécnicos.....	32
3.6.2-Presença de alimentos e restrições.....	34
3.6.3-Outros fatores.....	34
4-Objetivo.....	36
4.1-Objetivos do estudo.....	37
4.2-Metas e descrição do tipo do estudo.....	37
4.3-População do estudo.....	37
5-Etapa Clínica.....	38
5.1-Ética em pesquisa.....	39
5.2-Seleção dos voluntários.....	39
5.2.1-Exames físicos e história clínica.....	40
5.2.2-Exames laboratoriais.....	40
5.2.3-Critérios de inclusão.....	41
5.2.4-Critérios de exclusão.....	42
5.2.5-Critérios de retirada.....	43
5.3-Local da internação.....	43
5.4-Período de jejum e alimentação.....	44
5.4.1-Administração de líquidos.....	44

5.5-Dosagem de posologia.....	45
5.6-Tabela de Radomização.....	46
5.7-Coleta das amostras.....	46
5.7.1-Cronograma das coletas das amostras.....	47
5.7.2-Atrasos na coleta das amostras.....	47
5.7.3-Processamento e armazenamento das amostras.....	48
5.8-Amostras de retenção – Inventário.....	49
5.9-Relato de reações adversas.....	49
6-Materiais e Método Analítico.....	50
6.1-HPLC/LCMS.....	51
6.2-Método Analítico.....	53
6.2.1-Princípios do método.....	53
6.3-Materiais e equipamentos.....	53
6.4-Padrões.....	54
6.5-Reagentes utilizados no estudo.....	54
6.6-Material biológico.....	55
6.7-Preparo das soluções.....	55
6.7.1-Solução Padrão de Besilato Anlodipino.....	55
6.7.2-Solução Padrão de Nimodipino.....	55
6.7.3-Solução Besilato de Anlodipino.....	56
6.7.4-Solução Nimodipino.....	56
6.8-Fase móvel.....	56
6.9-Preparo dos padrões da curva de calibração.....	56
6.9.1-Preparo das amostras dos controles de qualidade.....	57
6.10- Validação intra-lote.....	58
6.11- Validação inter-lote.....	60
6.12-Preparo das análises.....	61
6.12.1-Extração das amostras.....	62
6.13-Condições cromatográficas.....	63
6.14-Condições detecção no espectrômetro de massas.....	63
6.15-Estabilidade das amostras.....	64
6.16-Análise farmacocinética e estatística.....	64
7-Resultados.....	66
7.1-Tabelas.....	68
8-Discussão.....	74
9-Conclusão.....	78
10-Referências Bibliográficas.....	80
11- Anexos.....	84

Lista de Tabelas

	PÁG.
Tabela 1: Tabela de Randomização.....	46
Tabela 2: Coletas das amostras.....	47
Tabela 3: Atrasos nas coletas dos voluntários.....	48
Tabela 4: Materiais e equipamentos com fabricantes.....	53
Tabela 5: Componentes do CLAE e fabricantes.....	54
Tabela 6: Padrões utilizados no estudo.....	54
Tabela 7: Reagentes utilizados no estudo.....	54
Tabela 8: Amostras de material biológico.....	55
Tabela 9: Preparo da Curva Calibração Besilato Anlodipino.....	57
Tabela 10: Preparo dos controles de qualidade.....	58
Tabela 11: Análise Intra-lote do Controle de Qualidade LQ.....	59
Tabela 12: Análise Intra-lote dos Controles de Qualidade CQB, CQM, CQA.....	59
Tabela 13: Análise Inter-lotes do Controle de Qualidade LQ.....	60
Tabela 14: Análise Inter-lotes do Controle de Qualidade CQB, CQM, CQA.....	61
Tabela 15A: Concentrações plasmáticas individuais(referência vol.1ao 13).....	69
Tabela 15B: Concentrações plasmáticas individuais(referência vol.14 ao 26)....	69
Tabela 15C: Concentrações plasmáticas individuais(teste vol.1ao 13).....	70
Tabela 15D: Concentrações plasmáticas individuais(teste vol.14 ao 26).....	70
Tabela 16: Estatísticas dos parâmetros farmacocinéticos.....	71

Lista de Figuras

	PÁG.
Figura 1: Estrutura dos diidropiridínicos.....	18
Figura 2: Estrutura química amlodipina.....	19
Figura 3: Esquema do espectrômetro de massa.....	52
Figura 4: Curva média das concentrações plasmáticas vs tempo.....	71
Figura 5: Cromatogramas plasma branco normal, lipêmico e hemolisado.....	72
Figura 6: Espectrograma analito + padrão interno.....	73

1-Resumo

O presente estudo tem por objetivo avaliar a biodisponibilidade relativa, baseado nos respectivos perfis farmacocinéticos apresentados após administração oral, do fármaco anlodipino, na forma de comprimido de 10 mg, em duas formulações comparativas: medicamento de referência (Norvasc®) da indústria Pfizer Ltda e medicamento teste Besilato de Anlodipino da indústria Arrow Farmacêutica S.A.

O estudo realizado foi aberto, randomizado, cruzado, sendo 2 tratamentos, 2 períodos nos quais os voluntários receberam, em cada período, a formulação teste ou a formulação referência. Houve a participação de 26 voluntários sadios de ambos os sexos, com idades entre 18 e 50 anos, previamente selecionados. Foram coletadas amostras de sangue no início do estudo e após administração dos medicamentos (teste e referência) em tempos pré-determinados. Ao término de cada tempo de coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas (10 minutos, 2.000 x g), transferidas para tubos criogênicos, levados ao congelador e mantidos congeladas até o término do estudo para posterior análise.

As amostras foram analisadas por métodos analíticos de cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada a um sistema de espectrometria de massas (LC-MS-MS).

Foram calculadas para cada formulação, na ordem, a concentração máxima atingida C_{max} , a área sob a curva a partir da hora da administração do medicamento até a última amostra coletada $ASC_{(0-t)}$, e a área sob a curva, a partir da administração do medicamento e extrapolada ao infinito $ASC_{(0-inf)}$.

A razão entre as médias geométricas do C_{max} , $ASC_{(0-t)}$, $ASC_{(0-inf)}$ da formulação de anlodipino comprimido 10 mg foram respectivamente de 100.55%, 103.86%, 103.61% da formulação Norvasc® comprimido 10 mg. Os intervalos de confiança de 90% foram, respectivamente, de 95.98 a 105.33%, 99.56 a 108.35%, 98.87 a 108.57%.

Considerando que os intervalos de confiança de 90% para as razões entre as médias geométricas de C_{max} , $ASC_{(0-t)}$, $ASC_{(0-inf)}$, relativos à formulação de Anlodipino comprimido 10 mg estão dentro dos intervalos de 80 a 125% da média geométrica da formulação referência estabelecidos pela RDC 135 (maio de 2003/ANVISA), conclui-se que a formulação de Besilato de Anlodipino comprimido 10 mg (Arrow Farmacêutica S.A) é bioequivalente à formulação Norvasc® comprimido 10 mg (Pfizer Ltda) quanto à taxa de absorção.

Abstract

The present study has for objective to evaluate the established relative bioavailability in the respective pharmacokinetics profiles presented after oral administration, of the anlodipine tablet 10 mg in two comparative formulations: reference medicine (Norvasc®) of the Pfizer industry and medicine it has tested Besilate Amlodipine of the industry Pharmaceutical Arrow.

The accomplished study was open, randomized, crossing, being two treatments, two periods in which the volunteers had received, in each period, the formulation tested or the formularization reference. There was the 26 healthy volunteers of both the sexes participation, with age between 18 and 50 years selected previously. Samples of blood were colleted in the beginning of the study and after administration of medicines (test and reference) in pre-certain times. At the end of each time of collection, the samples of blood were centrifuged (10 minutes, 2000 x g), transferred to cryogenic tubes and taken to the freezer and maintained frozen until the end of the study for subsequent analysis.

The samples were analyzed by analytical methods of liquid chromatography of high coupled efficiency the a system of spectrometry of masses (LC-MS-MS).

They were calculated for each formulation, in the order, the reached maximum concentration C_{max} , the area under the curve starting from the hour of the administration of the medicine to the last collected sample $ASC_{(0-t)}$, and the area under the curve starting from the administration of the medicine and extrapolated to the infinite $ASC_{(0-inf)}$.

The reason among the geometric averages of the C_{max} , $ASC_{(0-t)}$, $ASC_{(0-inf)}$ of the formularization of tablet anlodipine 10 mg there were respectively of 100.55%, 103.86% 103.61% of the Norvasc® formularization; tablet 10 mg. The intervals of trust of 90% were respectively of 95.98%-105.33%; 99.56%-108.35%; 98.87-108.57%.

Considering that the intervals of trusts of 90% for the reasons among the geometric averages of C_{max} , $ASC_{(0-t)}$, $ASC_{(0-inf)}$ relative to the formulation of tablet anlodipine 10 mg are inside of the intervals from 80 to 125% of the geometric average of the reference formulation established by RDC 135 (May of 2003/ANVISA), it is ended that the formularization of tablet Besilate Anlodipine 10 mg (Pharmaceutical Arrow) is bioequivalence to the Norvasc® formulation; tablet 10 mg (Pfizer Ltda) as for the absorption tax.

2-Introdução

2.1- Características fisiológicas da contração muscular cardíaca

Os túbulos transversos (Túbulos T) são extensões internas da membrana celular que atravessam toda a espessura da fibra muscular (GUYTON, 1992). Esses túbulos são os responsáveis pela propagação dos potenciais de ação, disseminando, assim, as correntes elétricas para todas as miofibrilas existentes. Esses potenciais de ação estimulam o retículo sarcoplasmático a liberar os íons de cálcio, induzindo a contração. Para potencializar o efeito da contração do músculo cardíaco também são liberadas quantidades de cálcio extra existentes nos túbulos.

Os íons cálcio são liberados por meio de aberturas de canais que permanecem poucos milissegundos acionados e, ao serem liberados, difundem-se até as miofibrilas adjacentes e catalisam reações que promovem o deslizamento dos filamentos de actina e miosina, que também atuam na contração muscular cardíaca. Com isso, a contração muscular permanecerá enquanto estiver elevada a taxa de cálcio no líquido sarcoplasmático. Por outro lado, a bomba de cálcio existente nas paredes do retículo sarcoplasmático bombeia os íons cálcio presentes no líquido sarcoplasmático para o interior dos túbulos e do retículo, ocasionando o estado de repouso; onde o complexo troponina-tropomiosina mantém os filamentos de actina inertes, relaxando o músculo até que ocorra novo impulso de ação.

2.2- Características fisiológicas da contração muscular lisa

O retículo sarcoplasmático presente nas células musculares lisa é menos desenvolvido em comparação as células musculares esqueléticas. Apresenta-se com diversos túbulos sarcoplasmáticos, com pequenas invaginações da membrana, denominadas cavéolos, as quais entram em contato com esses túbulos. Os cavéolos representam uma analogia rudimentar dos túbulos T das células do músculo esquelético (GUYTON, 1992).

A fonte de íons cálcio não provém totalmente do retículo sarcoplasmático, o qual é rudimentar no músculo liso. Na maioria dos tipos de músculo liso, grande parte dos íons cálcio responsáveis pela contração muscular migram para o interior da célula muscular, provenientes do líquido extracelular, durante o potencial de ação.

No músculo liso, a contração ocorre por meio da combinação de íons cálcio com a calmodulina, ocasionando a ativação da miosina quinase e fosforilação da cabeça da miosina. Dessa forma a contração muscular permanecerá ativa até que a concentração de cálcio diminua seu nível crítico e também a enzima miosina fosfatase exerça seu papel de remoção do fosfato da cadeia regulatória. Assim, o ciclo é interrompido e cessa a contração. Portanto, o tempo para o relaxamento da contração muscular lisa é, em grande parte, determinado pela quantidade de miosina fosfatase ativa na célula.

2.3- Anlodipino – características e descrição

O Anlodipino ($C_{20}H_{25}ClN_2O_5 \cdot C_6H_6O_3S$) é um bloqueador seletivo do canal lento de cálcio utilizado no tratamento da angina do peito, hipertensão arterial e insuficiência cardíaca congestiva, age por meio da inibição do fluxo de cálcio extracelular para o meio intracelular dos músculos cardíaco e liso.

É um composto que apresenta-se fisicamente como um pó branco, pouco solúvel em água e álcool isopropílico, solúvel em álcool metílico. Seu peso molecular é 567,1.

2.3.1- Estrutura química:

Pertence ao grupo dos diidropiridínicos. Essa denominação deve-se à presença na sua estrutura de um anel diidropiridínico substituído ligado a um anel fenila com um ou dois átomos ou grupos. Esses compostos são diésteres do ácido 3,5 -piridinodicarboxílico. São comercializados no Brasil como antianginosos e anti-hipertensivos os seguintes fármacos: anlodipino, felodipino, isradipino, nifedipino e nisoldipino. (KOROLKOVAS,2000/2001).

Outros fármacos bloqueadores dos canais de cálcio que pertencem a grupos diversos são diltiazem, fendilina e verapamil.

Grupo dos diidopiridínicos

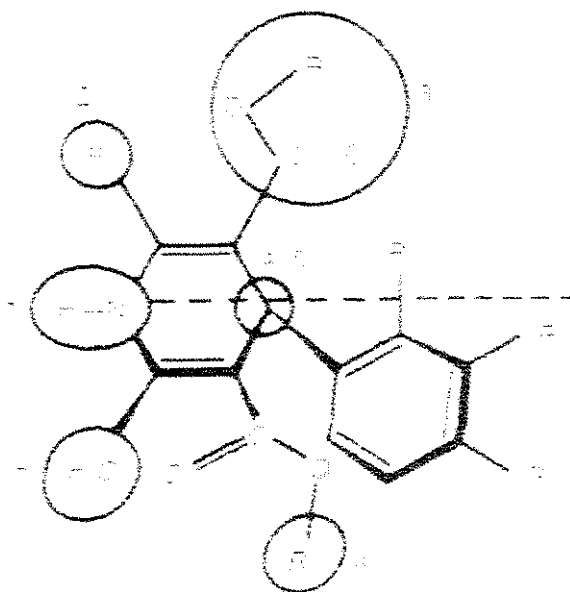


Figura 1: estrutura grupo dos diidopiridínicos

Legenda:

- 1- É necessária sua presença
- 2- Podem ser grupos volumosos
- 3- A função éster é ótima como antagonista: $-\text{COOR} > \text{COMe} > \text{CN} > \text{H}$; e NO_2 como ativador
- 4- Centro estereogênico (estereosseletividade)
- 5- a) Ângulo de torção determinado do anel aromático.
b) Substituintes : $o \geq m \geq p$
doadores de elétrons < aceptores de elétrons
- 6- Pode apresentar grupos volumosos
- 7- Ótimo com grupos alquílicos pequenos

O fármaco em estudo contém duas cadeias laterais longas no anel diidropiridínico, sendo uma delas, a 2-aminoetoximetila, situada na proximidade do nitrogênio do anel diidropirindínico (KOROLKOVAS, 2000/2001).

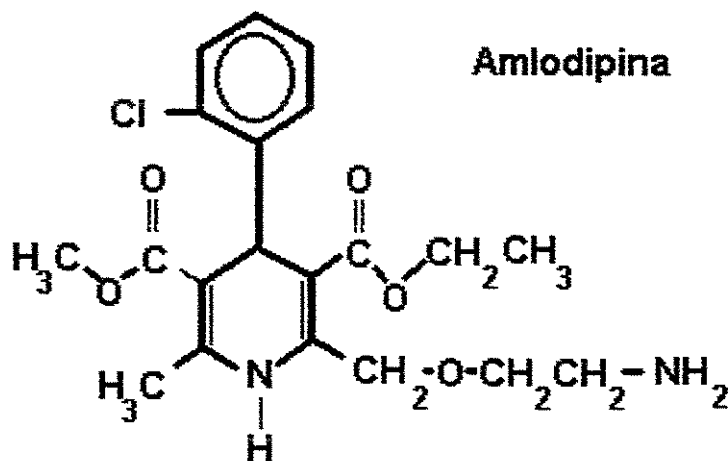


Figura 2: Estrutura da Amlodipina

2.4- Farmacologia

O cálcio age como ativador da contração muscular e da atividade específica das células dos nós sinusal e atrio-ventricular. No coração, o cálcio se associa à troponina e desfaz a inibição do complexo troponina-tropomiosina sobre os filamentos de actina, que representa o início da contração muscular. Nos músculos lisos, esse efeito se observa quando o cálcio se liga à calmodulina e também ao nó sinusal e ao atrioventricular; a despolarização ocorre por meio da corrente lenta de cálcio. Assim, os antagonistas de cálcio atuam nos locais de depósito de cálcio, localizados na membrana de células miocárdicas e de células de músculo liso, impedindo, por competição, seu transporte para o interior destas células, ocasionando redução da contratilidade, dilatação das artérias periféricas e coronárias e efeito antiarrítmico.

O Amlodipino como anti-hipertensivo atua no relaxamento direto da musculatura vascular lisa, reduzindo a resistência vascular periférica total, e

assim, ocasionando a vasodilatação. Atua também, na depressão do nó sinoatrial e atrioventricular.

Na angina do peito, seu mecanismo de ação não está totalmente definido, mas sua ação baseia-se na redução do grau de isquemia, dilatando, assim, arteríolas periféricas e, como consequência disto, reduz a resistência periférica total contra o trabalho cardíaco. Por meio deste efeito, a frequência cardíaca se normaliza e permanece estável, reduzindo a carga de tensão da parede do coração e consumo de energia miocárdica e também o consumo de oxigênio. O mecanismo de ação também envolve a dilatação de arteríolas coronárias periféricas e coronárias principais em regiões normais e isquêmicas, aumentando a quantidade de oxigênio no miocárdio e melhorando o fluxo sanguíneo. Esta ação também se assemelha na insuficiência cardíaca congestiva, ou seja, vasodilatação, aumentando aporte de oxigênio e normalização do débito.

2.5- Farmacologia Clínica

Os antagonistas de cálcio, diidropiridínicos, têm sido muito utilizados no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva do tipo sistólica e outras doenças cardiovasculares. Seu elevado uso nessas enfermidades deve-se à sua ação vasodilatadora e por representarem a classe de fármacos com menor ação depressora da contratilidade miocárdica e também devido a sua eficácia e os poucos efeitos colaterais demonstrados.

2.5.1- Insuficiência cardíaca congestiva

A insuficiência cardíaca congestiva caracteriza-se como uma síndrome, em que o coração debilitado se mostra incapaz de bombear o sangue para atender as necessidades dos órgãos e tecidos periféricos (SILVA, 1988). Com isso, o miocárdio doente não tolera variações de resistência periférica brusca como um coração normal aceita, e ocasiona diminuição do débito cardíaco, aumentando o

volume sangüíneo nas câmaras e elevando a pressão pericárdica e, como resultado, dilatação do coração.

Os sintomas da insuficiência cardíaca congestiva baseiam-se em dispnéia progressiva, tosse e congestão pulmonar, quando o comprometimento da lesão ocorre devido à falência ventricular esquerda. Na falência ventricular direita, observa-se o edema em membros inferiores, êxtase de jugulares e congestão hepática. Ocorrem, também, em ambos os acometimentos a sensação de fadiga.

2.5.2- Hipertensão arterial

Em pacientes com hipertensão arterial, a dose única diária (5,0 mg) de Anlodipino proporciona diminuição da pressão sangüínea durante 24 horas. Dependendo do indivíduo, a dose poderá ser aumentada para 10 mg.

Seu efeito de ação é lento, e por isso, a hipotensão aguda não constitui um efeito significativo com sua administração.

2.5.3- Angina pectoris

A *angina pectoris* caracteriza-se pela dor torácica intensa, ocasionada quando o fluxo sangüíneo coronariano é insuficiente para fornecer a quantidade de oxigênio ao coração e, como conseqüência, aumenta a freqüência cardíaca e a pressão arterial. A dor é caracterizada devido ao acúmulo de metabólitos no músculo estriado. (KATZUNG,1995)

A angina ocorre quando há obstrução ateromatosa dos vasos coronários, designada de *angina clássica ou aterosclerótica*. É caracterizada pelo aumento da demanda de oxigênio pelo coração, durante um esforço físico ou emoção, gerando assim, isquemia no local afetado e, por sua vez, a dor, em alguns pacientes, pode originar uma isquemia silenciosa.

Pode ocorrer também a chamada *angina variante ou vasoespástica, ou angina de Prinzmetal*, caracterizada devido ao vasoespasmos coronarianos reversíveis e isquemia nestes locais.

Em pacientes com espasmo coronariano arterial (*angina variante*), o efeito do fármaco Anlodipino é a dilatação das arteríolas coronárias periféricas e principal, com isso, aumenta a disponibilidade de oxigênio no coração e ameniza a vasoconstrição, reduzindo o trabalho cardíaco. Na angina clássica, o objetivo clínico é aumentar o aporte e diminuir a demanda de oxigênio pelo coração, com o uso de vasodiladores, como o anlodipino, porém, quando há placas ateromatosas fixas que impedem essa terapia com essa classe de medicamentos, é necessário método invasivo designado angioplastia (KATZUNG, 1995).

A dose única diária (10mg) diminui a intensidade e frequência das crises anginosas. É usado na profilaxia desta enfermidade, sendo outros fármacos, como nitroglicerina, utilizados como terapia aguda.

2.6- Farmacocinética

O Anlodipino é bem absorvido após administração terapêutica via oral e apresenta picos máximos de níveis plasmáticos entre 6-12 horas após a dosagem. Une-se a aproximadamente 97,5% às proteínas plasmáticas (SWEETMAN, 2002). Sua biodisponibilidade é 60-65%; sua absorção não é afetada pela ingestão de alimentos.

É metabolizado amplamente no fígado em metabólitos inativos com 10% da droga inalterada, sendo 60% excretado pela urina, e o restante, nas fezes. A meia-vida de eliminação terminal plasmática é de 35-50 horas em uma dose única diária. Os índices no estado de equilíbrio plasmático ocorrem após 7-8 dias, em doses consecutivas.

Pacientes jovens e idosos apresentam o mesmo tempo para alcançar o pico de concentração plasmática. Em idosos, a depuração tende a estar diminuída,

com isso, aumenta a eliminação plasmática do fármaco e também a área sob a curva (AUC), necessitando, neste caso, de um reajuste na dosagem.

2.7- Forma farmacêutica

O Anlodipino é comercializado na forma de comprimidos de 5 mg e 10 mg como Besilato de Anlodipino, sendo que cada 6,9 mg de Besilato de Anlodipino equivale aproximadamente a 5,0 mg de Anlodipino (SWEETMAN, 2002).

O medicamento deve ser armazenado em temperatura ambiente, entre 15° e 30° C, protegido da luz e umidade. Os comprimidos são acondicionados em blíster, contendo 20 ou 30 unidades, e seu prazo de validade é de 24 meses, a partir da data de fabricação.

2.8- Indicação terapêutica

É indicado como droga de primeira linha no tratamento da hipertensão arterial como único agente no controle da pressão sangüínea ou em pacientes que necessitem de outras drogas combinadas com o Anlodipino, como diuréticos tiazídicos, alfabloqueadores, agentes betabloqueadores adrenérgicos ou inibidores da enzima conversora da angiotensina.

Também está indicado na isquemia miocárdica, tanto na obstrução fixa (*angina estável*), como no vasoespasmo (*angina de Prinzmetal ou angina variante*) da vasculatura coronariana.

2.9- Contra-indicações

É contra-indicado a pacientes que possuem hipersensibilidade às diidropiridinas (fármaco Anlodipino).

O uso durante a gravidez e a lactação não está estabelecido, porém, é recomendado apenas quando não há outra fonte alternativa mais segura e quando a doença sozinha acarreta riscos para a mãe e para o feto. Seu uso deve ser proibido em casos de insuficiência hepática, renal ou cardíaca grave, e em pacientes com bloqueio atrioventricular muito grave.

2.10- Interações Medicamentosas

O Amlodipino não apresenta alterações no seu efeito terapêutico, quando administrado juntamente com diuréticos tiazídicos, alfabloqueadores, betabloqueadores, inibidores da enzima conversora da angiotensina, nitratos de longa ação, nitroglicerina sublingual, antiinflamatórios não esteróides, antibióticos e hipoglicemiantes orais.

Fármacos como Cimetidina, Alumínio (Magnésio), Sildenafil, Atorvastatina, Digoxina em co-administração com Amlodipino não alteram os seus parâmetros farmacocinéticos.

Em co-administração com Warfarina, o Amlodipino não demonstra nenhuma alteração no tempo de protrombina da Warfarina.

Com etanol e Ciclosporina, separadamente, não demonstrou efeito significativo na farmacocinética destes fármacos.

2.11- Reações adversas

O fármaco em estudo é bem tolerado, mas podem ocorrer reações adversas, como cefaléia, rubor, eritema, prurido, hiperpigmentação das pernas e pés, fadiga, edema, tontura, náusea, desconforto abdominal, anorexia, diarreia, constipação, palpitações e sonolência.

Nenhum caso de superdosagem foi relatado, uma vez que a absorção do anlodipino é lenta, em alguns casos, a lavagem gástrica pode ser necessária. O quadro clínico em uma superdosagem inclui hipotensão, bradiarritmias e insuficiência cardíaca congestiva.

O tratamento em superdosagem constitui-se de uso temporário de marca-passo para manutenção da frequência cardíaca, e/ou débito cardíaco, atropina para bradicarrítmia e expansores de volume e de vasopressores no caso de hipotensão. A diálise não é favorável ao paciente, pois o anlodipino é altamente ligado às proteínas plasmáticas

3- Medicamentos Genéricos

3.1- Globalização Mundial dos genéricos

A comercialização mundial dos medicamentos genéricos teve origem na década de 1960, destacando-se os Estados Unidos como o principal contribuinte para a fabricação destes medicamentos, foi o primeiro país a adotar uma política de medicamentos racional, com o objetivo de inovar a indústria farmacêutica com novas tecnologias visando um mercado competitivo, com produtos de qualidade e menor custo à população.

O mercado norte-americano de medicamentos genéricos se expandiu consideravelmente, e atualmente, em torno de 70% das prescrições médicas, os medicamentos são indicados por seus termos genéricos. Também, esses medicamentos são prioridades para as indústrias farmacêuticas, e são, geralmente, comercializados três meses após o término da patente.

Em países como França, Espanha e Itália, os medicamentos em geral possuem um custo acessível e também há o acesso gratuito nos postos de distribuição. Com isso, os genéricos não obtiveram tanto êxito como em outros países.

Na Alemanha, Inglaterra, Holanda e Estados Unidos, a economia industrial farmacêutica se desenvolveu e revolucionou o mercado em várias classes desses medicamentos, destacando-se os Estados Unidos, onde 30% dos valores movimentados representam terapias com medicamentos genéricos. Os médicos americanos possuem uma lista de orientação dos medicamentos de referência e o respectivo genérico correspondente, e também há limites monetários para gastos com tratamento de cada tipo de enfermidade. No Canadá, os valores dos gastos com saúde representam 13%.

No Brasil, os medicamentos genéricos tiveram origem em 1999, com a Lei 9787/99, e hoje, para uma grande parte dos medicamentos de uso contínuo está sendo comercializado o genérico correspondente.

A divulgação, aceitação dos consumidores e comercialização dos genéricos deve-se à profissionais de saúde, como médicos, odontólogos e farmacêuticos, que são, respectivamente, os principais agentes de prescrição, dispensação e conscientização do consumidor, mediante uma terapia de qualidade, eficácia, segurança comprovada pelos estudos de bioequivalência e menores custos, possibilitando melhorias nos tratamentos terapêuticos e intercambialidade entre o medicamento de referência e o genérico.

3.2- Genéricos no Brasil

No Brasil, os medicamentos similares surgiram em meados de 1971, quando o país decidiu não reconhecer as patentes dos medicamentos. Com isso, o mercado externo para réplicas destes medicamentos patenteados se mostrou disposto a investir em laboratórios nacionais. Isso se prosseguiu até o ano de 1976, quando se instaurou a Lei 6360/76, que estabeleceu o controle dos medicamentos similares pela Vigilância Sanitária. A partir desse ano, as indústrias farmacêuticas obtiveram autorização de registro e, posteriormente, o livre comércio para os medicamentos similares baseado no medicamento de referência ou inovador.

Para os medicamentos similares não eram exigidos os testes de equivalência ao medicamento de referência. Na época, eram comercializados dois tipos de medicamentos similares: similares com nome *fantasia* e similares designados pelo nome *genérico*. A partir de outubro de 2001, apenas vigorou a denominação pelo nome *fantasia ou marca registrada*. Além do nome fantasia ou nome comercial, também foi obrigatório em 1983 a Denominação Comum Brasileira (DCB) da substância ativa nas embalagens destes medicamentos.

A OMS, Organização Mundial de Saúde (1990), no glossário de Termos Especializados para Avaliação de Medicamentos, estabeleceu a autorização do medicamento genérico somente após a confirmação de eficácia, segurança e

qualidade devidamente registradas em comparação ao medicamento de referência.

Com a Lei das Patentes, em 1996, os medicamentos patenteados estavam protegidos por um período estimado de 20 anos, tempo pelo qual não poderiam ser copiados e comercializados, garantindo, assim, à indústria inovadora, o retorno dos investimentos gastos em pesquisa, desenvolvimento e marketing do produto.

Em 1999, como prioridade à Política Racional de Medicamentos, o presidente da República Fernando Henrique Cardoso sancionou a Lei 9787/99, que altera a Lei 6360/76, estabelece o medicamento genérico e fornece outras providências.

Com a Resolução de 391/99, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, surge o Regulamento Técnico para os Medicamentos Genéricos. Este regulamento rege as provas de biodisponibilidade, bioequivalência e aferição de equivalência terapêutica, o registro, a intercambialidade, a estabilidade e a dispensação dos medicamentos genéricos no país.

Com o incentivo do governo ao desenvolvimento e comercialização dos medicamentos genéricos, promoção de campanhas de conscientização à população e sobre os efeitos terapêuticos semelhantes em relação a um medicamento inovador, o país possui, atualmente, uma ampla variedade de classes de medicamentos genéricos para as mais diversas enfermidades agudas e crônicas.

3.3- Lei 9787/99 – “*Estabelece o medicamento genérico*”

Definições estabelecidas nesta lei vigente:

Medicamento Similar – aquele que contém o mesmo ou os mesmos princípios ativos, apresenta a mesma concentração, forma farmacêutica, via de

administração, posologia e indicação terapêutica, preventiva ou diagnóstica, do medicamento de referência registrado no órgão federal responsável pela vigilância sanitária, podendo diferir somente em características relativas ao tamanho e forma do produto, prazo de validade, embalagem, rotulagem, excipientes e veículos, devendo sempre ser identificados por nome comercial ou marca.

Medicamento Genérico – medicamento similar a um produto de referência ou inovador, que se pretende ser com ele intercambiável, geralmente produzido após a expiração ou renúncia da proteção patentária ou de outros direitos de exclusividade, comprovada a sua eficácia, segurança e qualidade, e designado pela denominação comum brasileira (DCB), ou na sua ausência pela denominação comum internacional (DCI).

Medicamento de Referência – produto inovador registrado no órgão federal responsável pela vigilância sanitária e comercializado no país, cuja eficácia, segurança e qualidade foram comprovadas cientificamente junto ao órgão federal competente, por ocasião do registro.

Bioequivalência – consiste na demonstração de equivalência farmacêutica entre os produtos apresentados sob a mesma forma farmacêutica, contendo idêntica composição qualitativa e quantitativa de princípio(s) ativo(s), e que tenham comparável biodisponibilidade, quando estudados sob um mesmo desenho experimental.

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

3.4- Curva concentração x tempo

Após a administração oral de uma droga, ocorre um aumento progressivo de sua concentração sanguínea, ao mesmo tempo em que se inicia a sua

eliminação (Zanini & Oga, 1994). Isto pode ser demonstrado coletando-se sangue de indivíduos voluntários em diferentes intervalos de tempo pré-determinados, após a administração oral e preparando-se as amostras de plasma, as quais serão quantificadas por métodos analíticos. Os resultados obtidos servirão para traçar a curva de concentração sanguínea da droga em estudo em função do tempo.

Essa disponibilidade da droga quantificada no sangue depende de fatores como absorção, distribuição, biotransformação e excreção. Assim, no início, a curva projeta-se em ascensão, representando a absorção da droga. Com o tempo, a curva atinge um pico máximo (C_{max}), o qual indica a concentração mais elevada da droga dentro do compartimento intravascular no órgão-alvo, e após, ocorre declínio da curva, representando a diminuição do teor da droga, predominando nesta fase a distribuição, biotransformação e excreção da droga.

Na curva de nível sérico, há três parâmetros importantes para o estudo comparativo de bioequivalência de duas formulações diferentes que contenham o mesmo princípio ativo: pico de concentração máxima; tempo em que ocorre o pico da concentração sanguínea (T_{max}) e área sob a curva de nível sanguíneo (ASC)

A área sob a curva do nível sanguíneo é calculada matematicamente pela área trapezoidal dos valores traçados pela curva, usando-se como unidade a quantidade/volume x horas. Este cálculo é importante para representar a quantidade do fármaco ativo presente no organismo durante um intervalo de tempo (Zanini & Oga, 1994).

3.5- Parâmetros farmacocinéticos

$ASC_{(0-t)}$: área sob a curva de concentração da droga *versus* tempo do tempo zero ao tempo da última concentração acima do Limite de Quantificação (LQ), calculada pelo método dos trapézios;

ASC_(0-∞): área sob a curva de concentração da droga *versus* tempo do tempo zero extrapolada ao infinito, calculada pelo método linear-log trapezoidal;

AUC_(0-∞) = AUC_(0-last) + Ct/Ke, em que Ct é a última concentração quantificável;

Ke: constante de eliminação de Primeira Ordem, estimada pela inclinação da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados do tempo x logaritmo da concentração;

T_{1/2}: meia-vida, tempo em que a concentração plasmática ou a quantidade do fármaco no organismo diminui em 50%.

3.6 – Influência na biodisponibilidade da droga

3.6.1 – Aspectos farmacotécnicos

Atualmente, as indústrias farmacêuticas estão investindo em tecnologia, pesquisa e equipamentos apropriados para desenvolvimento e produção de formulações farmacêuticas genéricas com controle da liberação da substância ativa.

Os laboratórios são rígidos nos testes realizados e possuem repartições distintas, nas quais há o desenvolvimento, pesquisa e manipulação de testes-piloto, controle de qualidade, validação e desenvolvimento analítico de métodos dos medicamentos que serão lançados no mercado.

Um produto em teste, após levantamento bibliográfico e pesquisa das características da substância ativa e excipientes, é formulado experimentalmente diversas vezes em pequenas quantidades (lote piloto) com variadas quantidades de matérias-primas estabelecidas, as quais influenciam na biodisponibilidade do

princípio ativo como diluentes, adsorventes, desintegrantes, agentes de suspensão, aglutinantes, lubrificantes, estabilizantes e flavorizantes.

Também são consideradas as propriedades físico-químicas, como tamanho da partícula, forma cristalina ou amorfa, sais do fármaco, hidratação, pH, pKa, solubilidade em óleo/água e processo de fabricação. Com isso, originam-se formulações pré-determinadas com características físicas mais prováveis em relação ao medicamento de referência correspondente à fórmula em estudo.

Na forma farmacêutica sólida de uso oral, como os comprimidos, com características físicas como friabilidade, dureza, desintegração e dissolução, e na forma farmacêutica suspensão, características como ressuspensabilidade são importantes para definição do produto testado e finalização da formulação a posterior realização dos testes físico-químicos, os quais são baseados no teor do princípio ativo liberado “in vitro” (*dissolução*) durante um intervalo de tempo e analisado perfil de dissolução do fármaco (medicamento teste) em relação ao medicamento de referência. Caso este perfil apresente características equivalentes dos valores da curva, é, então, definida a formulação e serão produzidos lotes-piloto em escalas maiores, segundo legislação da ANVISA, RE 560 de abril de 2002, e realizados testes de estabilidade acelerada e longa duração. Em sequência, após aprovação nesses testes, as amostras dos medicamentos serão encaminhadas para a realização de estudos de bioequivalência em voluntários sadios em centros especializados e credenciados.

Ao contrário disso, se a formulação não demonstrar perfis de dissolução compatíveis, será descartada e novos testes se iniciam desde a etapa da pré-formulação com alterações nas quantidades de matérias-primas, levando-se em conta as características dos perfis analíticos apresentados, e tendo-se como objetivo uma formulação piloto equivalente ao medicamento inovador.

3.6.2 – Presença de alimentos e restrições

Alguns fármacos sofrem influência na absorção, alterando a biodisponibilidade, devido à presença ou até mesmo ausência dos alimentos no trato-gastrointestinal.

Alimentos ricos em fibra e pectina podem diminuir a absorção, por formarem complexos insolúveis; alimentos com resíduos de combustão ácida, como enlatados, queijos, ovos, frutos do mar, frutas cítricas, pão, bolo, macarrão, cereais e maionese podem aumentar a reabsorção tubular de alguns antibióticos, devido ao aumento da atividade antimicrobiana e alimentos com resíduos de combustão alcalina, como leite, cremes, coco, azeitona, diminuem o efeito terapêutico de algumas classes de medicamentos, como os Antibióticos (Zanini & Oga, 1994).

Com isso, é importante seguir critérios de jejum e restrições alimentares durante a realização dos estudos de bioequivalência para que não ocorram alteração e equívoco na obtenção dos dados quantificados nos níveis plasmáticos.

3.6.3- Outros fatores (Zanini & Oga, 1994)

- a) **Variabilidade individual** – efeitos variados em indivíduos de uma mesma espécie, após uma mesma dosagem terapêutica.
- b) **Fatores genéticos** – variações genéticas entre os indivíduos podem aumentar ou diminuir os efeitos terapêuticos, devido à diferença nas quantidades de enzimas responsáveis pela biotransformação, mostrando sensibilidade ou até mesmo insensibilidade a determinados fármacos.
- c) **Espécie animal e raça** – podem ocorrer variações na velocidade de degradação, alterando a intensidade do efeito ou alterações nas respostas qualitativas em diferentes espécies e raça de indivíduos. Esse fator ocorre devido às diferenças na biotransformação dos medicamentos.

- d) **Idade** - os recém-nascidos apresentam capacidade de excreção renal e fenômenos enzimáticos responsáveis pela biotransformação pouco desenvolvidas, e em idosos, alterados, ocasionando uma biodisponibilidade diferente em relação a um indivíduo adulto sadio.
- e) **Peso e composições corpóreas** – em indivíduos obesos ou muito magros, a dosagem deve ser reajustada devido a proporções desiguais entre água e gordura.
- f) **Sexo** – no homem, não há grandes diferenças na resposta dos fármacos entre os sexos, exceto na gravidez, lactação e diferenças hormonais.
- g) **Estado patológico ou fisiológico especiais** – em estados patológicos, como insuficiência renal ou hepática, a eliminação da droga pode ser alterada, ocasionando efeitos tóxicos em dosagens normais. Em casos de diarreia, a taxa de absorção pode sofrer grandes alterações ou perda total do medicamento.
- h) **Estado psicológico** – fatores emocionais, como ansiedade e medo, podem alterar ou inverter efeitos das drogas.

4- Objetivo do estudo

4.1- Objetivo do estudo

Este estudo teve como objetivo a avaliação da biodisponibilidade relativa de dois produtos contendo o fármaco Anlodipino. O produto teste utilizado foi Besilato de Anlodipino comprimido 10 mg da indústria Arrow farmacêutica S.A e o produto referência foi Norvasc® comprimido, de 10 mg da indústria Pfizer Ltda.

A biodisponibilidade comparativa das formulações após a administração oral foi avaliada com base em comparações estatísticas de parâmetros farmacocinéticos relevantes, obtidos de dados de concentração sanguínea para a droga, por amostras de sangue coletadas dos voluntários. A concentração de Anlodipino foi medida por meio de um método analítico apropriado e validado.

4.2 – Metas e descrição do tipo do estudo

O estudo realizado foi aberto, randomizado, cruzado, com 2 tratamentos e 2 períodos, nos quais os voluntários receberam, em cada período distinto, a formulação teste ou a formulação referência. Foi delineado de forma a permitir dados dos parâmetros farmacocinéticos para a comparação estatística, visando a averiguação de bioequivalência. Nesse estudo, tais parâmetros foram obtidos diretamente a partir da determinação plasmática do princípio ativo (Besilato de Anlodipino) do medicamento, após administração do medicamento por via oral.

4.3 – População do estudo

A população estudada constituiu-se de voluntários sadios, adultos de ambos os sexos com idade entre 18 e 50 anos, com índice de massa corpórea dentro de uma variação de 10% , de acordo com altura e estrutura óssea. Não houve restrições quanto ao grupo étnico. Os voluntários foram recrutados entre aqueles que se apresentarem à Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Estudos Clínicos (Synchrophar) para seleção

5- Etapa Clínica

5.1- Ética em pesquisa

O presente estudo foi conduzido de acordo com as Boas Práticas Clínicas (GCP) e demais recomendações estabelecidas pela ICH (*Harmonized Tripartite Guideline For Good Clinical Practice*), bem como de conformidade com as Resoluções 196/96 e 251/97 do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde e Resolução 10/01 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

O projeto de pesquisa, com o protocolo experimental e o termo de consentimento, foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Unicamp, credenciado pelo CONEP – Conselho Nacional de Saúde/MS, antes do início do estudo, e o mesmo só se iniciou após a aprovação desse Comitê.

Os voluntários selecionados foram orientados sobre o objetivo do estudo, incluindo normas e regras, possíveis reações adversas da droga em análise e, ao concordarem, os mesmos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Foi enfatizado que o objetivo do estudo era a pesquisa, sem efeito terapêutico. Também o voluntário foi livre para se retirar a qualquer momento do estudo e, mesmo se retirando, seria atendido junto a Synchrophar para avaliação e liberação.

5.2 – Seleção dos voluntários

A seleção dos voluntários foi realizada por meio da unidade responsável pela Etapa Clínica (Synchrophar). Foram selecionados diretamente da população da região 26 voluntários sadios, com idade entre 18 e 50 anos, sendo 13 do sexo masculino e 13 do sexo feminino.

Os voluntários aceitos no estudo foram considerados saudáveis, a juízo médico, com base na história clínica, exame físico e laboratoriais. Após avaliação

da higidez, os voluntários foram submetidos a uma entrevista livre para avaliação da saúde mental, bem como das condições emocionais.

5.2.1- Exames físicos e história clínica

Os exames clínicos foram realizados em um período não superior aos 30 dias que antecederam a primeira medicação.

Na história médica, foram analisados alguns aspectos, como: alergias – olhos, nariz e garganta, sistema respiratório, cardiovascular, gastorintestinal, genito urinário, nervoso central, hematopoiético-linfático, endócrino, dermatológico, musculoesquelético, estabilidade emocional, história familiar, cirúrgica.

No exame físico, foram observados os olhos, nariz, garganta, pescoço (incluindo tireóide), coração, pulmões, abdômen (incluindo fígado e baço), pele, linfonodos, urogenital, sistema nervoso, esqueleto e músculos. A pressão arterial foi aferida após 5 minutos em repouso, na posição sentada, assim como o pulso, o peso, índice de massa corpórea e temperatura em °C. Foi realizado também um eletrocardiograma.

Dados: foi considerada pressão arterial normal aquela representado valores dentro de 100-140 mm Hg para a sistólica e 60-90 mm Hg para a diastólica.

Os resultados avaliados de cada voluntário foram anotados nos formulários de relato de caso (CRF) para acompanhamento dos dados até a etapa final do estudo.

5.2.2- Exames laboratoriais

Para fins de avaliação das condições de saúde, durante o processo de seleção, os voluntários realizaram os seguintes testes:

- Eletrocardiograma (ECG): padrão com 12 derivações
- Análise hematológica: hemoglobina, hematócrito, contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de glóbulos vermelhos, contagem de plaquetas
- Análise bioquímica: uréia, creatinina, bilirrubina total, proteínas totais, albumina, glicose em jejum, fosfatase alcalina, SGOT, SGTP, colesterol total, triglicérides, ácido úrico, gamaGT
- Urina: Sumário de Urina I
- Parasitológico
- Sorologia: análise sorológica para hepatite B, hepatite C e HIV (somente antes do estudo).

Os exames laboratoriais foram realizados até 60 dias, com exceção do BHCG em mulheres, que são 30 dias, antes da participação do voluntário no estudo, por ocasião da consulta médica, durante o processo de seleção.

Dados: Os resultados dos exames de laboratório foram considerados “normais” quando dentro da faixa de normalidade estabelecida pelo laboratório. Para resultados numéricos, os valores até 10% fora da faixa de normalidade declarada foram considerados “normais”.

Os exames físico geral (pressão arterial), laboratoriais (exceção sorológico) e eletrocardiograma foram realizados nas etapas do pré-estudo (seleção) e estudo (alta do estudo).

5.2.3 – Critérios de inclusão

Os voluntários deveriam satisfazer alguns critérios, como:

- Homens ou mulheres, com idade entre 18 e 50 anos;
- Mulheres não grávidas e que não estejam amamentando;
- Massa corpórea dentro de uma variação de 10%, de acordo com altura e estrutura óssea;
- Boas condições de saúde ou sem doenças significativas;

- Exames físicos, clínicos e psicológicos normais;
- Capacidade de compreender a natureza e objetivo do estudo, inclusive riscos e efeitos adversos.

Após a constatação de que o voluntário atendia esses critérios, foi confirmada sua presença no estudo, pela assinatura no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

5.2.4.- Critérios de Exclusão

O voluntário poderia ser excluído do estudo se manifestasse alguns dos seguintes critérios:

- Hipersensibilidade conhecida da droga estudada ou a compostos relacionados;
- Mulheres com teste positivo de gravidez;
- História de reações adversas sérias;
- Doenças hepáticas ou gastrointestinais que pudessem interferir na absorção, distribuição, excreção ou metabolismo da droga;
- Uso contínuo de manutenção de qualquer droga, exceto anticoncepcionais orais;
- Voluntário fumante;
- Ingestão diária de mais do que 5 xícaras de café ou chá;
- História de abuso de álcool ou droga ou se ingeriu bebidas alcóolicas nas 48 horas que antecedem o período de internação para iniciar o estudo;
- Exames clínicos e laboratoriais fora da normalidade;
- Uso de qualquer medicação regular dentro de 2 semanas que antecedem o estudo e a data de avaliação, ou fez uso de qualquer medicação dentro de uma semana, exceto anticoncepcionais orais;
- Internação por qualquer motivo entre 8 semanas anteriores ao estudo e avaliação;
- Tratamento nos últimos 3 meses anteriores ao início do estudo e avaliação, com qualquer droga da qual se conheça o potencial tóxico;

- Voluntário que participou de qualquer estudo experimental ou ingeriu qualquer droga experimental nos últimos 3 meses;
- Voluntário que doou ou perdeu 450 mL ou mais de sangue nos 3 meses anteriores ao estudo ou que tenha doado mais de 1500 mL dentro dos últimos 12 meses anteriores à avaliação e início do estudo;

5.2.5 – Critérios da retirada

a) Solicitação por parte do voluntário de retirar-se do estudo por qualquer um dos motivos:

- Não desejasse continuar o estudo por razões pessoais;
- Efeitos adversos da droga do estudo;
- Indisponibilidade, intolerância aos procedimentos do estudo, ou mesmo por vontade própria;

b) O investigador responsável pelo estudo poderia retirar o voluntário por uma das seguintes razões:

- Resposta positiva à reavaliação de qualquer critério de exclusão;
- Não aderência às exigências do protocolo;
- Eventos adversos e sintomas ou sinais de possível toxicidade;
- Doença intercorrente requerendo medicação;
- Qualquer condição notificada pelo investigador para manutenção da saúde do voluntário;

5.3 – Local da internação

Após a seleção, e observado um período de pelo menos duas semanas sem fazer uso de qualquer medicação, os voluntários considerados qualificados para participar do estudo foram convidados a apresentarem-se à sede da Syncrophar, em Campinas/SP, até às 18 horas na noite anterior de cada período

do estudo para uma reunião pré-internação, seguida de avaliação médica. O grupo foi conduzido para a internação à Clínica São Lucas, em Americana/SP.

Os voluntários foram internados na Clínica São Lucas, por volta das 20:00 horas da noite anterior de cada tratamento, e permaneceram na unidade até 14 horas, após a administração da medicação. A clínica possui uma unidade para ensaios clínicos, com 26 leitos e posto de enfermagem. A enfermaria possui carrinho de emergência com desfibrilador, monitor, oxímetro, respirador, material para pequena cirurgia e com medicação de emergência para qualquer eventualidade. Há na clínica em anexo uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Sua estrutura laboratorial possui equipamento para processamento e armazenamento de amostras biológicas.

Os voluntários tiveram assistência e cuidados especializados durante todos os períodos de tratamento, o que incluiu uma averiguação sumária das condições na internação e no momento da alta.

5.4- Período de jejum e alimentação

Após a entrada no hospital, os voluntários fizeram sua última refeição do dia (jantar padronizado), começando o jejum a partir das 21:00 horas (pelo menos 10 horas de jejum) da noite do internamento até 4 horas após a ingestão da medicação, quando um almoço padronizado foi oferecido, entre 7 e 8 horas, após a administração foi oferecido um lanche da tarde padronizado, após 10 a 12 horas da administração, foi servido um jantar padronizado e ceia, após 13 horas da medicação, todos os voluntários receberam a mesma dieta.

5.4.1 – Administração de líquidos

Os voluntários ficaram livres para a ingestão de líquidos, isentos de xantina desde o início da internação até 6 horas antes da administração da medicação, quando ficaram em jejum completo, inclusive de líquidos.

No momento da administração da medicação, foram ingeridos 200 mL de água, 2 horas após foram ingeridos mais 200 mL de água, e 4 horas após a administração da medicação os voluntários ficaram livres para a ingestão de líquidos, isentos de xantina.

5.5-Dosagem e posologia no tratamento do estudo

A identificação dos medicamentos foi feita da seguinte forma:

- **Formulação Teste:** Besilato de Anlodipino comprimido de 10 mg produzido pela Arrow Farmacêutica S.A
- **Formulação Referência:** Norvasc[®] (Besilato de Amlodipina) comprimido de 10 mg produzido pela Pfizer Ltda.

Os voluntários receberam, em cada período de internamento, obedecendo uma lista de randomização (vide tabela 1), um comprimido contendo 10 mg de umas das formulações acima discriminadas por via oral em dose única, com um copo de água mineral (200 ml). Após, foram coletadas amostras de sangue de, pelo menos, 3 meias-vidas. Os períodos de tratamento obedeceram a um intervalo mínimo de 7 meias-vidas entre eles ("wash-out"). Os voluntários retornaram à Syncrophar para a coleta correspondente aos tempos de 24, 48, 96, 120, 144 horas após a administração do medicamento, em cada etapa do estudo.

5.6 – Tabela de randomização

Voluntário		Período	Período
Número	Iniciais	1	2
I	AF091082M	T	R
II	CF150169M	R	T
III	CC210762M	T	R
IV	DJ231177M	R	T
V	GA270782M	T	R
VI	LC 020781M	T	R
VII	MF141180M	R	T
VIII	MS170185M	T	R
IX	MS101182 M	T	R
X	PF070678M	R	T
XI	RS111274M	T	R
XII	RF061161M	R	T
XIII	WS060582M	T	R
XIV	AO131070F	R	T
XV	AP190976F	T	R
XVI	AS 070368F	T	R
XVII	CR291275F	T	R
XVIII	ES281166F	R	T
XIX	EP 201181F	R	T
XX	KS040968F	R	T
XXI	KS 080483F	T	R
XXII	LA100267F	R	T
XXIII	PP240480F	T	R
XXIV	RG240678F	T	R
XXV	VS 230379F	R	T
XXVI	VS120557F	R	T

Tabela 1: Lista randomização

5.7- Coleta das amostras

O tempo de coleta de sangue foi registrado usando um relógio de 24 horas.

Em cada período, após pelo menos 8 horas de jejum, o ensaio teve início com uma coleta de 25 mL de sangue para controle individual e curvas padrões. Após 10 horas de jejum, foi feita a coleta de 6 mL dentro de 30 minutos, que antecederam a administração da medicação teste ou referência. Foram coletadas amostras de sangue em tempos pré-determinados.

Um total de 28 amostras de 6 mL foram coletadas, sendo 14 amostras em cada período, somando 250 mL de sangue nos dois períodos, incluindo o volume coletado para os exames pré e pós estudo (vide tabela 2).

A coleta das amostras foi realizada por um catéter heparinizado introduzido na veia superficial do antebraço do voluntário. Após a coleta de cada amostra, o catéter foi lavado com 2 mL de solução de heparina sódica. As mesmas foram identificadas com o código do voluntário, período e data horário da coleta.

5.7.1- Cronogramas das coletas de amostras (Períodos I e II)

Tempo (hh:mm)	Atividade	Outras atividades
00:00*	Coleta de sangue	PA ¹ , pulso, Temperatura
01:00	Coleta de sangue	PA ¹ , pulso, Temperatura
02:00	Coleta de sangue	PA ¹ , pulso, Temperatura
04:00	Coleta de sangue	PA ¹ , pulso, Temperatura
06:00	Coleta de sangue	PA ¹ , pulso, Temperatura
08:00	Coleta de sangue	PA ¹ , pulso, Temperatura
10:00	Coleta de sangue	PA ¹ , pulso, Temperatura
12:00	Coleta de sangue	PA ¹ , pulso, Temperatura
14:00	Coleta de sangue	PA ¹ , pulso, Temperatura
24:00	Coleta de sangue	PA ¹ , pulso, Temperatura
48:00	Coleta de sangue	PA ¹ , pulso, Temperatura
96:00	Coleta de sangue	PA ¹ , pulso, Temperatura
120:00	Coleta de sangue	PA ¹ , pulso, Temperatura
144:00	Coleta de sangue	PA ¹ , pulso, Temperatura

Dados: * dentro de 30 minutos que antecede a administração, P.A – pressão arterial

Tabela 2: Coleta das amostras dos voluntários

5.7.2- Atrasos na coleta das amostras

Alguns voluntários sofreram atrasos na coleta (vide tabela 3). A identificação desses voluntários, o produto administrado, o tempo de coleta e o atraso em minutos são apresentados na tabela abaixo. Esses atrasos foram tomados em conta nos cálculos dos parâmetros farmacocinéticos, sendo que os mesmos não alteraram a confiabilidade dos resultados do estudo.

Voluntários	Fase	Tempo	Atraso
XII	1	96h00	08 minutos
X	1	96h00	33 minutos
XIV	1	48h00	17 minutos
V	2	96h00	06 minutos
XIX	2	144h00	08 minutos
XX	2	120h00	06 minutos
XIV	2	96h00	14 minutos
XXV	2	144h00	15 minutos

Tabela 3: Atrasos nas coletas dos voluntários

5.7.3- Processamento e armazenamento das amostras

Logo após a coleta (máximo 20 minutos), as amostras de sangue foram centrifugadas em torno de 2000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Imediatamente após a centrifugação, o plasma foi retirado (cerca de 2.5 mL) e armazenado em frasco criogênicos, identificado com o nome do estudo, iniciais e número do voluntário, data e hora da coleta, a temperatura de (-20 °C) em freezer específico para armazenagem de amostras biológicas localizado na própria Unidade, Synchrophar.

Ao término da realização das duas etapas do estudo, as amostras foram retiradas do freezer e acondicionadas em caixa térmica, mantidas em baixa temperatura, com adição de gelo em quantidade suficiente para mantê-las congeladas. Essa caixa foi devidamente transportada à Unidade Analítica, em Bragança Paulista (UNIFAG – Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia), onde as amostras foram novamente armazenadas em freezer para posterior quantificação por meio de métodos analíticos de cromatografia líquida de alta eficiência acoplados à espectrometria de massa.

A temperatura máxima e mínima durante o transporte foi registrada e não houve descongelamento das amostras, motivo pelo qual seriam descartadas.

5.8. Amostras de Retenção – Inventário

Foram mantidas em local apropriado amostras de retenção, tanto da formulação-teste quanto da formulação-referência. Estas amostras ficaram armazenadas até vencimento do prazo de validade estabelecido na embalagem do produto.

5.9- Relato de reações adversas

Dos voluntários participantes, 15 apresentaram eventos adversos, mas nenhuma das queixas clínicas foi relacionada à droga. A maioria dos voluntários com esses eventos apresentaram cefaléia leve e também moderada, foram todos devidamente medicados com dipirona gotas e paracetamol gotas.

6-Materiais e Método Analítico

– Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC) acoplada à espectrometria de massa

O HPLC representa um método de elevada eficiência, alta resolução e sensibilidade para separação dos componentes de uma mistura, realizada em duas fases, sendo uma estacionária e a outra, móvel, a qual é eluída sob altas pressões.

As separações das diferentes substâncias presentes no fluido biológico analisado na fase móvel processa-se por interação com a fase estacionária, por processos de participação, absorção ou troca iônica. Os dados obtidos apresentam-se como alturas ou áreas de picos da substância eluída, em diferentes tempos, saindo primeiramente da coluna aquela com menor interação e, por fim, aquela com maior interação com a fase estacionária. A concentração de cada substância é obtida pela relação entre o analito e o padrão interno.

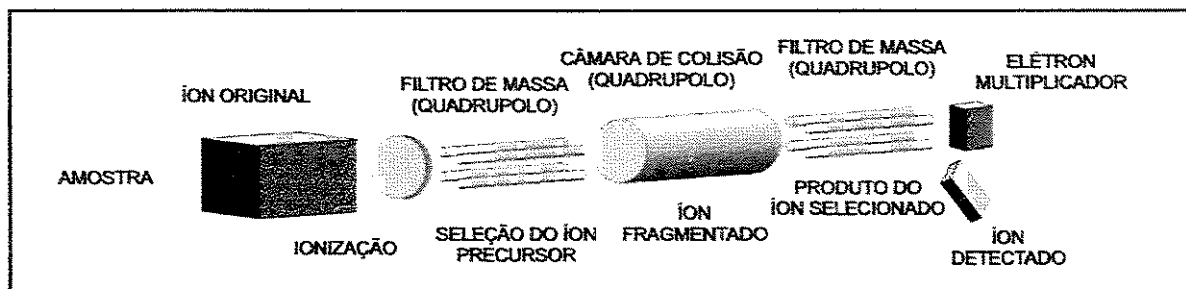
Hoffmann (1996), descreveu a técnica do HPLC acoplado à espectrometria de massa, sendo de elevada especificidade e sensibilidade, o que o torna muito adequado na análise de fármacos e seus metabólitos, substâncias polares e macromoléculas. O HPLC acoplado à espectrometria de massa é um método de separação química utilizado em testes de bioequivalência para análise de fármacos em fluídos biológicos, com a finalidade de purificar o fluido biológico avaliado para posteriormente introduzir as diferentes substâncias separadas no dispositivo de análise, que é o espectrômetro de massas.

As amostras são necessariamente tratadas antes de serem injetadas no HPLC, sendo utilizadas como pré-tratamento a precipitação de proteínas do soro ou plasma, a extração líquido-líquido e líquido-sólido. Esses tratamentos são necessários para impedir que muitas amostras biológicas originem uma grande quantidade de picos interpretáveis devido à multiplicidade de substâncias presentes.

Um padrão interno é adicionado à amostra no início do processo para compensar perdas por transferência e variações de volume nas diferentes etapas, uma vez que o método extrativo do analisado possa vir a interferir na exatidão, precisão e seletividade do processo. A recuperação do analisado não precisa ser necessariamente de 100%, mas a extensão da recuperação do analisado e padrão interno deve ser consistente, precisa e reprodutiva (FDA, 2001).

No espectrômetro de massa, a substância é convertida em forma volátil, introduzida em uma câmara de vácuo e ionizada. Os íons resultantes são acelerados em um campo elétrico como um feixe, o qual é defletido pela aplicação de um campo magnético transversal. No final do equipamento, encontra-se uma estreita fenda, pela qual uma parte do feixe de íons se projeta a um detector, que mede sua intensidade em um instante qualquer. De acordo com a potência do campo magnético e do feixe de íons, passa pela fenda do detector em sequência, originando-se um espectro. O esquema desta operação está demonstrado na figura 3, o qual representa um analisador quadrupolares, conforme descrito por Hoffmann (1996).

Figura 3: *Esquema do espectrômetro de massas*



6.2 – Método Analítico

Determinação de Besilato de Anlodipino em plasma humano, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência no modo MS/MS, utilizando Nimodipino como padrão interno.

6.2.1- Princípios do método

Besilato de Anlodipino e o padrão interno Nimodipino foram extraídos do plasma humano por meio de extração líquido-líquido utilizando Acetato de etila: Hexano 8:2 v/v. Após a extração, as amostras foram secas sob fluxo de ar comprimido, ressuspensas em acetonitrila e analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detecção por Espectrometria de Massas.

6.3- Materiais e equipamentos

Descrição	Fabricante/País de origem
Pipetas de volume variável	Gilson, França
Pipetas de plástico descartáveis	Sigma, USA
Ponteiras de pipeta descartáveis	Axygen, USA
Mesa agitadora (Finemixer)	Fine PCR, Coréia
Misturador (vortex)	Phoenix, USA
Balança Analítica	Precisa 40SM-200A, Alemanha

Tabela 4: Materiais e equipamentos com os fabricantes

Componentes do CLAE

Descrição	Fabricante/País de origem
Espectrômetro de Massas	Micromass, Quattro Micro TM
Gerador de Nitrogênio	Domnick Hunter, UHPLCMS18
Bomba Analítica	HP, Quat Pump Series 1100
Auto-Injetor	HP, ALS Series 1100
Programa	Micromass, Mass Lynx 3.5

Tabela 5: Componentes CLAE e fabricantes

6.4- Padrões

Descrição	Finalidade
Besilato de Anlodipino	analito
Nimodipino	padrão interno

Tabela 6: Padrões utilizados no estudo

6.5- Reagentes

Descrição	Finalidade
Acetonitrila (grau HPLC)	fase móvel soluções padrão de Besilato de Anlodipino e Nimodipino
Água purificada	preparo da fase móvel
Ácido Fórmico	preparo da fase móvel
Acetato de etila (grau p.a)	extração líquido-líquido
Hexano (grau p.a)	extração líquido-líquido

Tabela 7: Reagentes utilizados no estudo

6.6- Material biológico

Quantidades necessárias de plasma humano foram coletadas de indivíduos diferentes, para preparação dos padrões da curva de calibração e das amostras de controle de qualidade, nas seguintes condições:

Condições
plasma humano normal
plasma humano lipêmico
plasma humano hemolisado

Tabela 8: Amostras de material biológico

6.7- Preparo das Soluções

Todas as soluções padrão preparadas foram transferidas para frascos de plástico rotulados, com batoque e tampa de rosca, armazenadas na geladeira a +4°C e substituídas de acordo com os prazos de validade pré-determinados.

6.7.1- Solução Padrão de Besilato de Anlodipino

Uma massa correspondente a 0,00522 g de Besilato de Anlodipino foi pesada, colocada em um balão volumétrico (50,0 mL) e preparada em acetonitrila para a obtenção de uma solução de concentração 100,0 µg/mL.

6.7.2- Solução Padrão de Nimodipino

Uma massa correspondente a 0,00545 g de Nimodipino foi pesada, colocada em um balão volumétrico (50,0 mL) e preparada em acetonitrila para a obtenção de uma solução de concentração 100,0 µg/ml. A partir desta solução, preparou-se soluções de Nimodipino nas concentrações de 30,0 ng/mL.

6.7.3- Solução de Besilato de Anlodipino

Diluyente: Acetonitrila (grau HPLC) com 100,0 µg/mL de Besilato de Anlodipino

6.7.4- Solução de Nimodipino

Diluyente: Acetonitrila (grau HPLC) com:

- 1000,0 ng/mL de Nimodipino em solução
- 30,0 ng/mL de Nimodipino em solução, com volume pipetado(mL) de 3,0/1000,0(ng/mL), com volume final de 100,0 mL e fator de diluição 1:33.33

6.8 –Preparo da Fase móvel

Foi preparada um solução de Acetonitrila-Água (80:20 v/v), contendo 0,1% de ácido fórmico. Para isto, utilizou-se uma proveta de 500mL e adicionou-se 400 mL de acetonitrila e 100 mL de água. Transferiu-se a solução para um erlenmeyer e adicionou-se 500 µL de ácido fórmico. Após homogeneização, a solução foi filtrada e, antes do uso, desgaseificada.

Essa solução foi preparada de acordo com a necessidade e substituída a cada corrida analítica.

6.9 – Preparo dos padrões da curva de calibração

A curva de calibração foi construída pela análise de uma amostra branco (matriz biológica isenta de padrão do fármaco e do padrão interno), uma amostra zero (matriz biológica com adição de padrão interno) e de amostras contendo padrão do fármaco e padrão interno. Os padrões da curva de calibração foram preparados adicionando-se o analito a ser analisado ao plasma humano.

Os dados referentes ao preparo dessa curva de calibração estão mencionados na tabela 9.

Tabela 9: Preparo da Curva de Calibração para o Besilato de Anlodipino

Nível	Amostra	Concentração no plasma (ng/mL)	Volume pipetado (uL)/ Concentração da Solução de Besilato de Anlodipino preparada em plasma (ng/mL)	Volume Final (ml)	Fator de Diluição
B	Branco	0	-	-	-
Z	Zero	0	-	-	-
1	Besilato de Anlodipino	0,2	200 (20,0 ng/mL)	20,0	1:100
2	Besilato de Anlodipino	0,5	500 (20,0 ng/mL)	20,0	1:40
3	Besilato de Anlodipino	1,0	200 (100,0 ng/mL)	20,0	1:100
4	Besilato de Anlodipino	5,0	1000 (100,0 ng/mL)	20,0	1:20
5	Besilato de Anlodipino	10,0	2000 (100,0 ng/mL)	20,0	1:10
6	Besilato de Anlodipino	20,0	4000 (100,0 ng/mL)	20,0	1:5

Para o preparo do padrão de Besilato de Anlodipino 100,0 ng/mL (em plasma), uma alíquota de 40 µL da solução de Besilato de Anlodipino 100,0 µg/mL (preparada em acetonitrila) foi transferida para um tubo de vidro, o solvente foi seco sob fluxo de ar comprimido e o resíduo foi ressuspenso em 40,0 mL de pool de plasma branco. A partir dessa solução, foram feitas diluições, com pool de plasma branco, para o preparo dos padrões da curva de calibração.

6.9.1- Preparo das amostras dos controles de qualidade

Os controles de qualidade (CQ) foram utilizados para determinar o Limite de Quantificação (LQ) do método analítico, sendo para isso realizadas análises da matriz biológica, contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis e também para determinar os controles de qualidade baixos (CQB), controles de qualidade médios (CQM) e

os controles de qualidade altos (CQA). Esses controles foram utilizados para monitorar a precisão e exatidão do método de quantificação durante os ensaios.

Todas as amostras do controle de qualidade foram preparadas adicionando-se o analito a ser analisado ao plasma humano.

Os dados referentes a esse preparo estão demonstrados na tabela 10.

Tabela 10: Preparo dos controles de qualidade

CQ	Analito	Concentração no plasma (ng/mL)	Volume pipetado (µL)/ Concentração da Solução de Besilato de Anlodipino preparada em plasma (µg/mL)	Volume Final (mL)	Fator de Diluição
LQ	Besilato de Anlodipino	0,2	200 (20,0 ng/mL)	20,0	1:100
CQB	Besilato de Anlodipino	0,6	180(100,0 ng/mL)	30,0	1:166,6
CQM	Besilato de Anlodipino	8,0	2400 (100,0 ng/mL)	30,0	1:12,5
CQA	Besilato de Anlodipino	16,0	4800 (100,0 ng/mL)	30,0	1:6,25

Para o preparo dos controles de qualidade LQ, CQB, CQM e CQA, alíquotas de 200, 180, 2400 e 4800 µL (da solução de Besilato de Anlodipino de 20,0 ng/mL e 100,0 ng/mL preparada em plasma), respectivamente, foram colocados tubos de vidro e os volumes completados com pool de plasma branco.

6.10- Validação intra-lote

A precisão e exatidão intra-lote foram determinadas utilizando-se um lote com as seguintes amostras:

- 1) Uma curva de calibração contendo os padrões (fármaco e nimodipino)
- 2) Cinco amostras de cada controle de qualidade (CQB, CQM, CQA).

Os seguintes critérios foram seguidos para que a precisão e exatidão fossem aprovadas:

- **Precisão:** para os controles CQB, CQM, CQA o coeficiente de variação (CV) não deveria exceder 15% e para LQ, admitiu-se valores menores ou iguais a 20%.

- **Exatidão:** o valor da exatidão para as amostras CQB, CQM, CQA dentro do desvio de 15% do valor nominal e para o LQ, admitiu-se desvios menores ou iguais a 20%.

Os dados da validação intra-lote estão demonstrados nas tabelas 11 e 12.

Tabela 11: Análise Intra-Lote do Controle de Qualidade LQ

Replicas	LQ (lote 1)	LQ (lote 2)	LQ(lote3)
1	0,20	0,20	0,17
2	0,19	0,19	0,18
3	0,21	0,19	0,17
4	0,20	0,17	0,18
5	0,19	0,19	0,19
Média	0,20	0,19	0,18
DP	0,01	0,01	0,01
CV (%)	4,23	5,83	4,70
Exatidão(%)	99,00	94,00	89,00

Concentração nominal: LQ=30,0 ng/mL, DP=Desvio Padrão e CV= coeficiente de variação

Tabela 12: Análise Intra-Lote dos Controles de Qualidade CQB, CQM, CQA

Replicas	CQB	CQM	CQA
1	0,64	8,45	15,81
2	0,61	8,14	16,47
3	0,59	8,15	16,07
4	0,63	8,14	15,96
5	0,63	8,32	15,62
Média	0,62	8,24	15,99
DP	0,02	0,14	0,32
CV (%)	3,23	1,70	2,00
Exatidão(%)	103,33	103,00	99,91

Concentração nominal: CQB=0,6ng/mL, CQM=8,0ng/mL e CQA=16,0ng/mL

DP=Desvio Padrão e CV= coeficiente de variação

6.11- Validação inter-lote

Os seguintes critérios foram seguidos para que a precisão e exatidão fossem aprovadas:

- **Precisão:** para os controles CQB, CQM, CQA o coeficiente de variação (CV) não deveria exceder 15% e para LQ, admitiu-se valores menores ou iguais a 20%.
- **Exatidão:** o valor da exatidão para as amostras CQB, CQM, CQA dentro do desvio de 15% do valor nominal e para o LQ, admitiu-se desvios menores ou iguais a 20%.

Os dados da validação inter-lotes estão demonstrados nas tabelas 13 e 14.

Tabela 13: Análise Inter-Lotes do Controle de Qualidade LQ

	<i>LQ(ng/mL)</i>
<i>Média</i>	0,19
<i>DP</i>	0,01
<i>CV (%)</i>	6,42
<i>Exatidão(%)</i>	94,00

Concentração nominal: LQ=0,2 ng/mL, DP=Desvio Padrão e CV= coeficiente de variação

Tabela 14: Análise Inter-Lotes dos Controles de Qualidade CQB, CBM e CQA

Réplicas	CQB (lote 1)	CQB (lote 2)	CQB (lote 3)	CQM (lote 1)	CQM (lote 2)	CQM (lote 3)	CQA (lote 1)	CQA (lote 2)	CQA (lote3)
1	0,57	0,62	0,64	7,56	7,74	8,45	17,08	15,53	15,81
2	0,56	0,60	0,61	7,64	7,74	8,14	16,37	15,04	16,47
3	0,58	0,61	0,59	7,54	7,64	8,15	17,31	15,16	16,07
4	0,55	0,62	0,63	7,36	7,66	8,14	17,53	15,18	15,96
5	0,57	0,62	0,63	7,89	7,46	8,32	17,00	15,23	15,62
Média	0,57	0,61	0,62	7,60	7,65	8,24	17,06	15,23	15,99
DP	0,01	0,01	0,02	0,19	0,11	0,14	0,44	0,18	0,32
CV(%)	2,01	1,46	3,23	2,54	1,50	1,70	2,56	1,20	2,00
Exatidão(%)	94,33	102,33	103,33	94,98	95,60	103,00	106,61	95,18	99,91
	CQB			CQM			CQA		
Média	0,60			7,83			16,09		
DP	0,03			0,33			0,83		
CV(%)	4,71			4,26			5,19		
Exatidão(%)	100,00			97,86			100,57		

6.12- Preparo das análises

Montagem da sequência de determinações das amostras

Cada lote contém as seguintes amostras:

1) Uma curva de calibração composta por uma amostra branca (matriz biológica isenta de padrão do fármaco e do padrão interno), uma amostra zero (matriz biológica com adição do padrão interno) e amostras contendo padrão do fármaco e padrão interno.

Cada amostra, desde a amostra branco até o último padrão de calibração, foi incluída sem réplica. As concentrações dos padrões da curva de calibração foram checadas pelo cálculo de volta (back-calculation) e, caso esses valores

estivessem dentro das especificações da curva, a mesma serviria de base para determinar a concentração do fármaco nas amostras. Caso contrário, outra curva deveria ser construída. Os dados da curva de calibração ficaram armazenados no software.

2) As amostras para análise, sem réplicas.

3) Controles de qualidade (CQB, CQM, CQA) intercalados em intervalos adequados, dependendo do número total de amostras a serem determinadas.

Nota: Foram realizadas as análises com uma única amostra, sem réplica, pois a metodologia estava validada e os parâmetros sensibilidade, precisão e exatidão foram determinados e qualificados dentro dos limites aceitáveis.

6.12.1 – Extração das amostras

Os procedimentos de extração das amostras foram aplicados para as amostras analisadas dos voluntários, para os padrões das curvas de calibração e para as amostras do controle de qualidade.

A extração do analito (Besilato de Anlodipino) e do padrão interno (Nimodipino) das amostras biológicas foram realizadas conforme os passos a seguir:

1) Em tubos de microcentrifuga, colocou-se 300 µL de plasma, 25 µL da solução padrão interno (Nimodipino 30,0 ng/mL), 10 µL de hidróxido de sódio 0,5 mol.L⁻¹, 1000 µL de Acetato de Etila: Hexano 8:2 (v/v) e agitou-se por 5 minutos na mesa agitadora (posição 9).

2) Centrifugou-se as amostras a 14000 rpm, durante 5 minutos, a 4°C.

3) Transferiu-se 800 µL do sobrenadante para tubos de microcentrifuga, evaporou-se o solvente sob fluxo de ar comprimido, ressuspendeu-se o resíduo em 150 µL de acetonitrila e agitou-se por 1 minuto na mesa agitadora (posição 9).

4) Transferiu-se 150µL das amostras para inserts de vidro descartáveis e injetou-se alíquotas de 15µL no sistema cromatográfico.

6.13- Condições Cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas usando uma coluna analítica ALLTECH – NOVOSEP A-1 ANION (50,0 x 4,6 mm) e uma pré-coluna SECURITYGUARD™ C₁₈ (4,0 x 3,0 mm), mantidas a temperatura ambiente (~20°C).

O Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência com detecção por Espectrometria de Massas modo MS/MS foi programado para operar com fluxo de 0,15 mL/min, volume de injeção de 15 µL e o tempo total de corrida foi ajustado para 4,5 minutos.

Os tempos de retenção característicos do Besilato de Anlodipino (analito) foram de 1,9 minutos e do Nimodipino (padrão interno) foi de 3,0 minutos.

6.14- Condições de detecção no espectrômetro de massas no modo MS/MS

Os parâmetros do equipamento utilizados foram:

- Fonte de ionização por electrospray operando em modo positivo (ES+);
- MRM (Monitoramento de Reação Múltipla): 408,80 > 237,60 e 418,60 > 342,60 para monitoramento do Besilato de Anlodipino e do Nimodipino, respectivamente;
- Temperatura da fonte foi de 150°C e dessolvatação de 300°C;
- Fluxo dos gases do cone e dessolvatação foram 60 e 362L/h, respectivamente;
- Valores de voltagem do capilar, cone e energia de colisão foram, respectivamente, 0,5 kV, 10,0 V e 10,0 eV para o Besilato de Anlodipino e 0,5

kV, 15,0 V e 10 eV para o Nimodipino, tendo como pressão de Argônio para a dissociação $2,5 \times 10^{-3}$ mbar.

6.15- Estabilidade das amostras

A estabilidade das amostras do plasma do controle de qualidade (CQB,CQM,CQA) foram submetidas a testes de estabilidade a curto prazo (12 horas) a temperatura ambiente; a estabilidade em 3 ciclos de congelamento e descongelamento (-20°C por 24 horas, descongelamento natural a temperatura ambiente; extraídas e analisadas e novamente congeladas a -20°C por 12 horas, repetindo este procedimento por mais 2 vezes consecutivas) e a estabilidade de longa duração.

A estabilidade de longa duração avaliou o comportamento do fármaco no intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra e a análise da última amostra dos voluntários, que, nesse estudo, utilizou as amostras armazenadas a -20°C por um período de 72 dias, sendo esse tempo superior ao especificado entre a primeira coleta e a última análise.

As amostras do plasma (CQB,CQM,CQA) submetidas a estabilidade curta, congelamento-descongelamento e longa duração foram quantificadas e comparadas com amostras recém preparadas e os resultados demonstraram que o Besilato de Anlodipino no plasma humano é estável nas condições mencionadas, com pequenos desvios dentro dos limites 15% permitidos.(RDC 135, maio de 2003/ANVISA).

6.16- Análise farmacocinética e estatística

A análise farmacocinética foi realizada com o apoio dos seguintes software Excel versão 97, Sistema SAS® (Statistical Analysis System) com versão 8.2.

As análises estatísticas foram conduzidas após transformação logarítmica para os valores ASC, $C_{\max}$ e $T_{\max}$.

Foi empregada uma análise de variância (ANOVA) para o modelo de 2 períodos cruzados, sob os dados de ASC e $C_{\max}$, transformando logaritmicamente, a qual considerou como modelo os efeitos de seqüência, voluntário dentro da seqüência, tratamento e período.

Foram calculados os pontos paramétricos e estimativas dos intervalos da razão T/R (formulação teste / formulação referência) para os valores ASC e $C_{\max}$. A biodisponibilidade relativa da formulação teste *versus* referência foi avaliada pelas razões das médias geométricas (pontos estimados). O intervalo de confiança de 90% serviu como estimativa de intervalo e foi determinado por análises paramétricas (dois testes t unicaudais, com nível de significância 0,05).

7- Resultados

Os voluntários receberam assistência e cuidados no pós-estudo, e 3 dias após a última coleta de sangue do ensaio foram realizados exames pós-estudo laboratoriais, os mesmos mencionados no pré-estudo (seleção), com exceção sorologia e exame clínico físico. Uma avaliação clínica comparativa foi realizada e após confirmação de normalidade, os voluntários receberam alta do estudo.

As queixas clínicas por parte dos voluntários não apresentaram nenhuma implicação na coleta dos dados e no resultado final do estudo clínico. Dessa forma, o estudo transcorreu sem nenhum evento adverso sério, com o mesmo número de voluntários inclusos.

A curva de calibração foi gerada com seis parâmetros, contendo fármaco e padrão interno, em triplicata, utilizando-se uma curva média, por meio das réplicas, para determinar as concentrações do analito nas amostras.

Os cálculos das concentrações das amostras foram baseados em função da curva de calibração construída para o fármaco analisado, no sistema de dados do Mass Lynx 3.5, utilizando os padrões de calibração. As funções de calibração foram calculadas pelas razões entre as áreas dos picos do Besilato de Anlodipino e do padrão interno Nimodipino. As concentrações do analito nas amostras foram calculadas a partir da equação de regressão linear da reta, obtida com a curva de calibração (concentração de Besilato de Anlodipino em função das razões das áreas).

O limite de quantificação foi determinado por análises da matriz biológica, contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis.

As tabelas 15A, 15B, 15C, 15D mostram as concentrações plasmáticas individuais dos medicamentos teste e referência.

A figura 4 representa a média das concentrações plasmáticas do Besilato de Anlodipino (teste e referência), e a tabela 16 demonstra as estatísticas descritivas dos parâmetros farmacocinéticos.

A partir do método analítico utilizado foram averiguadas sua confiabilidade e adequabilidade pela validação dos procedimentos e também foram confirmadas a sensibilidade, especificidade, linearidade, acurácia, precisão e reprodutibilidade, conforme Resolução 899/03, da ANVISA.

A especificidade do método foi confirmada pelas análises das amostras branco de plasma humano, obtidas de seis indivíduos, sendo plasma normal, lipêmico e hemolisado. Cada amostra branco testada, utilizando os procedimentos de extração e as condições cromatográficas propostas para avaliar interferência no tempo de retenção do fármaco, do metabólito ou do padrão interno e os resultados foram comparados com aqueles obtidos com uma solução aquosa do analito a ser analisado em concentração próxima ao Limite de Quantificação (LQ). Os resultados obtidos mostraram que não foram encontradas interferências significativas, como apresentados nos cromatogramas da figura 5.

A detecção no espectrômetro de massas no modo MS/MS operou com fonte de ionização por electrospray em modo positivo (ES+), sendo o MRM (Monitoramento de Reação Múltipla) do analito e padrão interno demonstrado na figura 6.

A precisão e exatidão do método foram determinadas utilizando um lote com amostras da curva de calibração, contendo o padrão e cinco amostras de cada controle de qualidade (CQ-LQ, CQB, CQM, CQA).

7.1- Tabelas

Tabela 15A: Concentrações plasmáticas individuais do Besilato de Anlodipino (produto referência) dos voluntários de 1 a 13.

T(h)	vol.1	vol.2	vol.3	vol.4	vol.5	vol.6	vol.7	vol.8	vol.9	vol.10	vol.11	vol.12	vol.13
0:00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1:00	1,51	0,98	2,06	1,40	0,88	1,41	1,06	1,98	1,59	0,70	1,64	0,96	1,73
2:00	3,05	2,32	3,98	2,49	2,32	3,18	2,45	4,09	4,37	2,21	2,84	1,76	4,01
4:00	5,14	3,08	4,00	4,70	5,18	4,60	3,76	3,60	6,60	3,53	4,43	4,07	5,59
6:00	4,84	3,54	5,30	5,83	7,15	6,20	4,37	5,32	5,46	5,01	5,66	4,91	5,30
8:00	4,55	3,42	4,22	5,40	6,31	5,44	4,59	5,37	3,98	5,49	4,85	4,71	5,12
10:00	3,66	2,50	4,13	5,12	5,72	5,11	4,61	5,87	5,21	5,10	4,35	3,50	4,48
12:00	2,62	2,31	3,48	4,11	5,27	4,86	4,11	5,55	5,14	4,70	3,81	4,09	4,80
14:00	3,33	2,14	3,34	4,36	4,98	4,80	4,17	5,52	5,42	4,76	3,82	3,87	4,75
24:00	2,77	2,04	2,50	3,32	4,52	3,71	3,69	3,79	4,08	4,04	2,86	2,47	3,22
48:00	1,61	1,47	1,55	1,85	3,13	2,06	2,36	2,26	2,63	2,07	1,81	2,03	1,97
96:00	0,65	0,77	0,75	0,72	1,81	1,14	1,15	1,30	1,24	0,89	0,80	0,94	0,77
120:00	0,42	0,58	0,52	0,43	1,41	0,79	0,82	0,97	0,79	0,45	0,53	0,84	0,57
144:00	0,33	0,48	0,31	0,30	1,03	0,57	0,61	0,79	0,52	0,31	0,31	0,59	0,38

Tabela 15B: Concentrações plasmáticas individuais do Besilato de Anlodipino (produto referência) dos voluntários de 14 a 26.

T(h)	vol.14	vol.15	vol.16	vol.17	vol.18	vol.19	vol.20	vol.21	vol.22	vol.23	vol.24	vol.25	vol.26
0:00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1:00	1,06	2,20	1,64	1,03	1,45	1,56	1,97	2,20	2,20	1,12	1,87	1,21	1,53
2:00	3,66	5,60	2,82	2,03	2,80	5,05	4,18	5,05	4,26	2,89	3,79	3,67	2,93
4:00	3,69	6,49	4,05	4,70	4,21	7,22	4,95	5,30	5,91	4,28	3,68	6,14	4,63
6:00	4,96	5,18	5,94	5,44	6,29	7,12	5,82	8,38	6,19	5,41	4,81	6,14	7,99
8:00	4,99	4,99	5,88	6,17	6,52	7,31	5,36	9,17	4,56	5,11	4,68	5,83	6,92
10:00	4,82	4,07	5,55	6,30	6,15	7,13	4,72	9,05	5,10	4,42	4,09	5,78	6,02
12:00	3,83	4,11	5,19	6,47	5,06	6,38	4,42	8,97	4,59	3,82	3,60	5,18	4,93
14:00	4,18	3,98	5,48	6,12	5,05	5,87	4,98	7,80	4,19	4,22	3,48	4,86	5,36
24:00	3,50	3,27	3,98	3,88	4,19	4,76	3,51	5,99	3,84	3,04	3,01	3,74	3,71
48:00	1,53	1,81	1,91	1,89	2,77	2,70	2,49	3,96	2,59	1,78	1,91	2,76	3,15
96:00	0,55	0,70	0,59	0,90	1,31	1,12	0,95	1,48	1,31	0,66	0,62	1,46	1,60
120:00	0,32	0,53	0,41	0,60	0,96	0,70	0,68	1,09	1,00	0,41	0,42	1,07	1,40
144:00	0,00	0,36	0,27	0,36	0,74	0,44	0,48	0,76	0,68	0,31	0,29	0,76	0,95

Tabela 15C: Concentrações plasmáticas individuais do Besilato de Anlodipino (produto teste) dos voluntários de 1 a 13.

T(h)	vol.1	vol.2	vol.3	vol.4	vol.5	vol.6	vol.7	vol.8	vol.9	vol.10	vol.11	vol.12	vol.13
0:00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1:00	1,06	1,09	1,44	0,77	0,53	0,75	0,84	1,90	0,50	1,23	1,70	0,73	0,23
2:00	2,50	2,90	3,64	1,72	2,07	1,87	2,01	4,82	1,95	2,19	2,91	1,47	1,79
4:00	3,19	4,54	5,12	3,25	4,18	4,58	3,28	4,87	3,16	3,48	5,18	3,49	5,15
6:00	3,97	4,75	5,85	4,94	5,88	5,65	4,67	4,94	4,50	5,98	6,20	5,26	5,57
8:00	4,14	4,19	4,81	4,83	5,76	5,85	4,71	4,16	4,60	5,33	6,34	5,13	5,81
10:00	3,69	3,52	4,82	4,47	5,69	5,49	4,55	2,32	4,76	5,30	5,68	4,54	5,07
12:00	3,31	3,19	3,70	4,38	5,56	5,13	4,21	4,19	4,91	4,87	5,48	4,05	4,61
14:00	3,24	3,42	3,90	4,00	5,27	4,32	4,42	3,61	4,43	5,49	5,34	4,12	4,79
24:00	2,57	2,69	3,05	2,76	4,76	3,70	3,45	2,94	3,58	3,76	4,30	3,10	3,50
48:00	1,52	1,63	1,67	1,72	2,98	2,32	2,33	2,09	2,11	2,33	2,64	2,36	2,20
96:00	0,78	0,93	0,76	0,85	1,80	1,18	1,00	0,85	1,00	0,79	1,02	1,03	0,81
120:00	0,52	0,70	0,49	0,52	1,60	0,98	0,78	0,60	0,42	0,45	0,77	0,72	0,56
144:00	0,41	0,54	0,34	0,34	1,31	0,60	0,50	0,29	0,34	0,30	0,49	0,61	0,30

Tabela 15D: Concentrações plasmáticas individuais do Besilato de Anlodipino (produto teste) dos voluntários de 14 a 26.

T(h)	vol.14	vol.15	vol.16	vol.17	vol.18	vol.19	vol.20	vol.21	vol.22	vol.23	vol.24	vol.25	vol.26
0:00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1:00	0,96	3,06	1,79	1,35	1,20	1,07	0,70	1,62	1,57	1,18	1,10	2,58	4,84
2:00	3,26	4,15	2,47	3,82	2,81	3,70	3,11	4,77	4,24	2,90	2,66	5,81	2,12
4:00	2,94	5,29	5,37	5,95	4,55	5,95	4,44	7,12	5,94	4,49	4,43	6,58	8,03
6:00	5,05	5,55	5,47	6,57	6,21	6,75	5,60	9,16	6,73	5,77	5,79	6,62	7,67
8:00	5,05	5,60	6,53	6,59	5,11	6,96	5,07	9,71	5,84	5,08	5,51	7,64	5,67
10:00	4,31	5,01	5,55	6,14	5,57	6,10	4,83	7,14	5,94	4,80	4,71	6,27	7,39
12:00	4,57	4,37	5,64	5,11	5,05	5,63	4,57	7,01	5,15	4,36	4,63	5,68	4,12
14:00	4,64	4,23	5,39	5,85	5,26	5,17	5,10	6,84	5,53	4,04	4,05	5,27	5,55
24:00	3,08	3,87	4,28	4,12	4,58	4,73	3,75	5,70	4,26	2,95	2,80	5,76	4,65
48:00	1,47	1,89	2,29	2,38	3,05	2,71	2,46	4,14	2,75	1,80	1,66	3,49	2,98
96:00	0,39	0,92	0,86	0,84	1,72	1,37	0,94	4,14	1,42	0,68	0,56	1,54	1,72
120:00	0,22	0,53	0,47	0,55	1,13	1,06	0,68	1,68	1,12	0,40	0,37	1,38	1,44
144:00	0,00	0,38	0,29	0,35	0,89	0,68	0,40	1,00	0,63	0,30	0,23	0,97	0,82

Figura 4: Média das concentrações plasmáticas vs tempo

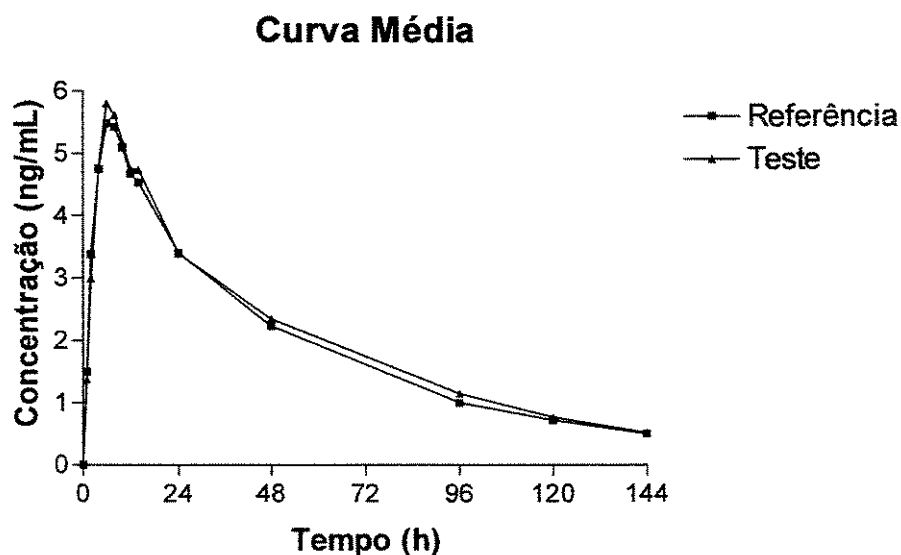


Tabela 16: Estatísticas dos parâmetros farmacocinéticos

Parâmetros	Anlodipino			
	Referência		Teste	
	Média	Desvio Padrão (Amplitude)	Média	Desvio Padrão (Amplitude)
ASC ₍₀₋₁₄₄₎	286.75	57.14	298.53	75.49
ASC _(0-inf)	317.80	81.53	331.19	96.77
C_{max}	5.97	1.13	5.98	1.18
T_{max}	6.00	8.00	7.00	8.00
ke	0.02	0.00	0.02	0.00
T_{1/2}	37.36	26.23	38.44	36.36

Parâmetros	Anlodipino	
	Teste/Referência	
	Média (geométrica)	90% IC
ASC _(0-inf)	103.61%	99.56% a 108.35%
ASC ₍₀₋₁₄₄₎	103.86%	98.87% a 108.57%
C_{max}	100.55%	95.98% a 105.33%

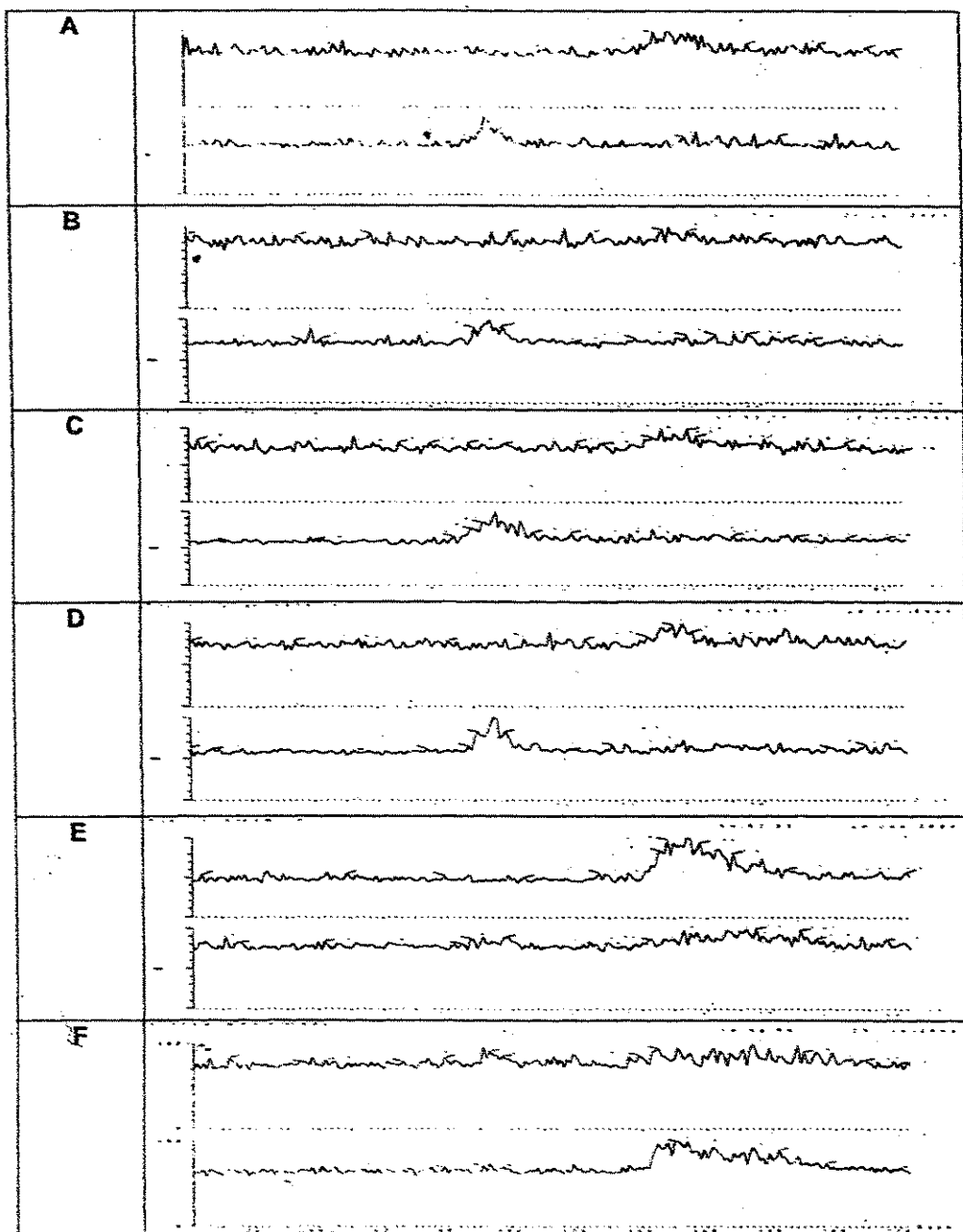


Figura 5: A) Plasma branco normal, lote 16889/6; B) Plasma branco normal, lote 23534/2; C) plasma branco normal, lote 37232/; D) Plasma branco normal, lote 19163/4; E) Plasma branco lipêmico, lote 32513/1; F) Plasma branco hemolisado, lote 34614/4.

Standard Nimodipino in plasma ext

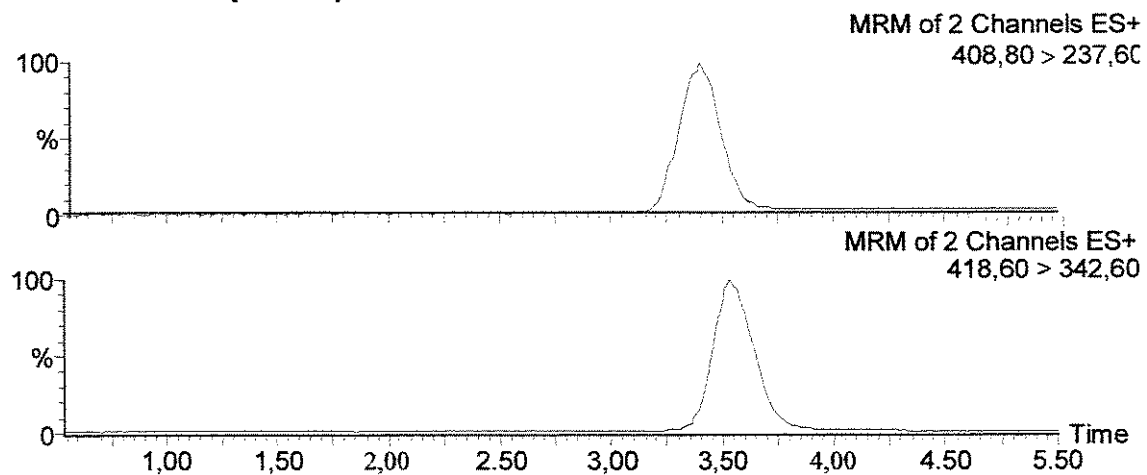


Figura 6: Espectrogramas analito + padrão interno

8- Discussão

Os genéricos representam uma classe de medicamentos com qualidade e segurança assegurada pelos estudos de bioequivalência, nos quais a biodisponibilidade do fármaco é quantificada analiticamente por meio de amostras de plasma humano, após administração oral da droga.

O efeito terapêutico de um medicamento genérico é equivalente ao seu respectivo medicamento inovador, garantindo a dosagem correta para as diversas enfermidades, e é uma alternativa a terapias agudas e crônicas, sendo mais acessível devido aos menores valores monetários.

As etapas do estudo, como seleção dos voluntários, internação e coleta de amostras, quantificação plasmática, avaliação estatística dos resultados e liberação final dos voluntários ocorreram sem anormalidades, conforme estipulado dentro das normas e regras para estudos de bioequivalência.

Na coleta das amostras dos voluntários, houve atrasos relatados na tabela 3, porém, esses dados foram considerados nas análises estatísticas para obtenção dos parâmetros farmacocinéticos e não interferiram na comparação das curvas plasmáticas analisadas e nos resultados do estudo.

Os voluntários foram orientados antes e durante todo o estudo sobre os objetivos e características dessa pesquisa clínica e tiveram assistência médica qualificada, garantindo a obtenção das amostras de sangue e monitorização das condições de saúde dos mesmos.

O estudo clínico transcorreu dentro das expectativas, sem anormalidades e apesar do surgimento de reações adversas, as mesmas não estavam relacionadas ao fármaco anlodipino, e sim a variações de alimentação (período de jejum), que não representam um estado habitual do voluntário. Assim, os voluntários, após todos os intervalos de coleta das amostras e verificação de normalidade no pós-estudo, foram liberados.

O envelhecimento da população, com o aumento das doenças crônicas, sendo que cerca de 40% da população, com faixa etária entre 55 e 60 anos apresenta anormalidades cardíacas, sendo a hipertensão arterial o principal sintoma encontrado, ressaltando também inúmeros casos de angina e insuficiência cardíaca congestiva, gerando elevados gastos públicos com o setor saúde. A terapêutica cardiovascular disponível no mercado farmacêutico é constituída de uma vasta classe de medicamentos, entre eles o grupo dos diidropiridínicos, como o fármaco em estudo, anlodipino.

O método analítico utilizado foi baseado na quantificação da concentração plasmática do fármaco anlodipino por Yasuda (1996) e Carvalho *et.al.* (2001), os quais utilizaram a cromatografia líquida acoplada a um sistema de espectrometria de massa (LC-MS-MS). Yasuda usou o método de ionização química à pressão atmosférica para a produção de íons, e Carvalho realizou em seu experimento a ionização por eletrospray íon positivo, com LOQ de 0.014 ng/mL e tempo de retenção (RT) de 4,5 minutos, e LOQ de 0,1 ng/mL e RT de 3,4 minutos, respectivamente.

Luska (1997) adotou a cromatografia líquida com detecção ultra-violeta (UV) na determinação do comportamento farmacocinético de anlodipino após administração única. Neste experimento, obteve LOQ de 0,2 ng/mL com tempo de retenção muito alto (superior a 40 minutos). Esse mesmo autor, também realizou detecção por eletroforese com LOQ de 5,0 ng/mL e RT de 9,8 minutos. Sendo assim, a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa, representa um método dinâmico e prático para quantificação de substâncias químicas com fluídos biológicos, com demonstração de rapidez na corrida analítica, alta resolução e eficácia. Por essas características, as análises quantitativas das amostras plasmáticas desse estudo de bioequivalência utilizou esse método analítico.

A etapa analítica também prosseguiu normalmente, não relatando interferência nas amostras plasmáticas, como demonstrado no cromatograma plasma branco, hemolisado e normal. O método analítico foi validado (inter-lote e

intra-lote) pela quantificação das concentrações das amostras do controle de qualidade e da concentração do analito nas amostras em estudo.

9-Conclusão

Considerando que os intervalos de confiança de 90% para as razões entre as médias geométricas de C_{max} , $ASC_{(0-144h)}$, $ASC_{(0-inf)}$ relativas à formulação de Anlodipino comprimido 10mg estão dentro dos intervalos estabelecidos pela RDC 135 (maio de 2003/ANVISA), conclui-se que a formulação de Besilato de Anlodipino comprimido 10mg (Arrow Farmacêutica, S.A) é bioequivalente à formulação Norvasc[®] comprimido 10 mg (Pfizer, Ltda).

10- Referências Bibliográficas

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA –
www.anvisa.gov.br , 2004.

BRASIL. Lei nº 9.787, de 10 fevereiro de 1999. Altera a Lei nº6360, de 23 set.1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização do nome genérico em produtos farmacêuticos e dá outras providências, regulamentada pela Resolução 391, 9 agosto 1999. Diário Oficial da União, Brasília, n.152, 10 agosto de 1999.

BRASIL. Resolução nº 391, de 09 agosto de 1999. Regulamenta o artigo 2, da Lei nº 9878, de 10 fevereiro de 1999 e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília.

CARVALHO, M.; OLIVEIRA, C.H.; MENDES, G. D.; SUCUPIRA, M.; MORAES, M. E.A.; DE NUCCI, G. - Amlodipine bioequivalence study: quantification by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Biopharma Drug Dispos**, 22:383-390,2001.

CENTER FOR DRUG EVALUTION AND RESEARCH, FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, U.S. Department of Health and Human Services, 2001. **Statistical Approaches to Establishing Bioequivalence**.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. In vivo bioequivalence guidances. **Pharmacopeial Forum**, 19:6501-6508, 1993.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bioavailability and bioequivalence requirements; abbreviated applications; proposed revisions-FDA. Propose rule. **Fed Regist**,63:64222-64228,1998.

GUYTON, A.C. **Tratado de Fisiologia Médica**. 8ªedição. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, p.78-85, p.88-98, 1992.

HOFFMANN, E.; CHARETTE, J. and STROOBANT V. **Mass Spectrometry, Principles and Applications**, John Wiley and Sons. New York, Ch.2, p.50, 1996.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.128 -129, p.135-142, 1995.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F.F.A.C. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. Edição 2000/2001. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.8.15 - 8.17, 2000.

LUKSA, J; JOSIC, D.J.; KREMSER, M.; KOPITAR, Z.; MILUTINOVIC, S. – Pharmacokinetic behaviour of R-(+)- and S-(-)- amlodipine after single enantiomer administration. **J. Chromatogr B Biomed Appl**, **703**:185-193,1997.

LUKSA, J.; JOSIC, D.; PODOBNIL, B.; FURLAN, B.; KREMSER, M. – Semi-preparative chromatographic purification of the enantiomers S -(-)-amlodipine and R-(+)-amlodipine. **J. Chromatogr B Biomed Appl**, **693**: 367-375, 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Portaria DIMED 16/81. Institui o Termo de Consentimento de Risco, a ser utilizado em todos os ensaios com medicamentos não registrados. D.O.U., 142.12.1981.

SILVA, P. **Farmacologia**. 5ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.583-593, p.604-613, 1988.

SWEETMAN, S.C. **Martindale: Guia completa de consulta farmacoterapeutica**. 1ª edição. Barcelona: Pharma, p.1110, 2002.

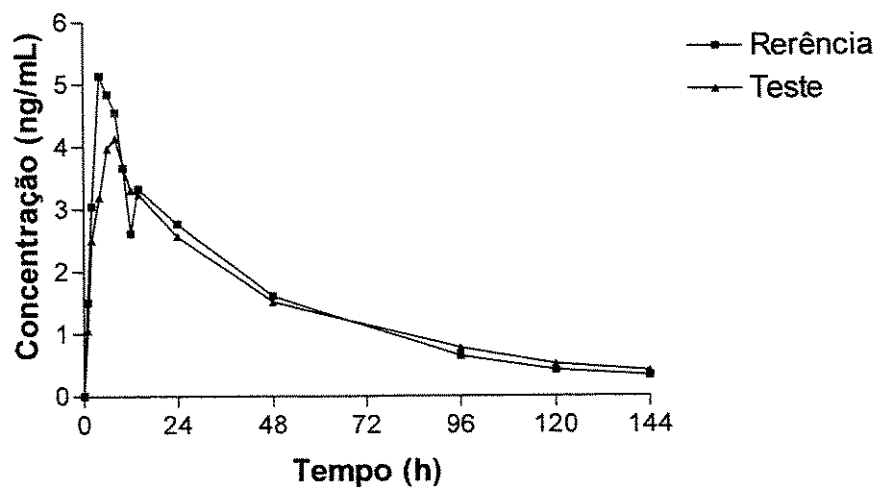
WORLD HEALTH ORGANIZATION. Prosposed WHO Guidelines for Good Clinical Praticice (GCP) ofr tirals no pharmaceutical products. WHO Drug Information 6:170-86, 1992.

YASUDA, T.; TANAKA, M.; IBA K. Quantitative determination of amlodipine in serum by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. **J Mass Spectrom**, 31:879-884,1996.

ZANINI, A.C. & OGA, S. **Farmacologia Aplicada**. 5ª edição. São Paulo: Ed.Atheneu, p.43-63, p.329-337, 1994.

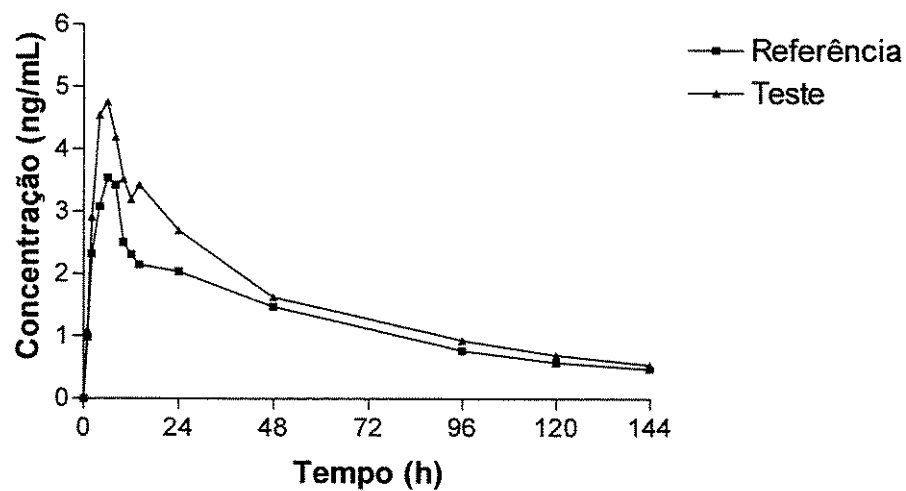
11- Anexos

Vol I



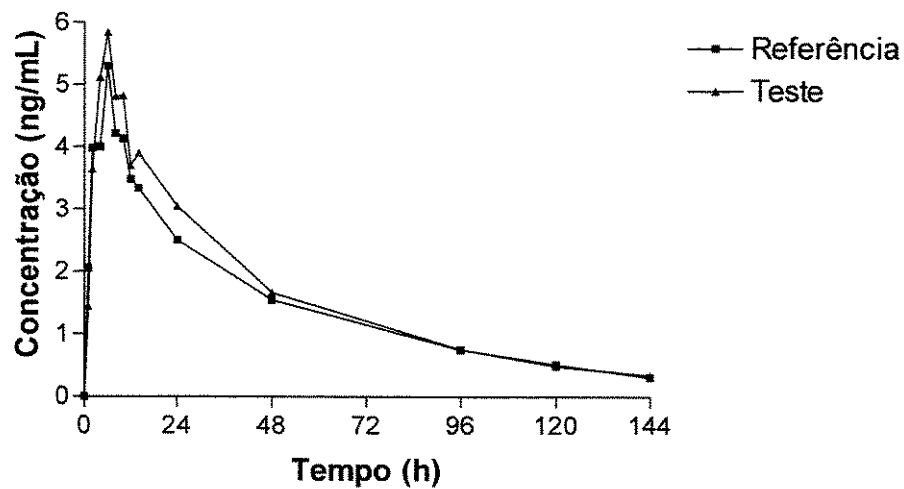
Parâmetro	Formulação Referência	Formulação Teste
ASC _(0-t)	210.18	204.74
ASC _(0-inf)	227.52	229.65
ASC _(0-t) /ASC _{0-inf} (%)	92.38	89.15
C _{max}	5.14	4.14
T _{max}	4.00	8.08
Ke	0.02	0.02
T _{1/2}	36.43	42.11

Vol II



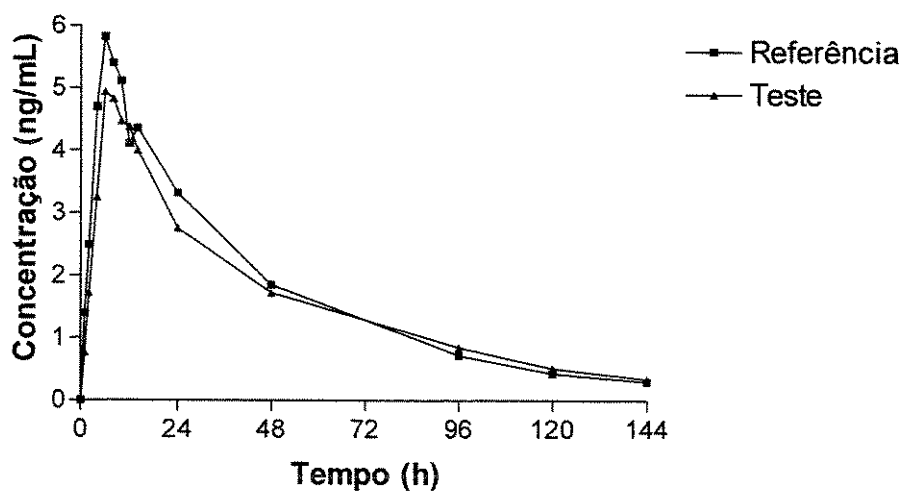
Parâmetro	Formulação Referência	Formulação Teste
ASC _(0-t)	182.00	227.51
ASC _(0-inf)	218.65	264.68
ASC _(0-t) /ASC _{0-inf} (%)	83.24	85.96
C _{max}	3.54	4.75
T _{max}	6.00	6.00
Ke	0.01	0.01
T _{1/2}	52.92	47.72

Vol III



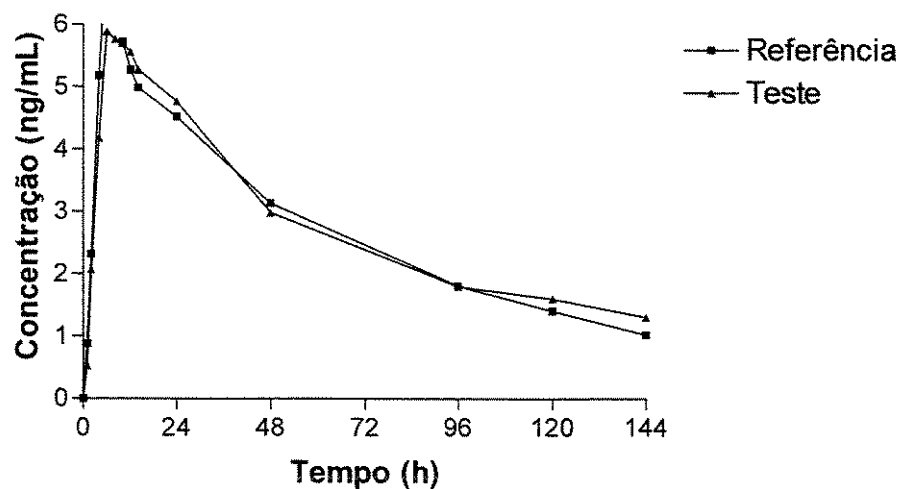
Parâmetro	Formulação Referência	Formulação Teste
ASC _(0-t)	211.83	234.07
ASC _(0-inf)	228.68	251.62
ASC _(0-t) /ASC _{0-inf} (%)	92.63	93.03
C _{max}	5.30	5.85
T _{max}	6.00	6.00
Ke	0.02	0.02
T _{1/2}	37.69	35.78

Vol IV



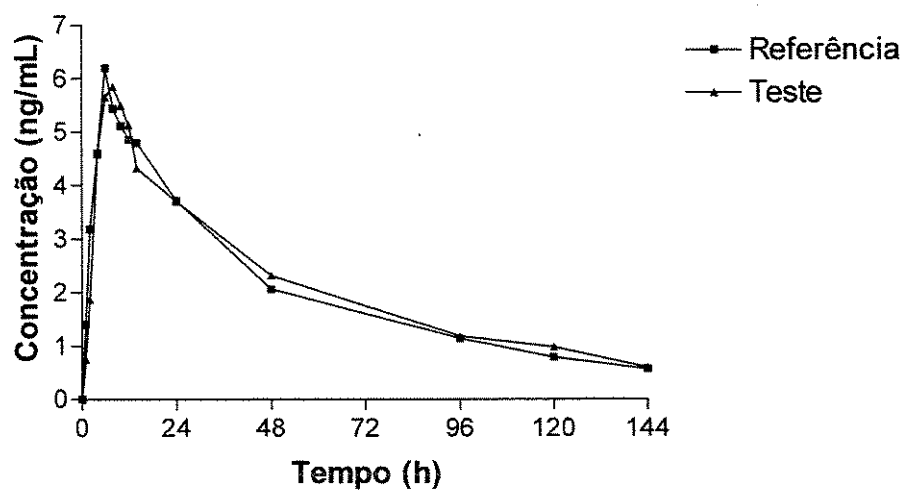
Parâmetro	Formulação Referência	Formulação Teste
ASC _(0-t)	244.50	277.09
ASC _(0-inf)	258.63	244.91
ASC _(0-t) /ASC _{0-inf} (%)	94.54	92.72
C _{max}	5.83	4.94
T _{max}	6.00	6.00
Ke	0.02	0.02
T _{1/2}	32.65	36.33

Vol V



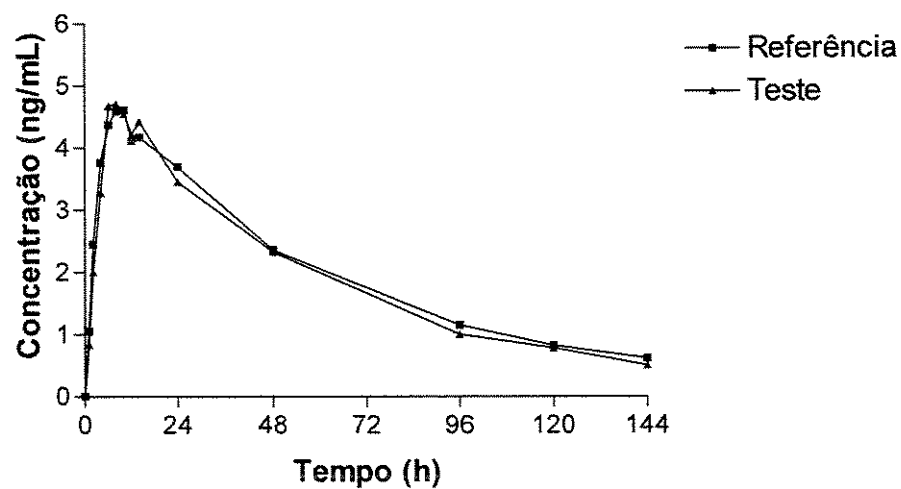
Parâmetro	Formulação Referência	Formulação Teste
ASC _(0-t)	394.47	396.52
ASC _(0-inf)	475.81	511.97
ASC _(0-t) /ASC _{0-inf} (%)	82.90	77.51
C _{max}	7.15	5.88
T _{max}	6.00	6.00
Ke	0.01	0.01
T _{1/2}	54.74	60.88

Vol VI



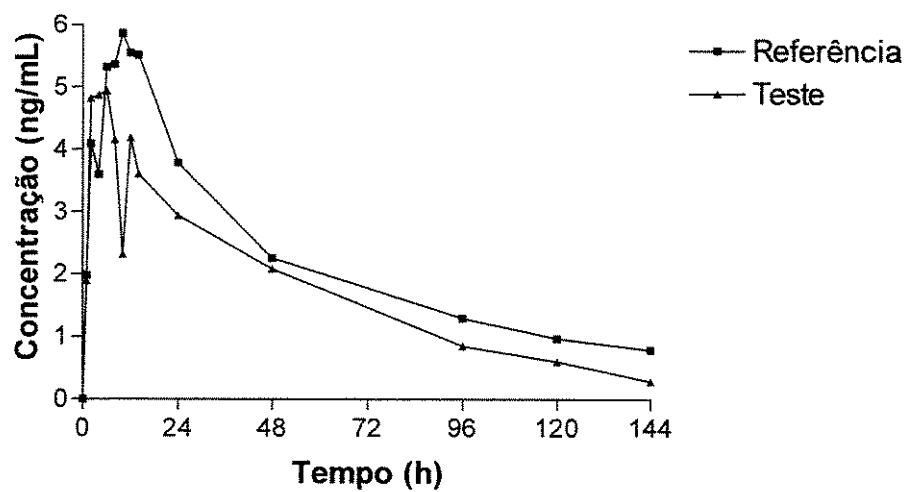
Parâmetro	Formulação Referência	Formulação Teste
$ASC_{(0-t)}$	291.47	302.50
$ASC_{(0-inf)}$	325.81	340.98
$ASC_{(0-t)}/ASC_{0-inf} (%)$	89.46	88.71
C_{max}	6.20	5.85
T_{max}	6.00	8.00
Ke	0.02	0.02
$T_{1/2}$	41.76	44.46

Vol VII



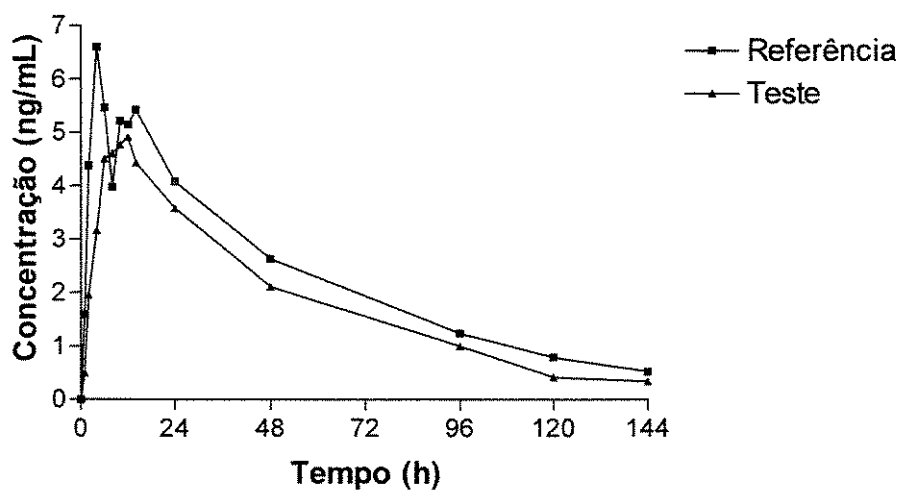
Parâmetro	Formulação Referência	Formulação Teste
ASC _(0-t)	288.83	276.47
ASC _(0-inf)	329.61	306.97
ASC _(0-t) /ASC _{0-inf} (%)	87.63	90.06
C _{max}	4.61	4.71
T _{max}	10.00	8.00
Ke	0.01	0.02
T _{1/2}	46.34	42.29

Vol VIII



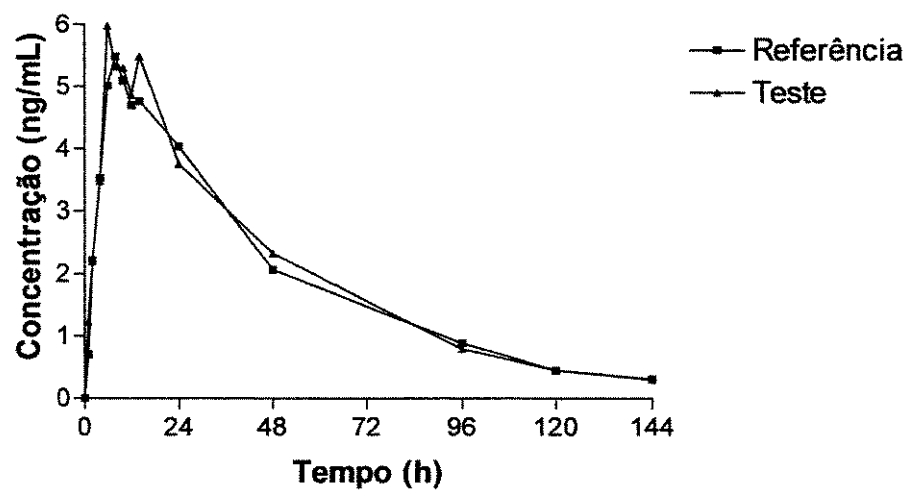
Parâmetro	Formulação Referência	Formulação Teste
ASC _(0-t)	318.01	245.45
ASC _(0-inf)	371.30	261.91
ASC _(0-t) /ASC _{0-inf} (%)	85.65	93.71
C _{max}	5.87	4.94
T _{max}	10.00	6.00
Ke	0.01	0.02
T _{1/2}	46.76	39.35

Vol IX



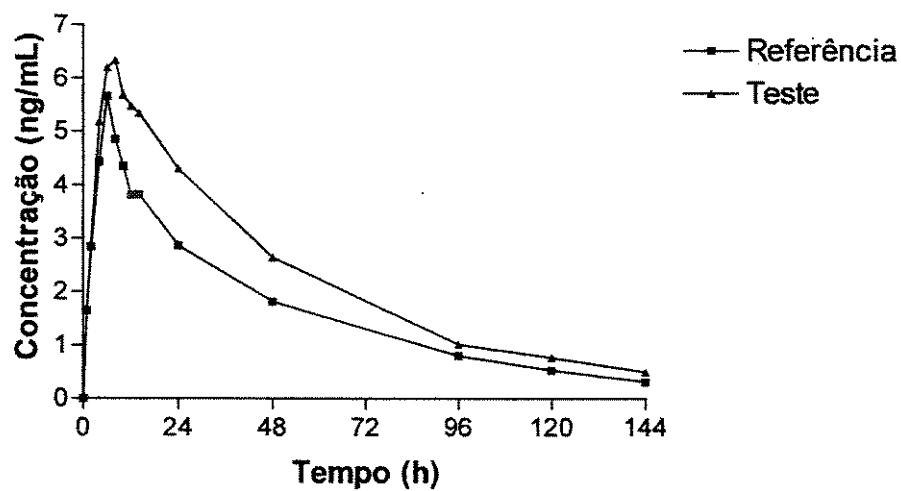
Parâmetro	Formulação Referência	Formulação Teste
ASC _(0-t)	327.33	260.85
ASC _(0-inf)	358.39	277.67
ASC _(0-t) /ASC _{0-inf} (%)	91.33	93.94
C _{max}	6.60	4.91
T _{max}	4.00	12.00
Ke	0.02	0.02
T _{1/2}	41.41	34.31

Vol X



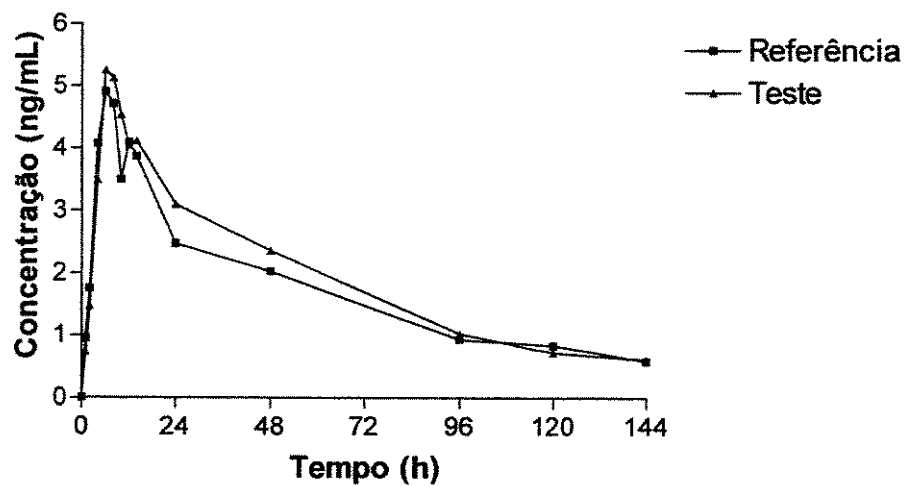
Parâmetro	Formulação Referência	Formulação Teste
ASC _(0-t)	270.44	278.02
ASC _(0-inf)	285.09	291.73
ASC _(0-t) /ASC _{0-inf} (%)	94.86	95.30
C _{max}	5.49	5.98
T _{max}	8.00	6.00
Ke	0.02	0.02
T _{1/2}	32.76	31.69

Vol XI



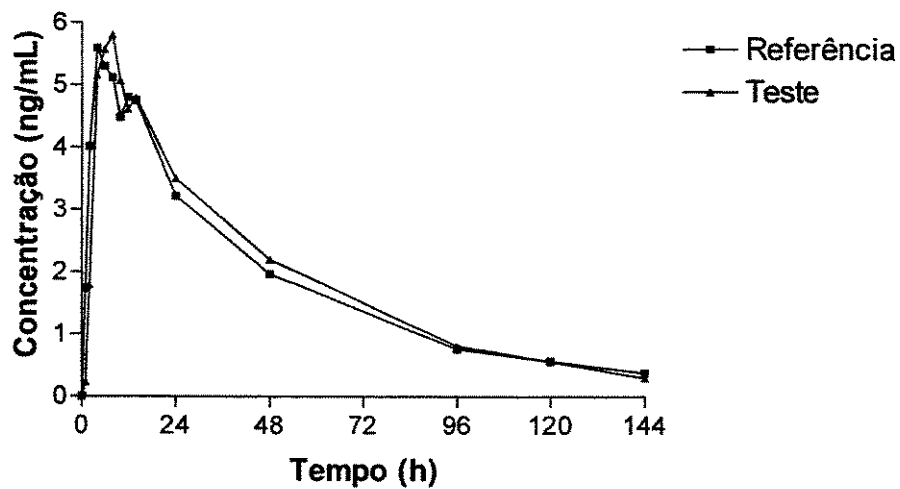
Parâmetro	Formulação Referência	Formulação Teste
ASC _(0-t)	234.04	325.09
ASC _(0-inf)	250.19	351.62
ASC _(0-t) /ASC _{0-inf} (%)	93.54	92.45
C _{max}	5.66	6.34
T _{max}	6.00	8.00
Ke	0.02	0.02
T _{1/2}	36.12	37.54

Vol XII



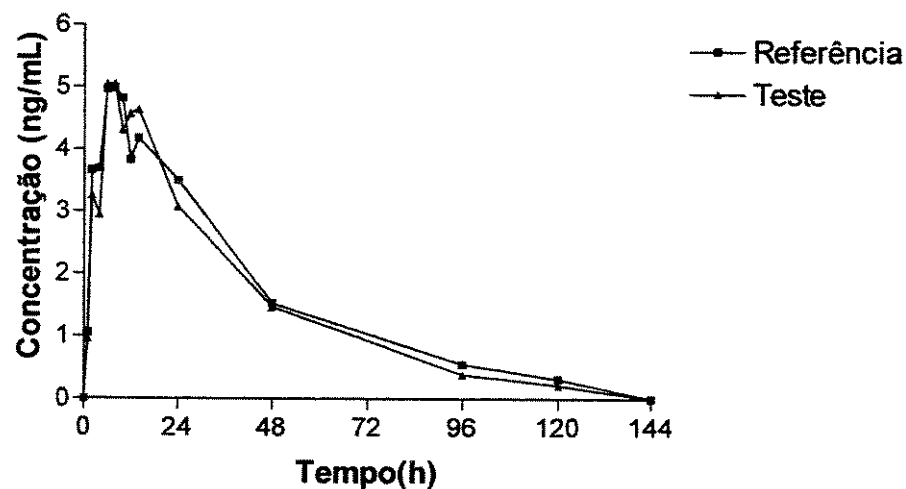
Parâmetro	Formulação Referência	Formulação Teste
ASC _(0-t)	245.53	271.94
ASC _(0-inf)	286.42	310.90
ASC _{(0-t)/ASC_{0-inf}} (%)	85.72	87.47
C _{max}	4.91	5.26
T _{max}	6.00	6.00
Ke	0.01	0.02
T _{1/2}	48.04	44.27

Vol XIII



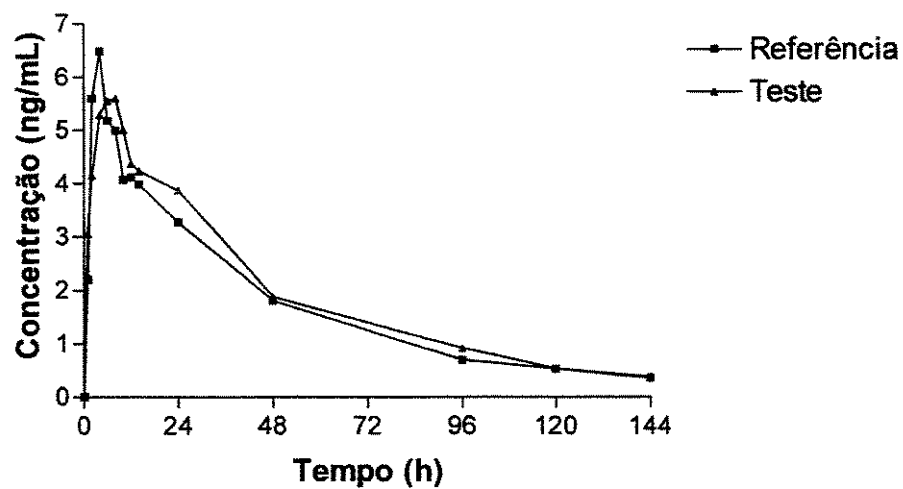
Parâmetro	Formulação Referência	Formulação Teste
ASC _(0-t)	258.45	268.98
ASC _(0-inf)	277.98	283.56
ASC _(0-t) /ASC _{0-inf} (%)	92.97	94.86
C _{max}	5.59	5.81
T _{max}	4.00	8.00
Ke	0.02	0.02
T _{1/2}	35.63	33.69

Vol XIV



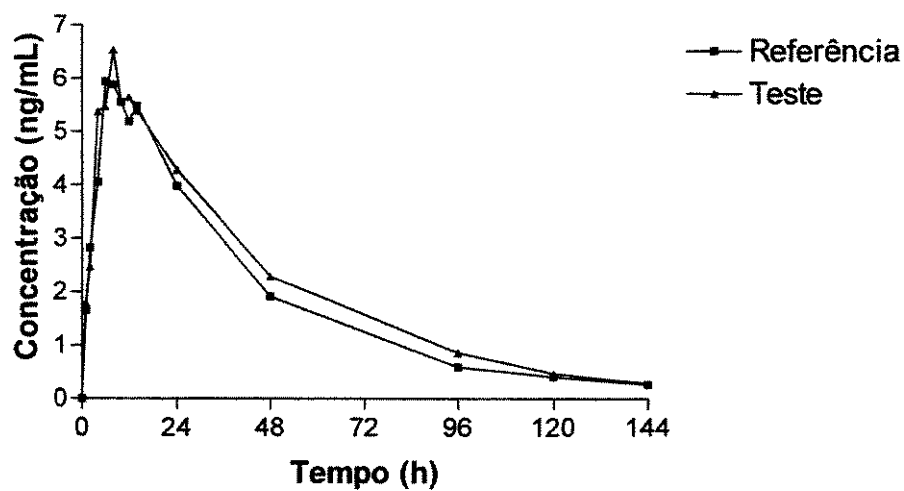
Parâmetro	Formulação Referência	Formulação Teste
ASC _(0-t)	218.69	202.13
ASC _(0-inf)	218.69	201.13
ASC _(0-t) /ASC _{0-inf} (%)	100.00	100.00
C _{max}	4.99	5.05
T _{max}	8.00	8.00
Ke	0.02	0.03
T _{1/2}	28.52	24.52

Vol XV



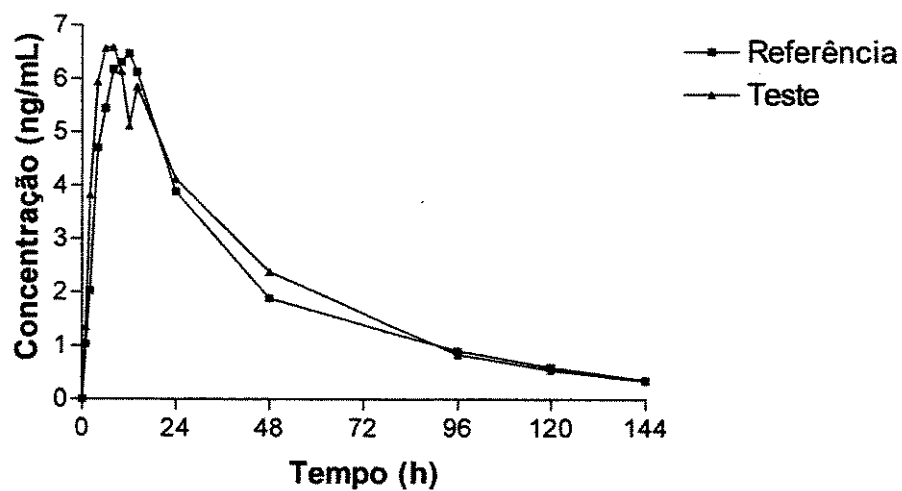
Parâmetro	Formulação Referência	Formulação Teste
ASC _(0-t)	247.15	270.54
ASC _(0-inf)	265.73	290.35
ASC _(0-t) /ASC _{0-inf} (%)	93.01	93.18
C _{max}	6.49	5.60
T _{max}	4.00	8.00
Ke	0.02	0.02
T _{1/2}	35.78	36.14

Vol XVI



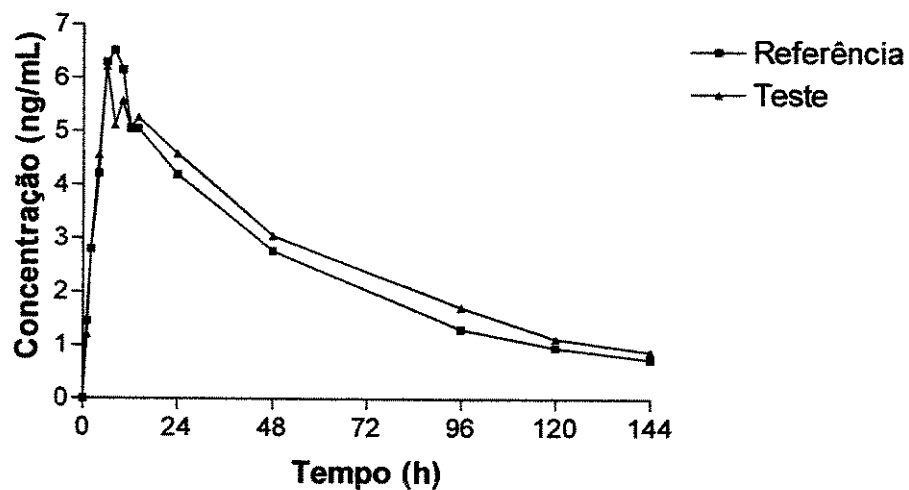
Parâmetro	Formulação Referência	Formulação Teste
ASC _(0-t)	262.71	295.87
ASC _(0-inf)	274.17	308.80
ASC _(0-t) /ASC _{0-inf} (%)	95.82	95.81
C _{max}	5.94	6.53
T _{max}	6.00	8.00
Ke	0.02	0.02
T _{1/2}	29.42	30.89

Vol XVII



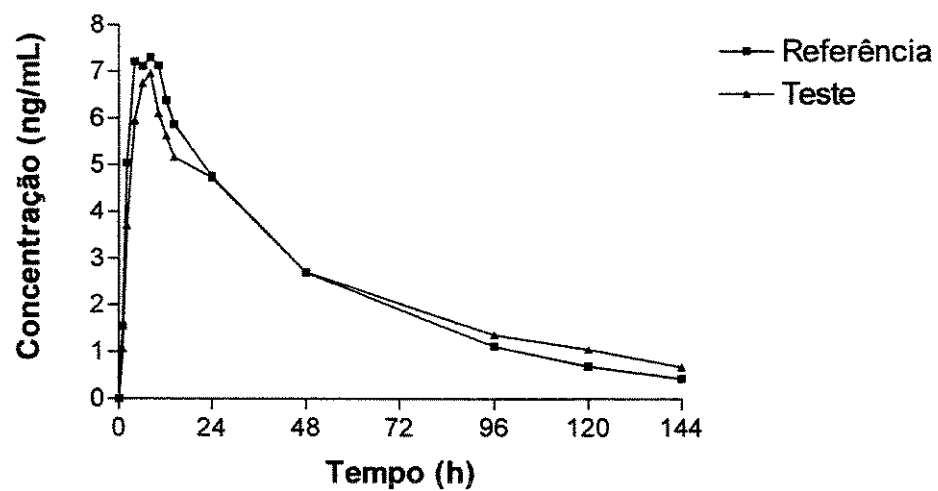
Parâmetro	Formulação Referência	Formulação Teste
ASC _(0-t)	284.08	306.26
ASC _(0-inf)	301.73	322.65
ASC _(0-t) /ASC _{0-inf} (%)	94.15	94.92
C _{max}	6.47	6.59
T _{max}	12.00	8.00
Ke	0.02	0.02
T _{1/2}	33.99	32.45

Vol XVIII



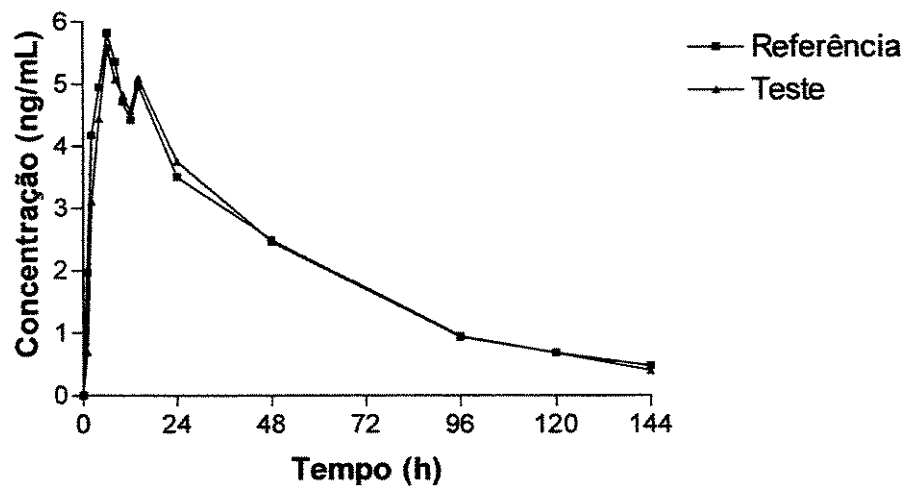
Parâmetro	Formulação Referência	Formulação Teste
ASC _(0-t)	342.44	377.34
ASC _(0-inf)	390.30	442.93
ASC _(0-t) /ASC _{0-inf} (%)	87.74	85.19
C _{max}	6.52	6.21
T _{max}	8.00	6.00
Ke	0.02	0.01
T _{1/2}	44.83	51.09

Vol XIX



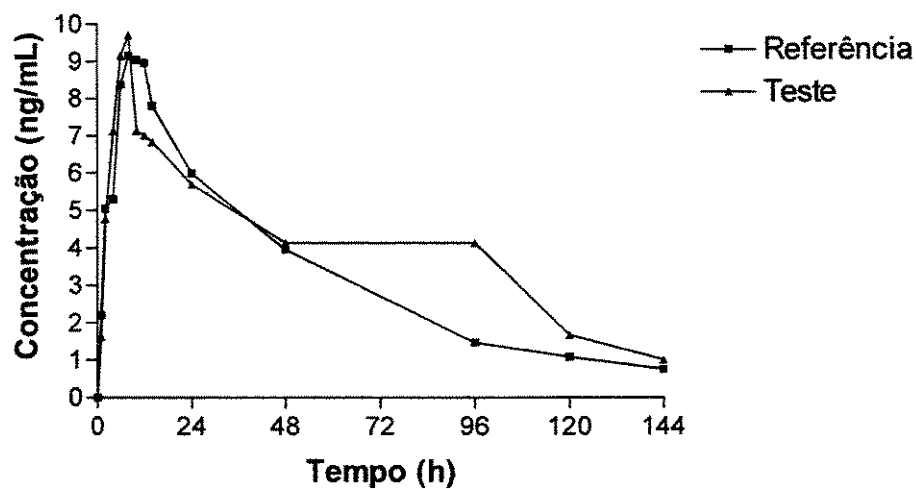
Parâmetro	Formulação Referência	Formulação Teste
ASC _(0-t)	355.20	361.43
ASC _(0-inf)	376.85	404.20
ASC _(0-t) /ASC _{0-inf} (%)	94.26	89.42
C _{max}	7.31	6.96
T _{max}	8.00	8.00
Ke	0.02	0.02
T _{1/2}	34.11	43.60

Vol XX



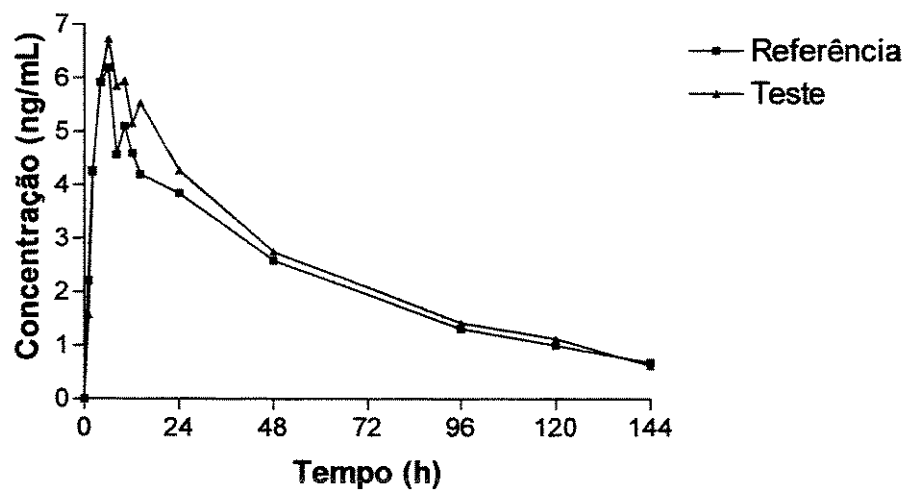
Parâmetro	Formulação Referência	Formulação Teste
ASC _(0-t)	294.25	292.28
ASC _(0-inf)	321.27	313.75
ASC _(0-t) /ASC _{0-inf} (%)	91.59	93.16
C _{max}	5.82	5.60
T _{max}	6.00	6.00
Ke	0.02	0.02
T _{1/2}	39.01	37.20

Vol XXI



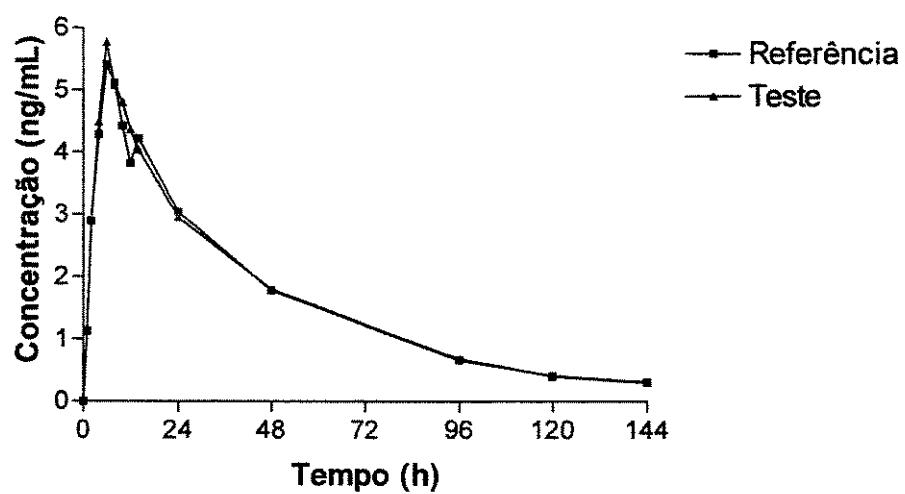
Parâmetro	Formulação Referência	Formulação Teste
ASC _(0-t)	471.27	497.12
ASC _(0-inf)	511.86	567.04
ASC _(0-t) /ASC _{0-inf} (%)	92.07	87.67
C _{max}	9.17	9.71
T _{max}	8.00	8.00
Ke	0.02	0.01
T _{1/2}	37.02	48.47

Vol XXII



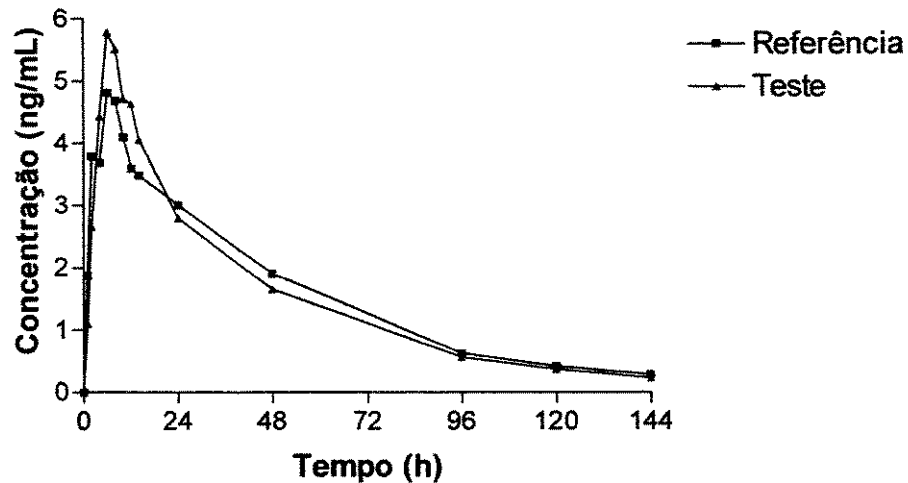
Parâmetro	Formulação Referência	Formulação Teste
ASC _(0-t)	324.27	357.29
ASC _(0-inf)	371.76	397.29
ASC _(0-t) /ASC _{0-inf} (%)	87.23	89.93
C _{max}	6.19	6.73
T _{max}	6.00	6.00
Ke	0.01	0.02
T _{1/2}	48.41	44.01

Vol XXIII



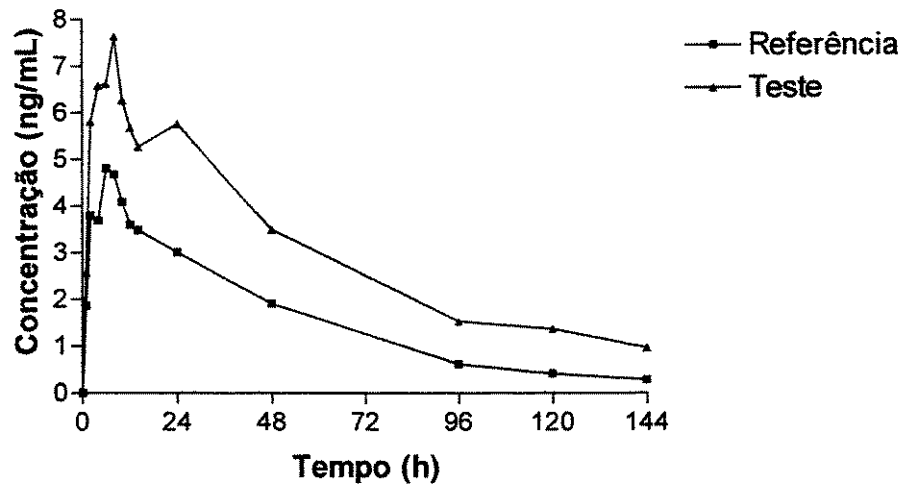
Parâmetro	Formulação Referência	Formulação Teste
ASC _(0-t)	229.94	231.40
ASC _(0-inf)	244.91	245.60
ASC _{(0-t)/ASC_{0-inf}} (%)	93.89	94.22
C _{max}	5.41	5.77
T _{max}	6.00	6.00
Ke	0.02	0.02
T _{1/2}	33.48	32.81

XXIV



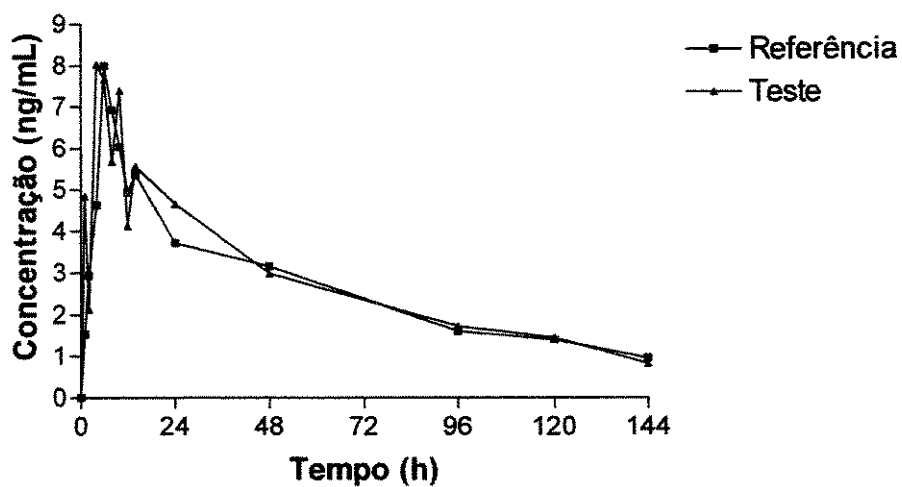
Parâmetro	Formulação Referência	Formulação Teste
ASC _(0-t)	226.14	218.69
ASC _(0-inf)	240.46	228.71
ASC _(0-t) /ASC _{0-inf} (%)	94.04	95.62
C _{max}	4.81	5.79
T _{max}	6.00	6.00
Ke	0.02	0.02
T _{1/2}	34.22	30.19

Vol XXV



Parâmetro	Formulação Referência	Formulação Teste
ASC _(0-t)	344.32	432.55
ASC _(0-inf)	396.22	501.96
ASC _(0-t) /ASC _{0-inf} (%)	86.90	86.17
C _{max}	6.14	7.64
T _{max}	6.00	8.00
Ke	0.01	0.01
T _{1/2}	47.34	49.60

Vol XVI



Parâmetro	Formulação Referência	Formulação Teste
ASC _(0-t)	378.14	399.73
ASC _(0-inf)	449.66	457.83
ASC _(0-t) /ASC _{0-inf} (%)	84.09	87.31
C _{max}	7.99	8.03
T _{max}	6.00	4.00
Ke	0.01	0.01
T _{1/2}	52.19	49.12