

C1
R 2149

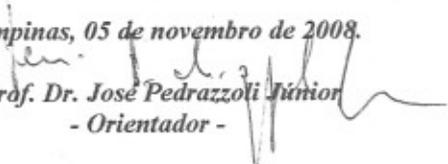
MILENA RODRIGUES MORITA

AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE RELATIVA DE
DUAS FORMULAÇÕES CONTENDO LEVOCETIRIZINA
EM VOLUNTÁRIOS SADIOS

**AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE RELATIVA DE
DUAS FORMULAÇÕES CONTENDO LEVOCETIRIZINA
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 - Milena Rodrigues Morita.

Campinas, 05 de novembro de 2008.


Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior
- Orientador -

CAMPINAS

Unicamp

2008

MILENA RODRIGUES MORITA

**AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE RELATIVA DE
DUAS FORMULAÇÕES CONTENDO LEVOCETIRIZINA
EM VOLUNTÁRIOS SADIOS**

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior

CAMPINAS

Unicamp

2008

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

M826a Morita, Milena Rodrigues
Avaliação da biodisponibilidade relativa de duas formulações
contendo levocetirizina em voluntários sadios / Milena Rodrigues
Morita. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientador : José Pedrazzoli Júnior
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Cromatografia líquida de alta eficiência. 2. Espectrometria de
massas. I. Pedrazzoli Júnior, José. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Evaluation of relative bioavailability from two levocetirizine
formulations in healthy volunteers**

Keywords: • High Performance Liquid Chromatography
• Tandem Mass Spectrometry

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

**Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior
Prof. Dr. Ronilson Aguinaldo Moreno
Profa. Dra. Vera Lúcia Lanchote**

Data da defesa: 05 - 11 - 2008



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior

Membros:

Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior

Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote

Prof. Dr. Ronilson Agnaldo Moreno

Handwritten signatures of the examiners are written over the names. The signature for Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior is at the top, followed by the signature for Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote, and the signature for Prof. Dr. Ronilson Agnaldo Moreno at the bottom.

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

Data: 05/11/2008

DEDICATÓRIA

À Deus

Pegadas na Areia

Sonhei que estava caminhando na praia juntamente com Deus e reví, espelhado no céu, todos os dias da minha vida.

E em cada dia vivido, apareciam na areia duas pegadas: as minhas e as d'Ele.

No entanto, de quando em quando, vi que havia apenas as minhas pegadas, e isso precisamente nos dias mais difíceis da minha vida.

Então perguntei a Deus:

“Senhor, eu quis seguir-Te, e Tu prometeste ficar sempre comigo. Porque deixaste-me sozinho, logo nos momentos mais difíceis?”

Ao que Ele me respondeu:

“Meu filho, Eu te amo e nunca te abandonei. Os dias em viste só um par de pegadas na areia são precisamente aqueles em que Eu te levei nos meus braços.”

Dedico todo meu trabalho ao meu porto seguro, minha família. Em especial à minha mãe Ana e minha avó Luzia, que sempre estiveram presentes e confiantes (mesmo quando eu não estava), me aconselhando e me amando em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior pela oportunidade, orientação e ensinamentos que contribuíram para meu crescimento científico e profissional.

Ao Prof. Dr. Eduardo Meurer, Dr. Edvaldo Capobiango Coelho, Dr. Fábio Alessandro Proença Barros (Cebola) e a Dr^a Claudete Alves pela amizade, colaboração e apoio técnico.

À Daniel Rossi pelo incentivo, pelas valiosas críticas e sugestões e pela amizade.

À Ricardo Buffon, meus mais sinceros e profundos agradecimentos por toda paciência, pela compreensão, pelo imenso apoio e por seu amor que me fizeram fortes para realizar esse projeto.

Às amigas que ganhei de presente durante o mestrado Adriana, Amanda, Ana Cristina, Bete, Calissa, Daniela, Roberta, Renata, Luciana, Lina, Elaine e a todos da UNIFAG pelo convívio diário, profissional e pessoal, que muitas vezes se transformou em sincera amizade, com os quais aprendi muitas coisas e sempre pude contar. Estou certo de que muitas dessas pessoas serão meus amigos durante toda a vida.

À Hayla e Carolina, amigas maravilhosas que sempre acreditaram em mim.

Ao departamento de Farmacologia e a Pós-Graduação da Unicamp.

Sou imensamente grata a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

	PÁG.
RESUMO	xxxv
ABSTRACT	xxxix
1- INTRODUÇÃO	43
1.1- Bioequivalência	45
1.1.1- Parâmetros para Avaliação da Bioequivalência.....	48
1.2- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE / HPLC)	49
1.2.1- Detectores para CLAE.....	50
1.3- Levocetirizina	51
1.3.1- Indicação Terapêutica da Levocetirizina.....	53
1.3.2- Farmacocinética.....	53
2- OBJETIVOS	55
3- MATERIAIS E MÉTODOS	59
3.1- Etapa Clínica	61
3.1.1- Plano do estudo.....	61
3.1.2- População do estudo.....	61
3.1.3- Exames Laboratoriais.....	62
3.1.4- Critérios de inclusão do voluntário.....	64
3.1.5- Critérios de exclusão do voluntário.....	64
3.1.5.1- Problemas relacionados ao fármaco.....	64
3.1.5.2- Doenças ou problemas de saúde.....	64
3.1.5.3- Hábitos e dependências.....	65

3.1.5.4- Condições encontradas nos dias/meses que antecedem o estudo.....	65
3.1.5.5- Outras condições.....	66
3.1.6- Dieta.....	66
3.1.6.1- Administração de Líquidos.....	67
3.1.7- Administração da medicação.....	68
3.1.8- Cronograma de Coleta de Amostras de Sangue.....	68
3.1.9- Aspectos Éticos.....	68
3.1.9.1- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	69
3.1.9.2- Confidencialidade.....	69
3.2- Fase Analítica.....	69
3.2.1- Materiais utilizados no Desenvolvimento e Validação do Método Bioanalítico.....	69
3.2.2- Preparo das Soluções-Padrão.....	71
3.2.2.1- Solução Padrão de Levocetirizina.....	71
3.2.2.2- Solução de Padrão Interno de Fexofenadina.....	71
3.2.3- Fase Móvel utilizada no Trabalho.....	72
3.2.3.1- Preparo da fase móvel Acetonitrila / Água Milli-Q / Ácido Fórmico 88% (80: 20: 0,1 % v/v/v).....	72
3.2.4- Preparo da Solução de Lavagem da Agulha.....	72
3.2.5- Preparo dos padrões da Curva de Calibração.....	72
3.2.6- Preparo das amostras dos controles de qualidade.....	73
3.2.7- Preparo da Corrida Analítica.....	74
3.2.8- Condições cromatográficas.....	75

3.2.9- Condições de detecção no espectrômetro de massas no modo MS/MS.....	76
3.2.10- Validação do método de quantificação.....	76
3.2.10.1- Especificidade/Seletividade.....	76
3.2.10.2- Curva de calibração.....	77
3.2.10.3- Determinação do limite de quantificação.....	78
3.2.10.4- Linearidade.....	78
3.2.10.5- Precisão e exatidão.....	79
3.2.10.6- Determinação das concentrações dos controles de qualidade.....	79
3.2.10.7- Validação intra-lote.....	80
3.2.10.8- Validação inter-lotes.....	81
3.2.10.9- Validação da diluição.....	81
3.2.10.10- Recuperação.....	81
3.2.11- Testes de Estabilidade.....	82
3.2.11.1- Estabilidade no tempo e condições de análise.....	82
3.2.11.2- Estabilidade do fármaco em ciclos de congelamento e degelo.....	82
3.2.11.3- Estabilidade das amostras de plasma não processadas.....	83
3.2.11.4- Estabilidade de soluções padrão.....	83
3.2.11.5- Estabilidade de longa duração.....	83

8- ANEXOS.....	133
Anexo 1.....	135
Anexo 2.....	137
Anexo 3.....	140
Anexo 4.....	143
Anexo 5.....	149
Anexo 6.....	152

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	Análise de Variância
ASC	Área sob a curva
ASC _{0-t}	Área sob a curva desde o tempo 0 até o tempo t
ASC _{0-inf}	Área sob a curva desde o tempo o projetada até o infinito
C _{max}	Concentração máxima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CQB	Controle de Qualidade Baixo
CQM	Controle de Qualidade Médio
CQA	Controle de Qualidade Alto
CV	Coefficiente de Variação
CYP	Citocromo
DP	Desvio Padrão
ECG	Eletrocardiograma
eV	Eletrovolt
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramas
HPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado à espectrômetro de massas
h	hora
IC	Intervalo de Confiança

IMC	Índice de Massa Corpórea
Ke	Constante de Eliminação
Kg	Kilograma
KV	Kilovolt
L	Litro
L/h	Litro por hora
LQ	Limite de quantificação
m	Metro
mg	Miligrama
min.	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mm Hg	Milímetro de mercúrio
NaCl	Cloreto de sódio
ng/mL	Nanograma por mililitro
NaOH	Hidróxido de Sódio
rpm	Rotação por minuto
$t_{1/2}$	Meia vida de eliminação
T_{max}	Tempo de concentração máxima
V	Volt
v/v	Volume por volume
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1- Dados da população do estudo.....	62
Tabela 2- Exames laboratoriais realizados pelos voluntários participantes do estudo.....	62
Tabela 3- Alterações consideradas na avaliação clínica.....	63
Tabela 4- Materiais e equipamentos utilizados na etapa analítica.....	70
Tabela 5- Componentes do HPLC-MS/MS.....	70
Tabela 6- Reagentes Químicos.....	70
Tabela 7- Padrões.....	71
Tabela 8- Amostras Biológicas.....	71
Tabela 9- Preparo da Curva de Calibração para a Levocetirizina.....	73
Tabela 10- Preparo dos controles de qualidade para a Levocetirizina...	74
Tabela 11- Amostras do fluido biológico (plasma).....	77
Tabela 12- Definição dos Controles de Qualidade (CQ).....	80
Tabela 13- Análise Intra-Lote do Controle de Qualidade LQ.....	99
Tabela 14- Análise Intra-Lote dos Controles de Qualidade CQB, CQM e CQA.....	100
Tabela 15- Análise Inter-Lotes do Controle de Qualidade LQ.....	100
Tabela 16- Análise Inter-Lotes dos Controles de Qualidade CQB, CQM e CQA.....	101
Tabela 17- Análise da percentagem de recuperação da Levocetirizina..	101
Tabela 18- Análise da percentagem de recuperação do padrão interno (Fexofenadina).....	102

Tabela 19-	Média e Desvios obtidos no estudo de estabilidade da Levocetirizina (ng/mL) em plasma submetido à análise no auto-injetor.....	103
Tabela 20-	Estudo de estabilidade da Levocetirizina em plasma submetido a três ciclos de congelamento e descongelamento.....	103
Tabela 21-	Variação (%) das médias dos controles de qualidade para o 3º degelo em relação às médias das amostras recém-preparadas.....	104
Tabela 22-	Estabilidade das soluções padrão para a Levocetirizina (ng/mL).....	104
Tabela 23-	Variação (%) das médias dos controles de qualidade para as amostras não processadas 6 h à temperatura ambiente em relação às médias das amostras recém-preparadas.....	105
Tabela 24-	Estabilidade das soluções padrão para a Levocetirizina (área) e Fexofenadina (área).....	105
Tabela 25-	Variação (%) das médias dos controles de qualidade para as soluções padrão mantidas 6 h à temperatura ambiente e soluções padrão depois de 10 dias sob refrigeração em relação às médias das soluções recém-preparadas.....	106
Tabela 26-	Estabilidade de longa duração para Levocetirizina no fluido biológico.....	106
Tabela 27-	Variação das médias dos controles de qualidade para as amostras de longa duração em relação às médias das amostras recém-preparadas.....	107

Tabela 28-	Parâmetros farmacocinéticos das duas formulações de levocetirizina (n= 35 voluntários e cronograma de coleta de amostras até 48 horas).....	109
Tabela 29-	Razão entre as médias geométricas das formulações teste e referência, os respectivos intervalos de confiança e o coeficiente de variação intra-indivíduo para os 35 voluntários.....	109
Tabela 30-	Comparação de dados farmacocinéticos.....	110
Tabela 31-	Parâmetros farmacocinéticos das duas formulações de levocetirizina (n= 24 voluntários e cronograma de coleta de amostras até 24 horas).....	110
Tabela 32-	Razão entre as médias geométricas das formulações teste e referência, os respectivos intervalos de confiança e o coeficiente de variação intra-indivíduo para os 24 voluntários.....	111
Tabela 33-	Comparação dos dados farmacocinéticos das duas análises estatísticas.....	112

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1- Estrutura química da Levocetirizina.....	51
Figura 2- Estrutura química da Hidroxizina.....	52
Figura 3- Estrutura química da Clemastina.....	52
Figura 4- Estrutura química do Cetotifeno.....	52
Figura 5- Estrutura química da Ebastina.....	52
Figura 6- Estrutura química da Fexofenadina.....	52
Figura 7- Estrutura química da Loratadina.....	52
Figura 8- Estrutura química da Levocetirizina.....	89
Figura 9- Estrutura química da Fexofenadina.....	89
Figura 10- Espectro MS da Levocetirizina.....	90
Figura 11- Espectro MS/MS da Levocetirizina.....	90
Figura 12- Espectro MS da Fexofenadina.....	90
Figura 13- Espectro MS/MS da Fexofenadina.....	91
Figura 14- Plasma branco normal lote 25888/3.....	92
Figura 15- Plasma branco normal lote 51494/1.....	93
Figura 16- Plasma branco normal lote 155050/4.....	94
Figura 17- Plasma branco normal lote 26566/3.....	95
Figura 18- Plasma branco hemolisado lote 480160/3.....	96
Figura 19- Plasma branco lipêmico lote 51545/1.....	97
Figura 20- Cromatograma da Levocetirizina na concentração do LQ (0,5 ng/mL).....	98
Figura 21- Linearidade da Levocetirizina.....	98

	PÁG.
Gráfico 1- Curva média de concentração plasmática <i>versus</i> tempo das formulações teste e referência administradas a 35 voluntários.....	108
Gráfico 2- Curva média de concentração plasmática <i>versus</i> tempo das formulações teste e referência administradas a 24 voluntários.....	112

RESUMO

Objetivo: Desenvolver e validar um método analítico para quantificação de levocetirizina em plasma humano. Além disso, a biodisponibilidade relativa de uma formulação contendo 5 mg de dicloridrato de levocetirizina (formulação teste e formulação referência produzida por Farmalab Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda.) foi avaliada em trinta e seis voluntários sadios de ambos os sexos.

Método: O plano de estudo utilizado foi aberto, randomizado, cruzado com um intervalo de washout de 7 dias. As amostras de plasma foram obtidas por um período de 48 horas. As concentrações plasmáticas de levocetirizina foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS/MS), com modo de ionização electrospray positivo usando um monitoramento de reação simples (SRM). O método analítico foi validado considerando os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, recuperação e estabilidades de acordo com a RE nº899/03 (ANVISA). Das curvas de concentração plasmática versus o tempo para levocetirizina, os seguintes parâmetros farmacocinéticos foram obtidos: ASC_{0-48h} , ASC_{0-inf} e C_{max} .

Resultados: A curva de calibração foi linear de 0,5 a 500,0 ng/mL. O método obteve uma corrida cromatográfica de 2,0 minutos usando uma coluna POLARIS C18 (3 μ m, 50 mm x 2,0 mm). A precisão inter-corrída dos controles de qualidade foi 4,76% (CQB 1,5 ng/mL), 7,14% (CQM 200,0 ng/mL) e 3,78% (CQA 400,0 ng/mL). A exatidão inter-corrída dos controles de qualidade acima mencionados foi de 98,00%, 99,63% e 97,84%, respectivamente. A razão das médias geométricas dos dois medicamentos (teste e referência) e o intervalo de confiança (IC) foram respectivamente: 101,11% (90% IC= 97,42% - 104,93%) para ASC_{0-48h} , 101,17% (90% IC= 97,49% - 104,99%) para ASC_{0-inf} , 99,43% (90% IC= 94,29% - 104,86%) para C_{max} .

Conclusão: O método analítico mostrou-se preciso, exato e rápido para quantificação de levocetirizina em plasma humano. Desde que os IC 90% para ASC_{0-48h} , ASC_{0-inf} e C_{max} apresentaram-se dentro do intervalo de 80-125% proposto pela ANVISA, foi concluído que a formulação teste Levocetirizina 5 mg é

bioequivalente a formulação Zyxem® fabricada pelo laboratório Farmalab Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda.

Palavras-Chave: Levocetirizina, Biodisponibilidade Relativa, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Espectrometria de Massas.

ABSTRACT



Objective: To develop and validate an analytical method for levocetirizina quantification in human plasma. Moreover, it was evaluated the relative bioavailability of a levocetirizine dichloridate 5 mg tablet formulation (test formulation vs reference formulation from Farmalab Ltda.) in 36 healthy volunteers of both sexes.

Methods: The study was conducted using an open, randomized, two-period crossover design with 7 days washout period between doses. Plasma samples were obtained over a 48 h period. Plasma levocetirizine concentrations were analyzed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) with positive ion electrospray ionization using single reaction monitoring (SRM). The analytical method was validated considering specificity, linearity, precision, accuracy, recovery and stabilities parameters according to RE n°899/03 (ANVISA). From the levocetirizine plasma concentration vs time curves, the following pharmacokinetic parameters were obtained: AUC_{0-48h} , AUC_{0-inf} e C_{max} .

Results: The calibration curve was linear over de range from 0,5 to 500,0 ng/mL. The method chromatographic run was 2,0 minutes using a POLARIS C18 column (3 μ m, 50 mm x 2,0 mm). The between-run precision of quality controls was 4,76% (CQB 1,5 ng/mL), 7,14% (CQM 200,0 ng/mL) e 3,78% (CQA 400,0 ng/mL). The between-run accuracy for the above mentioned quality controls was 98,00%, 99,63% e 97,84% respectively. The limit of quantification was 0.5 ng/mL. The geometric mean ratio of both formulations (test and reference) and respective 90% confidence interval (CI) were: 101,11% (90% CI= 97,42% - 104,93%) for AUC_{0-48h} , 101,17% (90% CI= 97,49% - 104,99%) for AUC_{0-inf} , 99,43% (90% CI= 94,29% - 104,86%) for C_{max} .

Conclusion: The analytical method has proven to be precise, accurate and fast to levocetirizina quantification in human plasma. Since the 90% CI for AUC_{0-48h} , AUC_{0-inf} and C_{max} ratios were within the 80-125% interval proposed by the ANVISA, it was concluded that levocetirizine formulation elaborated by Eurofarma Laboratórios Ltda. is bioequivalent to Zyxem® formulation.

Key Words: Levocetirizine, Relative Bioavailability, High Performance Liquid Chromatography, Tandem Mass Spectrometry.

1- INTRODUÇÃO

Durante muito tempo a indústria farmacêutica não percebeu a importância da disponibilidade biológica das substâncias a partir das formas farmacêuticas. Os formuladores ficavam satisfeitos quando se cumpriam as especificações pré-determinadas nos testes físicos e químicos tradicionais. (Aiche et al, 1983)

Um fármaco administrado como comprimido ou outra forma farmacêutica, deve ser liberado e atingir o sítio de ação no seu estado ativo para que possa exercer uma resposta farmacológica. As propriedades físico-químicas da substância ativa, a tecnologia de preparação, as características da forma farmacêutica na qual é administrada e os fatores fisiológicos que controlam a absorção, distribuição, metabolismo e eliminação dos fármacos devem ser considerados, objetivando formular agentes terapêuticos efetivos e seguros. (Aiche et al, 1983)

O conceito de disponibilidade da substância ativa a partir de um medicamento nasceu da observação da não equivalência terapêutica entre especialidades farmacêuticas, até o momento considerados como substituíveis, devido a presença do mesmo fármaco, na mesma dose unitária, na mesma forma farmacêutica. A dificuldade, e às vezes, a impossibilidade de realizar comparações rigorosas dos resultados terapêuticos dos medicamentos considerados equivalentes conduziu a necessidade de determinar sua biodisponibilidade antes de admitir que são equivalentes e substituíveis entre si. (Aiche et al, 1983)

1.1- Bioequivalência

A bioequivalência ou biodisponibilidade relativa conquistou atenção crescente nos últimos 30 anos após evidências de que produtos comerciais contendo a mesma dosagem do fármaco ou parte ativa, podem exibir diferenças pronunciadas na resposta terapêutica. (Horvitz, 1975; Smith, 1972)

A introdução de medicamentos genéricos foi um fator importante que trouxe a tona preocupações sobre a biodisponibilidade desses produtos, uma vez que o seu desempenho *in vivo* era totalmente desconhecido. (Horvitz, 1975; Smith, 1972)

Os ensaios de bioequivalência são obrigatórios para dois tipos de situações: alteração de uma formulação já existente no mercado ou versões genéricas de um produto inovador. Desta forma, o único objetivo desse estudo é obter evidência de que não há diferença significativa entre a formulação teste e a formulação referência quanto aos parâmetros farmacocinéticos: C_{max} e ASC. (Arancibia, 1991; Jackson, 1994; Vernengo, 1993)

De acordo com a Resolução RDC nº 16 de 02 de Março de 2007 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2007), dois medicamentos são ditos bioequivalentes quando são administrados na mesma dose molar, nas mesmas condições experimentais e não apresentam diferenças estatisticamente significativas em relação à biodisponibilidade.

Além disso, um medicamento bioequivalente deve ser considerado equivalente farmacêutico, ou seja, conter o mesmo fármaco, isto é, sal ou éster da mesma molécula ativa, na mesma quantidade e forma farmacêutica, podendo ou não conter excipientes idênticos. (ANVISA, RDC nº16 - 2007).

Entretanto, assumia-se que equivalentes farmacêuticos eram necessariamente equivalentes terapêuticos. Um produto farmacêutico é terapêuticamente equivalente a outro se este contiver a mesma substância ativa e comprovar clinicamente que possui a mesma eficácia e segurança estabelecidas através de ensaios clínicos. (Metzler, 1974)

Assim, foi demonstrado que a hipótese de que equivalentes farmacêuticos eram terapêuticamente semelhantes estava equivocada. Desde então, tornou-se cada vez maior o interesse em estudos clínicos que garantissem a eficácia e segurança clínica dos medicamentos. Diante disso, o estudo de

biodisponibilidade relativa foi instituído na prática médica como uma forma de assegurar a eficácia, segurança e qualidade do medicamento genérico. (Metzler, 1974)

No Brasil, os estudos de bioequivalência devem ser realizados para aqueles medicamentos cujos testes “*in vitro*” comprovam a equivalência farmacêutica entre as formulações, e deve-se utilizar os mesmos lotes testados na equivalência farmacêutica. (Soares, 2002)

De acordo com a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), produtos farmacêuticos são considerados equivalentes terapêuticos somente se eles são equivalentes farmacêuticos e se deles pode-se esperar obter o mesmo efeito clínico e perfil de segurança quando administrado para pacientes sob condições específicas (ANVISA, RDC nº16 - 2007).

Os estudos de bioequivalência podem ser estudos abertos e cruzados ou em algumas situações especiais podem ser feitos em paralelo. Durante a realização do estudo, aos voluntários são administrados a formulação teste e a formulação referência aleatoriamente em períodos distintos, e são realizados geralmente em uma população pequena de voluntários adultos e sadios. (Bennett, 1999)

A utilização de voluntários sadios é baseada no fato de que diversas doenças podem alterar a biodisponibilidade dos fármacos. Para evitar essas variáveis, os voluntários são submetidos a avaliações clínicas e laboratoriais para que possam comprovar o seu estado de higidez. (Gibaldi, 1991)

Geralmente, doses únicas dos medicamentos teste e referência são administrados em períodos diferentes, com o segundo produto somente administrado depois de um intervalo adequado (washout) para garantir que não haja um efeito residual do primeiro fármaco administrado, o que aumentaria artificialmente os resultados (Ansel *et al*, 2000). As amostras sanguíneas são coletadas para a quantificação antes ($t= 0$ h) e após a administração (demais

tempos de coletas) de cada formulação e em intervalos pré-estabelecidos para obtenção dos perfis farmacocinéticos, necessários para se determinar a bioequivalência.

1.1.1- Parâmetros para Avaliação da Bioequivalência.

Para a avaliação da biodisponibilidade relativa de dois medicamentos são determinados os parâmetros farmacocinéticos que melhor se correlacionam com os efeitos terapêuticos no organismo. (Storpirtis, 1994). Estes parâmetros relacionam-se com a quantidade de fármaco absorvida e a velocidade do processo de absorção. (Storpirtis e Consiglieri, 1995)

Os parâmetros farmacocinéticos são obtidos das curvas de concentração sanguínea do fármaco versus tempo, e analisado estatisticamente para determinação da bioequivalência.

Os seguintes parâmetros farmacocinéticos devem ser determinados:

a) Área sob a Curva da Concentração Plasmática versus Tempo (ASC): relaciona-se com a quantidade ou a extensão de absorção do fármaco. Pode ser calculado pelo método trapezoidal e expresso em unidades de concentração vezes tempo.

a1) Área sob a Curva da Concentração Plasmática versus Tempo, de zero ao tempo t (ASC_{0-t}): relaciona-se com a quantidade do fármaco absorvida do tempo zero ao tempo t , onde t é a última coleta determinada experimentalmente.

a2) Área sob a Curva da Concentração Plasmática versus Tempo, de zero ao infinito (ASC_{0-inf}): relaciona-se com a quantidade ou a extensão de absorção do fármaco do tempo zero projetado até o infinito.

b) Concentração Máxima Atingida no Plasma (C_{max}): concentração mais elevada do fármaco atingida na circulação sanguínea após sua administração. Relaciona-se com a intensidade da resposta farmacologia. O C_{max} ideal deve estar dentro da janela terapêutica.

c) Meia Vida de Eliminação do Fármaco ($t_{1/2}$): representa o tempo em que a concentração do fármaco no plasma é reduzido a metade. Calcula-se através do logaritmo neperiano (ln) de 2 ($\ln 2 = 0,693$) dividido pela constante de eliminação $t_{1/2} = \ln 2 / k_e$.

d) Tempo correspondente à Concentração Máxima Atingida no Plasma (T_{max}): tempo correspondente para que o fármaco atinja a concentração máxima (C_{max}).

* A constante de eliminação (k_e) foi calculada com o valor absoluto do coeficiente angular da reta ajustada por mínimos quadrados aos quatro (ou pelo menos três) últimos valores quantificáveis log-transformados (logaritmo natural) das concentrações : $ASC_{0-inf} = ASC_{0-t} + C_{ult}/k_e$.

1.2- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE / HPLC)

A cromatografia é um método físico-químico de separação de compostos. Ela está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. (Lough e Wainer, 1995)

A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação. (Lough e Wainer, 1995)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC) surgiu como a aplicação de cromatografia líquida às teorias e instrumentações desenvolvidas originalmente para cromatografia gasosa. (Lough e Wainer, 1995)

Baseando-se na teoria da cromatografia gasosa, de que a eficiência de uma separação aumenta com a diminuição do tamanho da partícula da fase estacionária, surgiu na década de 60, a cromatografia líquida de alta eficiência. (Lough e Wainer, 1995)

1.2.1- Detectores para CLAE

A função destes equipamentos é a detecção dos compostos vindos do eluente da coluna. Tipos de detectores:

- UV – Visível;
- Fluorescência;
- Índice de Refração;
- Infra-vermelho;
- Eletroquímicos;
- Espectrometria de massas.

O espectrômetro de massas é um detector universal, que apresenta alta sensibilidade, fornece a massa molecular dos solutos e permite a elucidação estrutural destes. (Lloyd, 1995)

Pode ser utilizado como um detector extremamente seletivo, fixando-se um íon molecular. A utilização de MS-MS permite a fragmentação dos íons já formados, fornecendo informações estruturais e aumentando a seletividade. É o detector ideal para estudos de bioequivalência. (Lloyd, 1995)

Devido à incompatibilidade entre o fluxo líquido vindo da coluna e o alto vácuo existente em tais equipamentos, é necessária a utilização de uma interface (Lloyd, 1995). No presente estudo utilizou-se o electrospray (ESI) como interface e método de ionização.

Na técnica de ionização por electrospray (ESI), o eluente proveniente da coluna cromatográfica é conduzido por um tubo capilar metálico ao qual é aplicado um alto potencial elétrico (positivo ou negativo), que leva à separação de cargas do solvente, podendo também haver dissociação iônica do fármaco de interesse, dependendo de suas características físico-químicas. Ao deixar o capilar,

o líquido é vaporizado, formando minúsculas gotículas carregadas eletricamente que, por sua vez, são submetidas a um fluxo de nitrogênio, destinado à evaporação do solvente. (Kauppila T, 2004a)

A literatura relata várias técnicas de quantificação de cetirizina (mistura racêmica) em plasma tais como, Eletroforese Capilar com um limite de quantificação de 10 ng/mL e tempo de retenção de 7,1 minutos (Kowalski et al, 2007); Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a UV-Vis com um limite de quantificação de 10 ng/mL e tempo de retenção de 8 minutos (Macek et al, 1999) e limite de quantificação de 10 ng/mL e tempo de retenção de 1,69 minutos (Zaater et al, 1999); Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a espectrômetro de massas com limite de quantificação de 1,0 ng/mL e tempo de retenção de 7,7 minutos (Ming et al, 2006) e limite de quantificação de 0,5 ng/mL e tempo de retenção de 1,87 minutos (Jager et al, 2002).

1.3- Levocetirizina

A levocetirizina, 2-[2-[4-[(*R*)-(4-clorofenil)-fenil-metil] piperazinil-1-il]etoxi] ácido acético, cuja fórmula molecular é $C_{21}H_{25}ClN_2O_3$, tem peso molecular de 388.89. (The Merck Index, 1996)

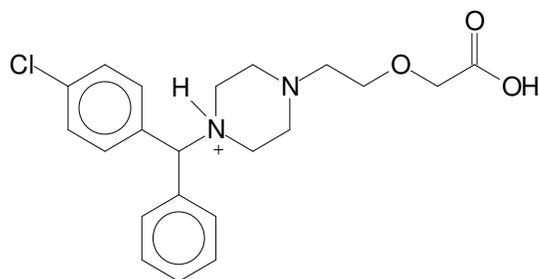


Figura 1- Estrutura química da Levocetirizina.

A Levocetirizina é um seletivo antihistamínico de segunda geração, sendo o R-enantiômero da cetirizina e sua dose usual 5 mg/dia. (Hair e Scott, 2006)

Os antihistamínicos de primeira geração (como Hidroxizina, Clemastina e Cetotifeno) possuem como efeito colateral a sonolência. Já os antihistamínicos de segunda geração (Ebastina, Fexofenadina, Loratadina e Levocetirizina) possuem esse efeito sedativo bem menos acentuado. (Hang et al, 2003.)

Nas figuras 2, 3 e 4 são apresentadas as estruturas químicas de alguns antihistamínicos de primeira geração e nas figuras 5, 6 e 7 são apresentadas as estruturas químicas de alguns antihistamínicos de segunda geração (The Merck Index, 1996):

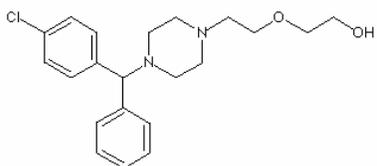


Figura 2- Estrutura Química da Hidroxizina

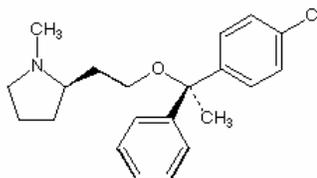


Figura 3- Estrutura Química da Clemastina

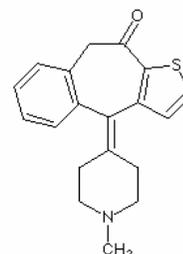


Figura 4- Estrutura Química do Cetotifeno

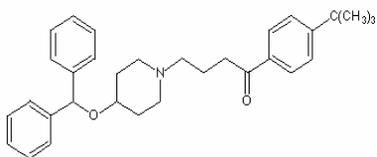


Figura 5- Estrutura Química da Ebastina

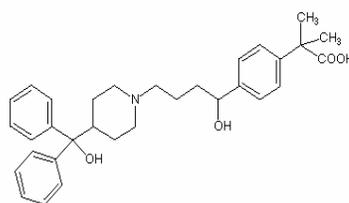


Figura 6- Estrutura Química da Fexofenadina

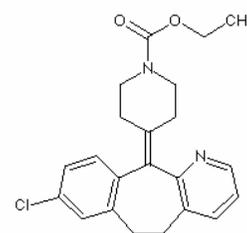


Figura 7- Estrutura Química da Loratadina

Pode-se notar através das estruturas químicas que os antihistamínicos de primeira e segunda gerações são quimicamente semelhantes.

1.3.1- Indicação Terapêutica da Levocetirizina

A levocetirizina é indicada em casos alérgicos. Alergia é uma reação de hipersensibilidade a uma substância exógena. (Hang *et al*, 2003.)

Ocorre hipersensibilidade (alergia) em indivíduo que apresenta resposta mediada predominantemente por anticorpos. Nesses indivíduos, o material antigênico, que não é, em si nocivo (como pólen, poeira doméstica, certos produtos alimentares e algumas substâncias), desencadeia a produção de anticorpos do tipo IgE, que se fixam aos mastócitos e, no pulmão, aos eosinófilos. (Hang *et al*, 2003.)

O contato subsequente com o material provoca liberação de histamina, PAF, eicosanóides e citocinas dos mastócitos, causando dilatação dos vasos sanguíneos locais, atração de eosinófilos e neutrófilos para o sítio reativo, aumento da permeabilidade dos capilares com perda de líquido nos tecidos e contração das células musculares lisas locais. Os efeitos podem ser localizados, limitando-se ao nariz (febre do feno), à árvore brônquica (asma), à pele (urticária) ou ao trato gastrointestinal. Em alguns casos, a reação é mais generalizada e provoca choque anafilático. (Gilman *et al*, 2007; Hang *et al*, 2003)

1.3.2- Farmacocinética

A levocetirizina é um antihistamínico livre de efeitos colinérgicos e baixo potencial sedativo. (Hair e Scott, 2006)

Através de estudos realizados com cetoconazol, eritromicina, azitromicina, cimetidina e pseudoefedrina, demonstrou-se que estes fármacos não interagem com a levocetirizina e vice-versa. (Benedetti *et al*, 2001)

A disposição da levocetirizina é similar quando administrada como o enantiômero único ou como o racemato. É fracamente metabolizada e não possui nenhum efeito nas atividades do citocromo (CYP) do fígado. Deste modo, nenhum

estudo de interação específica droga-droga foi conduzido com a levocetirizina. (Hair e Scott, 2006)

Cerca de 86% da dose administrada é excretada de forma inalterada pelos rins. A levocetirizina é excretada tanto por filtração glomerular como por secreção tubular. (Hair e Scott, 2006)

A levocetirizina é rapidamente absorvida após administração oral de 5 mg, o pico de concentração plasmática (aproximadamente 270,0 ng/mL) é atingido em 0,75 horas (T_{max}). Esse fármaco tem uma alta taxa de ligação a proteínas plasmáticas, cerca de 92.6% e sua meia vida de eliminação ($T_{1/2}$) é de 7 horas. (Hair e Scott, 2006)

Não ocorre inversão quiral no organismo pois, após uma dose oral de 5 mg de dicloridrato de levocetirizina, não foi detectado presença de dextrocetirizina no plasma ou urina dos voluntários que receberam a levocetirizina. (Tillement et al, 2003).

2- OBJETIVOS

Desenvolver e validar um método analítico sensível, rápido e específico para quantificação de levocetirizina em plasma humano.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Etapa Clínica

3.1.1- Plano do estudo

O estudo foi aberto, aleatorizado, cruzado, com 2 tratamentos, 2 sequências, 2 períodos, nos quais os voluntários receberam, em cada período, a formulação teste ou a formulação referência. A seqüência de tratamento atribuída a cada voluntário nos períodos de estudo foi determinada por uma tabela de aleatorização (Anexo 1) gerada automaticamente pelo sistema PROC PLAN 9.1.3.

Os voluntários receberam em cada um dos períodos do estudo, 01 comprimido contendo 5 mg de dicloridrato de levocetirizina, por via oral e em dose única, com um copo de água mineral sem gás (200 mL). Logo após, foram realizadas as coletas das amostras de sangue em tempos pré-determinados, onde, o último tempo de coleta de amostra deveria ser de 3 a 5 meias vidas de eliminação do fármaco e os períodos de tratamentos deveriam obedecer um intervalo mínimo de 7 meias vidas de eliminação do fármaco.

3.1.2- População do estudo

Foram selecionados 36 voluntários sadios, adultos, ambos os sexos, com idade entre 18 a 50 anos, com índice de massa corpórea maior que 19 e menor que 28,5.

A tabela 1 apresenta os valores da média, desvio padrão, mínimo, mediana e máximo para a altura, peso, índice de massa corpórea (IMC) e idade dos 36 voluntários que participaram deste estudo.

Tabela 1- Dados da população do estudo:

Variável	N. de voluntários	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Altura (m)	36	1,7	0,1	1,5	1,7	1,8
Peso (Kg)	36	66,4	9,0	47,0	66,2	86,0
IMC	36	23,5	2,4	19,0	23,5	28,1
Idade (anos)	36	28,8	7,8	18,0	27,0	43,0

O voluntário 08 não compareceu na noite do confinamento do período 02 por simples abandono. A etapa clínica foi então finalizada com 35 voluntários.

Foram realizados exames físicos e laboratoriais para atestar que os voluntários estivessem em boas condições de saúde. Não houve restrição quanto ao grupo étnico.

3.1.3- Exames Laboratoriais

Para fins de avaliação das condições de saúde, os voluntários realizaram os testes apresentados na tabela 2:

Tabela 2- Exames laboratoriais realizados pelos voluntários participantes do estudo:

Categoria	Exames
ECG	ECG padrão com 12 derivações.
Análise hematológica	Hemoglobina, hematócrito, contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de glóbulos vermelhos, contagem de plaquetas.
Análise bioquímica	Uréia, creatinina, bilirrubina total, proteínas totais, albumina, glicose em jejum, fosfatase alcalina, SGOT, SGTP, colesterol total, triglicérides, ácido úrico, γ GT.
Urina	Sumário de urina (urina I).
Fezes	Protoparasitológico.
Sorologia	Análise sorológica para hepatite B, hepatite C e HIV (1+2).
β -HCG*	Teste de gravidez.

* Somente para as mulheres.

Os resultados dos exames laboratoriais foram considerados normais quando dentro da faixa de normalidade declarada pelo laboratório.

Antes da admissão no estudo, os voluntários submeteram-se a um exame clínico, que foi explicitamente documentado no Formulário de Relato de Caso (CRFs), englobando a revisão dos itens apresentados na tabela 3:

Tabela 3- Alterações consideradas na avaliação clínica:

Categoria	Exames
História Médica	Alergias; olhos, nariz e garganta; sistemas respiratório, cardiovascular, gastrointestinal, genito-urinário, nervoso central, hematopoiético-linfático, endócrino, dermatológico, musculoesquelético, estabilidade emocional, história familiar, cirúrgica.
Exame físico	Olhos, orelhas, nariz, garganta, pescoço (incluindo tireóide), coração, pulmões, abdômen (incluindo fígado e baço), pele, linfonodos, sistema nervoso, esqueleto e músculos.
Dados antropométricos	Pressão arterial (medida 5 minutos após descanso, na posição sentada); pulso; altura; peso – (roupas leves); índice de massa corpórea; temperatura em °C.

A pressão arterial foi considerada como normal dentro dos seguintes limites: 90-140 mm Hg para a sistólica e 60-90 mm Hg para a diastólica e o pulso dentro de 50-90 b.p.m. foi considerado normal. Os resultados dos exames clínicos estão apresentados no Anexo 2.

Os exames clínicos (histórico médico, exame físico, dados antropométricos) foram realizados em um período não superior a 30 dias anteriores à primeira administração da medicação e exames laboratoriais em um período não superior a 60 dias (com exceção do β -HCG, para mulheres, que são 30 dias). Os exames sorológicos puderam ser realizados até 06 meses antes da primeira administração da medicação.

3.1.4- Critérios de inclusão do voluntário

- Mulheres não grávidas e que não estejam amamentando;
- Idade entre 18 a 50 anos;
- Voluntário com índice de massa corpórea maior que 19 e menor que 28,5;
- Voluntário examinado e considerado com boas condições de saúde ou sem doenças significativas, a juízo de um profissional legalmente habilitado, de acordo com as regras definidas no Protocolo e avaliações a que foi submetido: historia clínica, medidas de pressão e pulso, exame físico, ECG e exames laboratoriais complementares;
- Capaz de compreender a natureza e objetivo do estudo, inclusive os riscos e efeitos adversos, com a intenção de cooperar com o pesquisador e agir de acordo com os requerimentos de todo o ensaio, o que foi confirmado mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.1.5- Critérios de exclusão do voluntário

3.1.5.1- Problemas relacionados ao fármaco:

- Voluntário com hipersensibilidade ao fármaco em estudo (dicloridrato de levocetirizina) ou a compostos quimicamente relacionados.

3.1.5.2- Doenças ou problemas de saúde:

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

- Doença hepática, renal, pulmonar, gastrintestinal, epilética, hematológica ou psiquiátrica; hipo ou hipertensão de qualquer etiologia que necessite de tratamento farmacológico; tem história ou teve infarto do miocárdio, angina e/ou insuficiência cardíaca;
- Achados eletrocardiográficos não recomendados a critério do investigador para participação no estudo;
- Os resultados dos exames laboratoriais fora dos valores considerados normais de acordo com as normas do Protocolo, a menos que sejam considerados clinicamente irrelevantes pelo investigador.

3.1.5.3- Hábitos e dependências

- Voluntário é fumante;
- O voluntário ingere mais do que 05 xícaras de café ou chá por dia;
- Tem história de abuso de álcool ou drogas.

3.1.5.4- Condições encontradas nos dias/meses que antecedem o estudo:

- Fez uso de medicação regular dentro das 02 semanas que antecedem o início do tratamento e a data de avaliação; ou fez uso de qualquer medicação dentro de uma semana por via oral;
- Foi internado por qualquer motivo entre 08 semanas do início do primeiro período de tratamento deste estudo e a data da avaliação;
- Tratamento dentro dos 03 meses prévios ao estudo com qualquer droga conhecida de ter um potencial tóxico definido nos grandes órgãos;

- O voluntário participou de qualquer estudo experimental ou ingeriu qualquer droga experimental dentro dos 03 meses que antecederam o início deste estudo e a data da avaliação;
- O voluntário doou ou perdeu 450 mL ou mais de sangue dentro dos 03 primeiros meses que antecederam ao estudo ou que doou ou perdeu mais de 1500 mL dentro dos 12 meses entre o início do tratamento e a data de avaliação;
- Uso de álcool nas 48 horas antecedentes à admissão ao estudo e ao longo do período de estudo;
- História de drogas de abuso.

3.1.5.5- Outras Condições

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

3.1.6- Dieta

Não foi permitido, desde 48 horas antes até a última coleta de sangue de cada internação (período de tratamento), o consumo dos seguintes produtos:

- Cafeína;
- Bebidas que contenham xantina (chá, café, cola);
- Bebidas alcoólicas.

Após a entrada no hospital, os voluntários fizeram a última refeição do dia, começando o jejum às 21:00 horas da noite do confinamento até 04 horas após a ingestão da medicação. Foi respeitado o jejum de 10 horas até a administração da medicação.

Durante o estudo foram servidas as seguintes refeições:

- Jantar na noite do confinamento;
- Entre 04 e 05 horas após a administração da medicação foi servido um almoço padronizado;
- Entre 07 e 08 horas após a administração da medicação foi servido um lanche da tarde padronizado;
- Entre 10 e 12 horas após administração da medicação foi servido um jantar padronizado;
- Entre 13 e 14 horas após a administração da medicação foi servida uma ceia padronizada;
- 24 horas após a administração da medicação foi servido um desjejum padronizado.

3.1.6.1- Administração de Líquidos

Os voluntários não tomaram líquidos (água) desde 06 horas antes da administração da medicação até os horários de ingestão de água programados, ver abaixo:

- 200 mL de água mineral sem gás com a medicação,
- 200 mL de água mineral sem gás 02:00 horas após a administração da medicação.

Após 02 horas da administração da medicação a ingestão de água foi permitida *ad libitum*.

3.1.7- Administração da medicação

O período 01 foi iniciado no dia 14/11/2006 e o período 02 no dia 21/11/2006, com um intervalo de 07 dias entre os dois períodos.

3.1.8- Cronograma de Coleta de Amostras de Sangue

Foram coletadas amostras de sangue dos voluntários nos seguintes tempos: 00:00, 00:15, 00:30, 00:40, 00:50, 01:00, 01:10, 01:20, 01:30, 01:45, 02:00, 02:30, 03:00, 04:00, 06:00, 08:00, 10:00, 12:00, 16:00, 24:00, 36:00 e 48:00 horas.

As amostra de sangue (8 mL) foram coletadas em tubos de polipropileno contendo o anticoagulante heparina sódica e centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Imediatamente após a centrifugação, um mínimo de 2,5 mL de plasma, para cada amostra, foi transferido para o primeiro tubo criogênico com rosca e o plasma restante para um segundo tubo criogênico com rosca como uma amostra em duplicata.

Os tubos foram identificados com o número e código de identificação do voluntário, período do estudo, data da administração da droga, tempo de coleta, nome e o número do estudo e armazenados à -70°C em freezer específico para amostras biológicas.

3.1.9- Aspectos Éticos

O Protocolo Clínico e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Assertiva (Anexo 3). O estudo foi conduzido de acordo com ICH GCP-Guideline (CPMP/ICH/135/95) e de acordo com a Declaração de Helsinque (1964) e as revisões de Tóquio (1975), Veneza (1983), Hong Kong (1989), Somerset Oeste (1996) e Edinburgh (2000), assim como as regulamentações locais (Resoluções 196/96 e 251/97 do CNS-MS, bem como Resolução RDC 16/07 da ANVISA).

3.1.9.1- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Os voluntários receberam uma explicação da natureza e propósito do estudo pelo investigador. Foi de entendimento para o voluntário que o estudo foi realizado somente para objetivos de pesquisa, sem fornecer algum benefício terapêutico para o voluntário. O voluntário também foi esclarecido da sua liberdade de se retirar do estudo a qualquer hora sem se prejudicar. A cada voluntário foi solicitado que ao concordar em participar do estudo, assinasse o termo de consentimento para a participação do estudo. (Anexo 4)

3.1.9.2- Confidencialidade

Os resultados dos testes laboratoriais e exames médicos foram registrados na ficha clínica do voluntário. Todas as informações obtidas durante a condução do estudo com respeito ao estado de saúde dos voluntários ficaram disponíveis para os médicos. Uma cópia dos exames laboratoriais realizados pré e pós-estudo clínico foi entregue ao voluntário.

3.2- Etapa Analítica

3.2.1- Materiais utilizados no Desenvolvimento e Validação do Método Bioanalítico

Para o desenvolvimento e validação da metodologia bioanalítica foram utilizados os seguintes aparelhos, padrões químicos, reagentes e amostras biológicas, descritos nas tabelas 4, 5, 6, 7 e 8.

O padrão de levocetirizina foi fornecido por Symbio Labs Limited, lote numero 0281105. O padrão de fexofenadina foi fornecido por Ind. Swift Laboratories Limited, lote numero FEX0503020. Metanol, ácido fórmico e Cloreto de Sódio foram fornecidos pela Sovereign Brasil. Acetonitrila e diclorometano

foram fornecidos pela Merse – Produtos para Laboratório. A água foi purificada através do Milli-Q Plus (Millipore Indústria e Comércio Ltda).

Tabela 4- Materiais e equipamentos utilizados na etapa analítica:

Descrição	Fabricante / País de Origem
Pipetas de volume variável	Gilson / França
Ponteiras de pipeta descartáveis amarelas e azuis (volume)	Axygen / USA
Mesa agitadora (Finemixer)	Fine PCR / Coréia
Misturador (vortex)	Phoenix / USA
Balança Analítica	Precisa CP 225 D Sartorius / Alemanha

Tabela 5- Componentes do HPLC-MS/MS

Descrição	Fabricante / Modelo
Espectrômetro de Massas	Micromass MS / Quattro Premier XE
Gerador de Nitrogênio	Peack Scintific / NN30LA
Bomba Analítica	Waters / Alliance HT 2795
Auto-Injetor	Waters / Alliance HT 2795
Programa	Micromass / Mass Lynx 4.1

Tabela 6- Reagentes Químicos

Descrição	Finalidade
Acetonitrila (grau HPLC)	Preparo da fase móvel
Ácido Fórmico (p.a)	Preparo da fase móvel
Metanol (grau HPLC)	Preparo da solução padrão de Fexofenadina
Água (purificada através de Milli-Q)	Preparo da solução padrão de Levocetirizina e Preparo da Fase Móvel.
Diclorometano (p.a)	Solvente extrator
Cloreto de Sódio	Extração da amostra

Tabela 7- Padrões

Descrição	Finalidade
Levocetirizina	Analito
Fexofenadina	Padrão interno

Tabela 8- Amostras Biológicas

Condições
Plasma Humano Normal
Plasma Humano Lipêmico
Plasma Humano Hemolisado

3.2.2- Preparo das Soluções-Padrão

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

3.2.2.1- Solução Padrão de Levocetirizina

Uma massa correspondente a 0,00601 g de Dicloridrato de Levocetirizina (equivalente a 0,00500 g de Levocetirizina) foi cuidadosamente pesada, colocada em um balão volumétrico (50 mL) e preparada em água (Milli-Q) para a obtenção de uma solução de concentração 100,0 ug/mL.

3.2.2.2- Solução de Padrão Interno de Fexofenadina

Uma massa correspondente a 0,00500 g de Fexofenadina foi cuidadosamente pesada, colocada em um balão volumétrico (50 mL) e preparada em metanol para a obtenção de uma solução de concentração 100,0 ug/mL. A partir desta solução preparou-se uma solução de Fexofenadina na concentração de 2,0 ug/mL em metanol.

3.2.3- Fase Móvel utilizada no Trabalho

Foram testadas fases móveis com diferentes solventes e gradientes de concentração. A fase móvel que apresentou melhor sinal do fármaco foi Acetonitrila / Água Milli-Q / Ácido Fórmico 88% (80:20:0,1% v/v/v)

A solução utilizada como fase móvel foi preparada de acordo com a necessidade e substituída diariamente antes de uma nova corrida analítica.

3.2.3.1- Preparo da fase móvel Acetonitrila / Água Milli-Q / Ácido Fórmico 88% (80: 20: 0,1 % v/v/v)

Para o preparo de 1000 mL da fase móvel adicionou-se em um frasco de vidro, 800 mL de acetonitrila, 200 mL de água (Milli-Q) e 1 mL de ácido fórmico 88%. Após homogeneização, filtrou-se a solução.

3.2.4- Preparo da Solução de Lavagem da Agulha.

O solvente utilizado na lavagem da agulha foi a fase móvel.

3.2.5- Preparo dos padrões da Curva de Calibração.

A curva de calibração inclui a 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 contemplando a faixa prevista de concentrações que se pretende analisar. Os padrões da curva de calibração foram preparados adicionando-se o analito a ser analisado ao plasma humano.

Preparou-se uma solução mãe de levocetirizina 2 µg/mL em plasma adicionando-se 0,2 mL da solução de Levocetirizina 100 µg/mL (em água milli-Q) em um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com plasma branco.

Os dados referentes ao preparo dos padrões da curva de calibração estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9- Preparo da Curva de Calibração para a Levocetirizina:

Nível	Amostra	Concentração no plasma (ng/mL)	Volume pipetado mL/ Concentração da Solução de Levocetirizina preparada em plasma (µg/mL)	Volume Final (mL)	Fator de Diluição
B	Branco	0	-	-	-
Z	Zero	0	-	-	-
1	Levocetirizina	0,5	0,1 (0,05 µg/mL)	10	1:100
2	Levocetirizina	1,0	0,2 (0,05 µg/mL)	10	1:50
3	Levocetirizina	5,0	1,0 (0,05 µg/mL)	10	1:10
4	Levocetirizina	10,0	0,05 (2,0 µg/mL)	10	1:200
5	Levocetirizina	50,0	0,25 (2,0 µg/mL)	10	1:40
6	Levocetirizina	100,0	0,5 (2,0 µg/mL)	10	1:20
7	Levocetirizina	500,0	2,5 (2,0 µg/mL)	10	1:4

Os padrões da curva de calibração foram fracionados em alíquotas de 200 µL, armazenados em tubos tipo eppendorff devidamente rotulados e estocados a -70°C até a sua utilização.

3.2.6- Preparo das amostras dos controles de qualidade

Os controles de qualidade (CQ) definidos neste relatório têm 2 objetivos distintos: Os definidos por LQ são utilizados para determinar o Limite de Quantificação (LQ) do método analítico. Para sua determinação foram feitas

análises da matriz biológica contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis. Os controles de qualidade baixo (CQB), controles de qualidade médio (CQM) e os controles de qualidade alto (CQA) foram utilizados para monitorar a precisão e exatidão do método de quantificação durante os ensaios.

Todas as amostras dos controles de qualidade foram preparadas adicionando-se o analito a ser analisado ao plasma humano. Os dados referentes ao preparo das amostras dos controles de qualidade estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10- Preparo dos controles de qualidade para a Levocetirizina:

CQ	Analito	Concentração no plasma (ng/mL)	Volume pipetado (mL)/ Concentração da Solução de Levocetirizina preparada em plasma	Volume Final (mL)	Fator de Diluição
LQ	Levocetirizina	0,5	0,1 (0,05 µg/mL)	10	1:100
CQB	Levocetirizina	1,5	0,3 (0,05 µg/mL)	10	1:33,3
CQM	Levocetirizina	200	1,0 (2,0 µg/mL)	10	1:10
CQA	Levocetirizina	400	2,0 (2,0 µg/mL)	10	1:5

LQ= Limite de Quantificação, CQB= Controle de Qualidade Baixo, CQM= Controle de Qualidade Médio, CQA= Controle de Qualidade Alto.

As amostras dos controles de qualidade foram fracionadas em alíquotas de 200 µL, armazenadas em tubos tipo eppendorff devidamente rotuladas e estocadas a – 70°C até a sua utilização.

3.2.7- Preparo da Corrida Analítica

O procedimento de extração das amostras descrito a seguir foi aplicado não apenas para as amostras dos voluntários analisados, mas também para os padrões das curvas de calibração e amostras de controle de qualidade. Para a

extração do analito (Levocetirizina) e do padrão interno (Fexofenadina) das amostras biológicas, os seguintes passos foram seguidos:

- 1) Em tubos eppendorff colocou-se 200 μ L de plasma humano, 25 μ L da solução do padrão interno (Fexofenadina 2,0 μ g/mL em metanol). Agitou-se por 1 minuto em mesa agitadora (velocidade 9).
- 2) Adicionou-se 50 μ L de solução de NaCl saturada e 1000 μ L de diclorometano gelado. Agitou-se por 5 minutos em mesa agitadora (velocidade 9).
- 3) Centrifugou-se as amostras a 13200 rpm, durante 5 minutos, a 4°C.
- 4) Transferiu-se 700 μ L da fase orgânica para tubos eppendorff, evaporou-se o solvente sob fluxo de ar comprimido, ressuspendeu-se o resíduo em 200 μ L de acetonitrila e agitou-se por 5 minutos na mesa agitadora (velocidade 9).
- 5) Transferiu-se as amostras para inserts de vidro descartáveis e, em seguida, injetou-se alíquotas de 5 μ L no sistema cromatográfico.

3.2.8- Condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas usando uma coluna analítica POLARIS C₁₈ (3 m, 50 mm x 2,0 mm).

O Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência com detecção por Espectrometria de Massas seqüencial (MS/MS) foi programado para operar com fluxo de 0,2 mL/min, um volume de injeção de 5 μ L e o tempo total de corrida foi ajustado para 2,0 min.

Sob essas condições, o tempo de retenção observado para o analito e para o padrão interno foi de 0,91 min. e 0,86 min., respectivamente.

3.2.9- 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 (ESI+) e MRM 388,78 > 200,93 e 502,33 > 466,62 para monitoramento da Levocetirizina e da Fexofenadina respectivamente. A temperatura da fonte foi de 100° C e dessolvatação de 350° C. O fluxo dos gases do cone e dessolvatação foram de 10 e 346 L/h, respectivamente. Os valores de voltagem do capilar, cone e energia de colisão foram, respectivamente, 3,0 KV, 25,0 V e 12,0 eV para a Levocetirizina e 3,0 KV, 30,0 V e 20,0 eV para a Fexofenadina, tendo como pressão de Argônio para a dissociação $2,75 \times 10^{-3}$ mbar.

3.2.10- Validação do método de quantificação

Os estudos foram conduzidos em concordância com o protocolo do estudo e o guia para validação de métodos bioanalíticos da ANVISA (RE 899/03).

Os testes foram realizados para demonstrar que o método bioanalítico proposto é adequado e confiável.

A validação do método constituiu de um pré estudo que avaliou os parâmetros como sensibilidade, especificidade/seletividade, linearidade, exatidão, precisão e reprodutividade; definição dos parâmetros do estudo tais como limite de quantificação, concentração dos padrões da curva e dos controles de qualidade, determinação da estabilidade do analito.

3.2.10.1- Especificidade/Seletividade

A matriz biológica para o preparo da curva de calibração e dos controles de qualidade, assim como para as amostras branco e zero devem ser avaliadas, utilizando os procedimentos de extração e as condições cromatográficas propostas, para descartar a presença de contaminação.

Para confirmar a seletividade do método, foram analisadas amostras “branco” de plasma humano obtidas de seis indivíduos nas condições descritas na Tabela 11.

Tabela 11- Amostras do fluido biológico (plasma)

Indivíduo	Descrição	Origem	Lote
1	Plasma Humano Normal	HUSF	25888/3
2	Plasma Humano Normal	HUSF	51494/1
3	Plasma Humano Normal	HUSF	155050/4
4	Plasma Humano Normal	HUSF	26566/3
5	Plasma Humano Lipêmico	HUSF	51545/1
6	Plasma Humano Hemolisado	HUSF	480160/3

HUSF= Hospital Universitário São Francisco

Cada amostra branco foi testada (Figura 14 a 19), utilizando os procedimentos de extração e as condições cromatográficas propostas, para avaliar interferência no tempo de retenção do fármaco (0,91 min.) ou do padrão (0,86 min.) 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.

3.2.10.2- Curva de calibração

Para definir a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito, foi gerada uma curva de calibração com sete padrões contendo o fármaco e padrão interno. As concentrações dos padrões foram definidas em testes preliminares, incluindo a primeira quantificação de amostras, levando-se em consideração a sensibilidade do método e a faixa prevista das concentrações das amostras a serem determinadas.

3.2.10.3- Determinação do limite de quantificação

O limite de quantificação foi definido levando-se em consideração a sensibilidade, seletividade, precisão e exatidão do método analítico. Para a determinação do LQ, foram feitas análises da matriz biológica contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis. Com isto, tentou-se assegurar que os menores valores possíveis fossem analisados, por meio de repetições de análises, com valores sucessivamente menores, quando os inicialmente escolhidos fossem quantificados com precisão e exatidão aceitáveis. Para avaliar a sensibilidade, precisão e exatidão do método, amostras de controle de qualidade LQ também foram incluídas no procedimento de validação.

Os seguintes critérios foram seguidos para a definição do LQ:

- a) A resposta de pico para o LQ deve ser, no mínimo, 5 vezes maior que qualquer interferência na amostra branco no tempo de retenção do fármaco.
- b) O pico de resposta do fármaco no LQ deve ser identificável e reprodutível com precisão de 20% e exatidão entre 80-120% em relação à concentração nominal do padrão, através da análise de, no mínimo, cinco amostras de padrões.

3.2.10.4- Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais a concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. (Brasil, 2003)

A linearidade foi determinada para avaliar a performance do método. As funções de calibração foram calculadas através da razão entre as áreas dos picos da Levocetirizina e do padrão interno Fexofenadina.

A linearidade da curva de calibração foi avaliada dentro dos seguintes critérios:

- a) Desvio menor ou igual a 20% em relação a concentração nominal para o LQ, em pelo menos duas das triplicatas.
- b) Desvio menor ou igual a 15% em relação a concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração, em pelo menos duas das triplicatas.
- c) No mínimo 4 de 7 concentrações da curva de calibração devem cumprir com os critérios acima descritos, incluindo o LQ e a maior concentração da curva de calibração.
- d) O coeficiente de correlação será aceito se for igual ou maior do que 0,98.

3.2.10.5- Precisão e exatidão

Para avaliar a precisão e exatidão do método, quatro concentrações distintas, na faixa esperada de concentrações foram analisadas, utilizando-se determinações por concentração. A precisão e exatidão foram determinadas em um mesmo lote (precisão e exatidão intra-lote) e em lotes diferentes (precisão e exatidão inter-lotes).

3.2.10.6- Determinação das concentrações dos controles de qualidade

As concentrações das amostras controle de qualidade e os critérios utilizados para a definição de tais concentrações são apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12- Definição dos Controles de Qualidade (CQ)

Tipo do CQ	Identificação do CQ	Definição de Faixa	Valor Definido (ng/mL)
CQ-LQ	LQ	mesma concentração do LQ	0,5
CQ baixo	CQB	Menor ou igual 3 x LQ	1,5
CQ médio	CQM	aproximadamente a média entre CQB e CQA	200,0
CQ Alto	CQA	75-90% da maior concentração da curva de calibração	400,0

LQ= Limite de Quantificação, CQB= Controle de Qualidade Baixo, CQM= Controle de Qualidade Médio, CQA= Controle de Qualidade Alto.

3.2.10.7- Validação intra-lote

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

- a) Uma curva de calibração contendo os padrões definidos anteriormente.
- b) Cinco amostras de cada controle de qualidade definido acima.

Os seguintes critérios foram seguidos, para que a precisão e exatidão intra-lote fosse considerada aprovada:

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

3.2.10.8- Validação inter-lotes

Os seguintes critérios foram seguidos para considerar a precisão e exatidão inter-lotes aprovadas:

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

3.2.10.9- Validação da diluição

O objetivo da validação da diluição é garantir que as possíveis diluições de pontos acima do limite superior da curva de calibração apresentem resultados precisos e exatos. Para avaliação da exatidão e precisão os controles de qualidade foram diluídos com plasma branco na proporção de 1:1.

3.2.10.10- Recuperação

O cálculo da recuperação do fármaco é feito comparando-se as áreas dos picos da Levocetirizina (controles baixo, médio e alto) das amostras extraídas do plasma com as áreas dos picos da Levocetirizina preparada em solução.

O cálculo da recuperação do padrão interno é feito de maneira análoga, ou seja, comparando-se as áreas do pico da Fexofenadina extraída do plasma com as áreas dos picos da Fexofenadina preparada em solução (amostra não extraída) na concentração de 2,0 $\mu\text{g/mL}$.

3.2.11- Testes de Estabilidade

As condições de realização dos ensaios de estabilidade devem reproduzir as reais condições de manuseio e análise das amostras. A estabilidade do analito deve ser avaliada durante a coleta e manuseio da amostra, após armazenagem de longa duração (congelamento) e curta duração (à temperatura ambiente), após ciclos de degelo e nas condições de análise. Deve-se incluir também avaliação da estabilidade do analito nas soluções-padrão, preparadas com solvente apropriado em concentrações conhecidas. (BRASIL, 2003a)

3.2.11.1- Estabilidade no tempo e condições de análise

Para avaliar a estabilidade do fármaco no tempo e condições de análise, as amostras processadas foram mantidas dentro do auto-injetor, a temperatura ambiente de 22°C, e cada amostra de controle de qualidade foi analisada em triplicata nos tempos 0, 2, 4, 8, 12 e 16 horas.

3.2.11.2- Estabilidade do fármaco em ciclos de congelamento e degelo

Para avaliar a estabilidade da Levocetirizina durante três ciclos de congelamento e degelo, foram analisadas cinco amostras de cada controle de qualidade, nas seguintes condições; amostras CQB, CQM e CQA (degelo 1): as amostras foram congeladas a -70°C e mantidas nesta temperatura por 24 horas. Após este tempo, as amostras foram submetidas ao descongelamento natural, à temperatura ambiente, extraídas e imediatamente analisadas. Depois de completamente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas a -70°C, mantidas nesta temperatura de 12 a 24 horas e descongeladas (degelo 2). O mesmo procedimento foi repetido mais uma vez, com o intuito de completar o 3º ciclo de congelamento e descongelamento (degelo 3).

A estabilidade do analito foi comparada com a respectiva amostra recém-preparada.

3.2.11.3- Estabilidade das amostras de plasma não processadas

Para o teste proposto, cinco alíquotas de cada amostra em três diferentes concentrações foram mantidas antes do preparo à temperatura ambiente por 6 horas, o qual excede o tempo em que as amostras poderiam ser mantidas à temperatura ambiente depois de descongeladas até serem extraídas.

A estabilidade do analito foi comparada com a respectiva amostra recém-preparada.

3.2.11.4- Estabilidade de soluções padrão

Para avaliar a estabilidade da solução padrão, foram realizadas análises com soluções padrão de Levocetirizina 1,0 µg/mL e de Fexofenadina 1,0 µg/mL recém-preparadas, com soluções padrão que foram mantidas durante seis horas à temperatura ambiente e amostras dessas soluções que foram armazenadas na geladeira durante 10 dias.

3.2.11.5- Estabilidade de longa duração

Para avaliar a estabilidade do fármaco, em plasma, em condições de longa duração, o tempo de armazenamento deve exceder o intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra (14/11/06) e a análise da última amostra dos voluntários (11/01/07). Foram analisadas três diferentes concentrações (CQB, CQM e CQA) em quintuplicata no tempo inicial de coleta (08/11/06) e após 68 dias (15/01/07), estocadas nas mesmas condições que as amostras de plasma dos voluntários analisados (-70°C).

3.3- Análise Farmacocinética e Estatística

A bioequivalência entre as duas formulações foi avaliada pelo cálculo individual da razão teste/referência para a concentração máxima atingida (C_{max}), área sob a curva a partir da hora da administração do medicamento até a última

amostra acima do limite de quantificação (ASC_{0-t}) e a área sob a curva extrapolada ao infinito (ASC_{0-inf}).

A concentração máxima atingida (C_{max}) e o tempo empregado para alcançar esta concentração (T_{max}) foram obtidos diretamente das curvas.

A ASC_{0-t} foi calculada pelo método dos trapézios. Para o cálculo da ASC_{0-inf} utilizou-se a última concentração detectada acima do limite de quantificação (C_{ult}) e a constante de eliminação (k_e). A constante de eliminação foi calculada como o valor absoluto do coeficiente angular da reta ajustada por mínimos quadrados aos quatro (ou pelo menos três) últimos valores quantificáveis log-transformados (logaritmo natural) das concentrações: $ASC_{0-inf} = ASC_{0-t} + C_{ult}/k_e$.

Os dados obtidos de C_{max} , ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} passaram pela análise de variância (ANOVA) para verificar a existência de efeitos de seqüência e/ou período. O intervalo de confiança (IC90%) foi construído considerando as médias geométricas dos parâmetros farmacocinéticos e sua variabilidade (CV intra-individual). A decisão pela bioequivalência entre as formulações teste e referência consideraram os valores dos intervalos de confiança (IC90%) dos parâmetros farmacocinéticos dentro do intervalo de 0.8 a 1.25 definido pela ANVISA (RE 898/03).

Os aplicativos utilizados foram Sistema SAS® versão 9.1.3., SAS Institute Inc. e Microsoft Excel.

3.4- Simulação estatística dos parâmetros farmacocinéticos

Realizou-se uma simulação estatística com 24 voluntários escolhidos aleatoriamente (do voluntário de nº01 ao voluntário de nº25, pois o voluntário 08 não completou o estudo) e cronograma de coleta de amostras até 24 horas com o

objetivo de verificar a possibilidade de realização de estudos futuros com número de voluntários menor e tempos de coletas somente até 24 horas.

Os programas utilizados nessa simulação foram: WinNonlinTM, versão 5.2; EquivTest versão 2.0; Microsoft Excel, versão 97; Microsoft Word versão 97.

4- RESULTADOS

4.1- Desenvolvimento do Método Bioanalítico

Inicialmente, definiu-se o padrão interno a ser utilizado no método de quantificação. O padrão interno é um fármaco utilizado para auxiliar na quantificação do analito no plasma e monitorar o processo de extração. Ele precisa ter características químicas semelhantes ao analito pois, precisa ser retirados do plasma pelo mesmo processo de extração.

O padrão interno escolhido para o método Bioanalítico de quantificação de Levocetirizina em plasma foi a Fexofenadina.

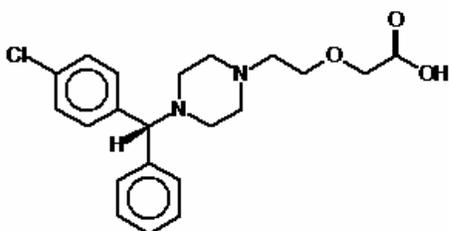


Figura 8- Estrutura Química da Levocetirizina

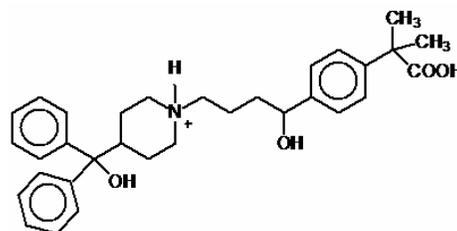


Figura 9- Estrutura Química da Fexofenadina

Realizou-se testes de extração líquido-líquido de diclorometano com solução de Hidróxido de Sódio (NaOH) e diclorometano com solução de Cloreto de Sódio (NaCl) saturado e desproteinização com Acetonitrila.

O processo de extração que apresentou melhor resultado foi Diclorometano com adição de solução Cloreto de Sódio (NaCl) saturado.

A coluna cromatográfica definida foi a Polaris C18 3 μ m (50,0 x 2,0 mm) por apresentar um tempo de retenção baixo para as moléculas de interesse e, a fase móvel definida foi Acetonitrila / Água Milli-Q / Ácido Fórmico 88% (80:20:0,1% v/v/v) por diminuir a relação sinal/ruído.

As figuras abaixo mostram os espectros de MS e MS/MS da Levocetirizina e da Fexofenadina que foram realizados para a definição do canal de monitoramento de cada um dos fármacos. Para Levocetirizina SRM 389 > 201 e para Fexofenadina SRM 502 > 467.

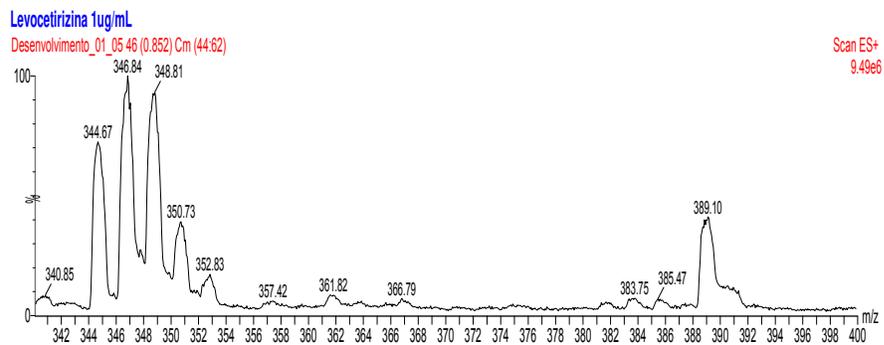


Figura 10- Espectro MS da Levocetirizina (Massa Molecular: 389)

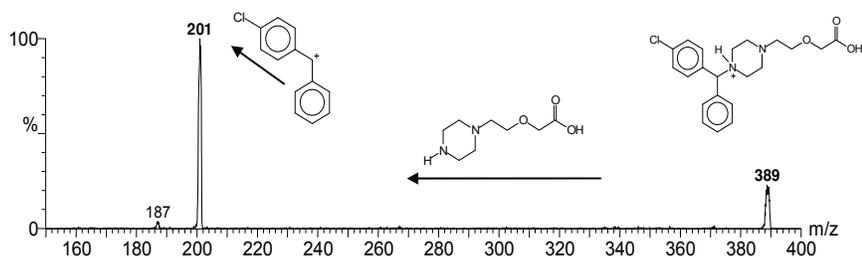


Figura 11- Espectro MS/MS da Levocetirizina – (ESI+) SRM 389 > 201

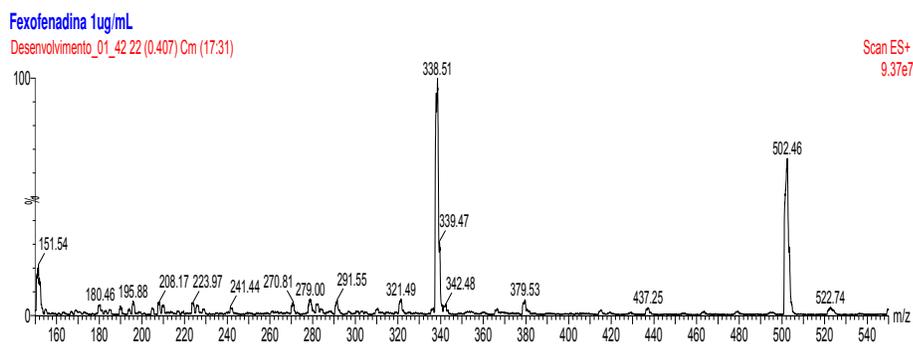


Figura 12- Espectro MS da Fexofenadina (Massa Molecular: 502)

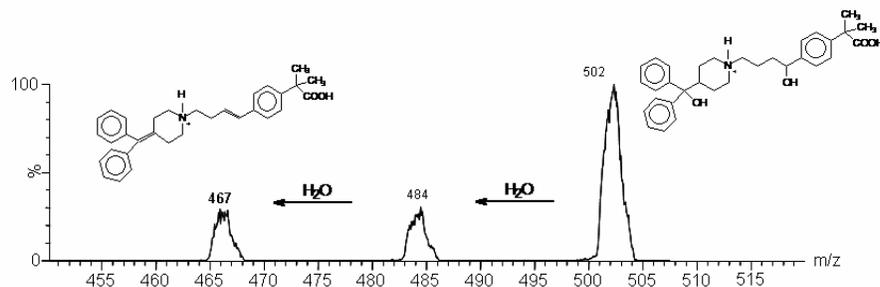


Figura 13- Espectro MS/MS da Fexofenadina – (ESI+) SRM 502 > 467

O tempo da corrida cromatográfica foi ajustado para 2,0 minutos. Ajustou-se experimentalmente as condições no espectrômetro de massas para otimização do sinal da Levocetirizina e Fexofenadina. A temperatura da fonte foi de 100° C e dessolvatação de 350° C. O fluxo dos gases do cone e dessolvatação foram de 10 e 346 L/h, respectivamente. Os valores de voltagem do capilar, cone e energia de colisão foram, respectivamente, 3,00 KV, 25,0 V e 12,0 eV para a Levocetirizina e 3,00 KV, 30,0 V e 20,0 eV para a Fexofenadina, tendo como pressão de Argônio para a dissociação $2,75 \times 10^{-3}$ mbar.

4.2- Validação do Método Bionalítico

4.2.1- Especificidade/Seletividade

O método proposto mostrou-se específico/seletivo para levocetirizina e fexofenadina pois nos resultados obtidos não foram encontradas interferências significativas(*) nos tempos de retenção do fármaco (0,91 minutos) e do padrão interno (0,86 minutos) como demonstrado nos cromatogramas apresentados nas Figuras 14, 15, 16, 17, 18 e 19.

(*) Os interferentes no tempo de retenção do fármaco deveriam estar abaixo de 20% da resposta do LQ (Figura 20) e no tempo de retenção do padrão interno abaixo de 5%.

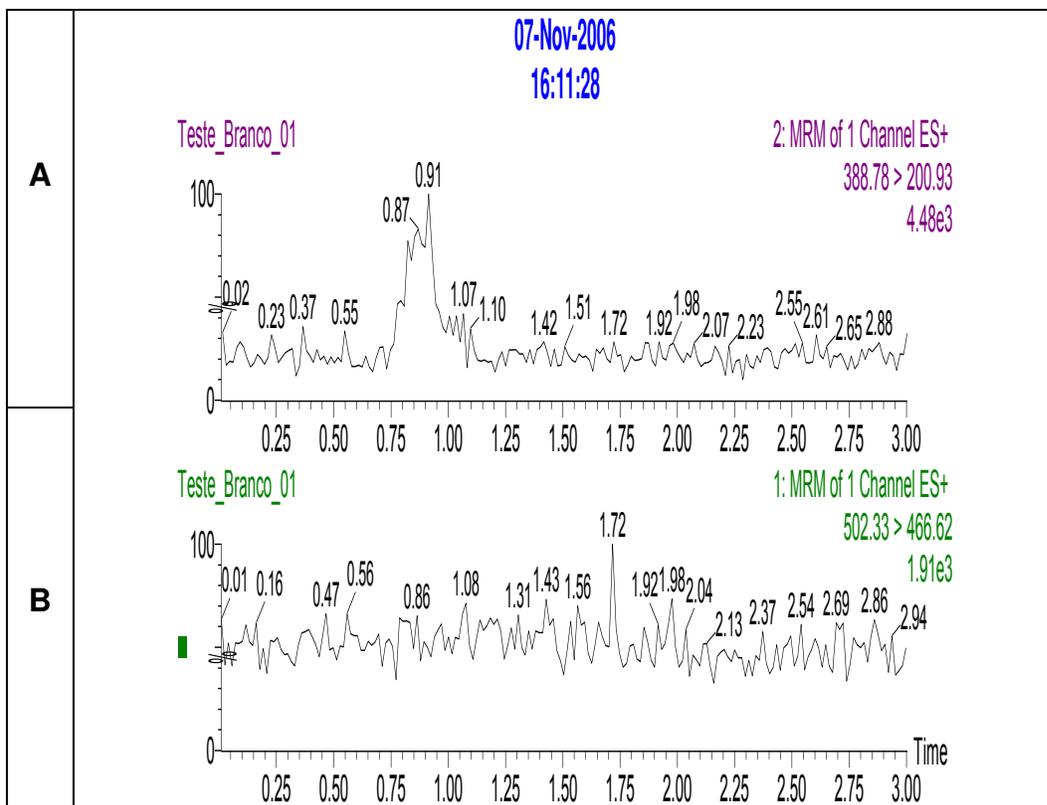


Figura 14- A) Plasma branco normal, lote 25888/3, cromatograma referente ao analito.
B) Plasma branco normal lote 25888/3, cromatograma referente ao branco do padrão interno.

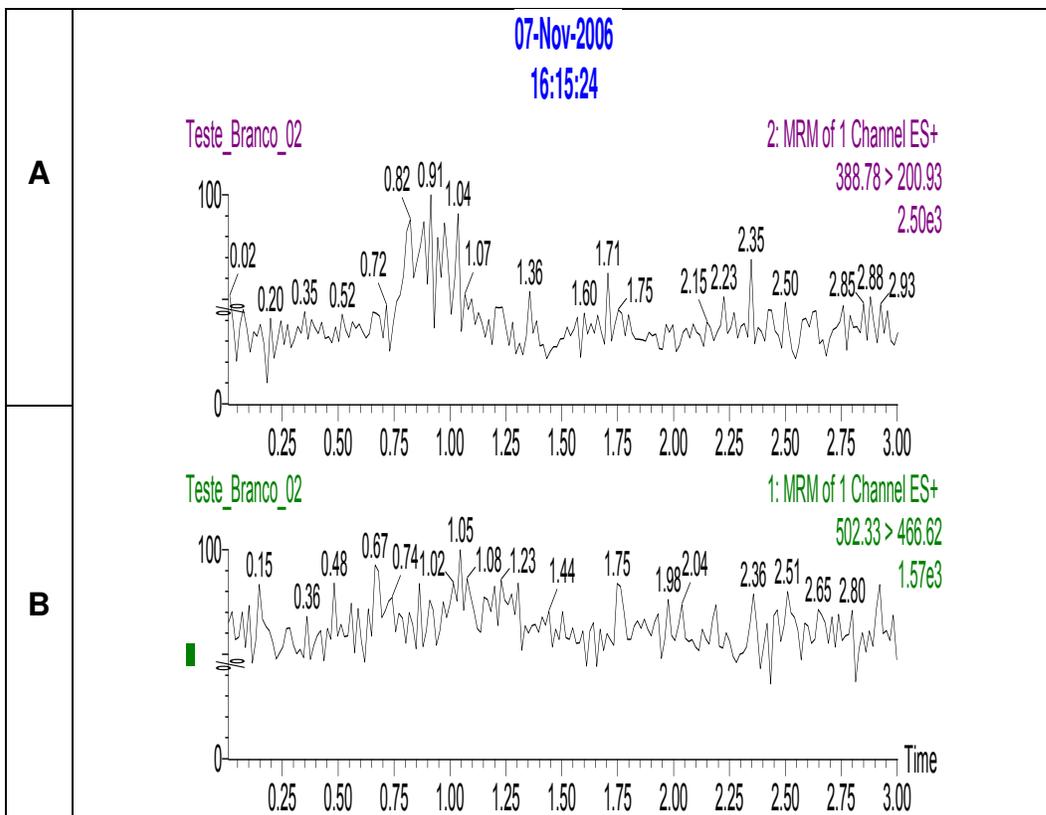


Figura 15- A) Plasma branco normal, lote 51494/1, cromatograma referente ao branco do analito.

B) Plasma branco normal, lote 51494/1, cromatograma referente ao branco do padrão interno.

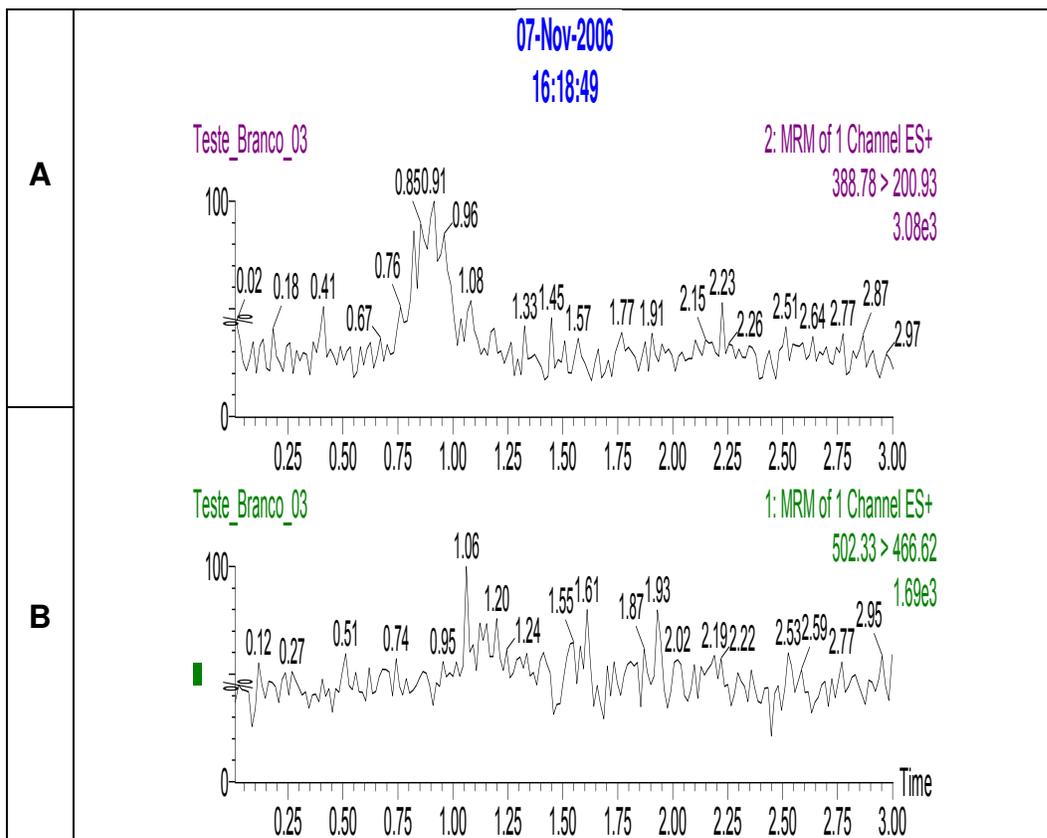


Figura 16- A) Plasma branco normal, lote 155050/4, cromatograma referente ao branco do analito.

B) Plasma branco normal, lote 155050/4 cromatograma referente ao branco do padrão interno.

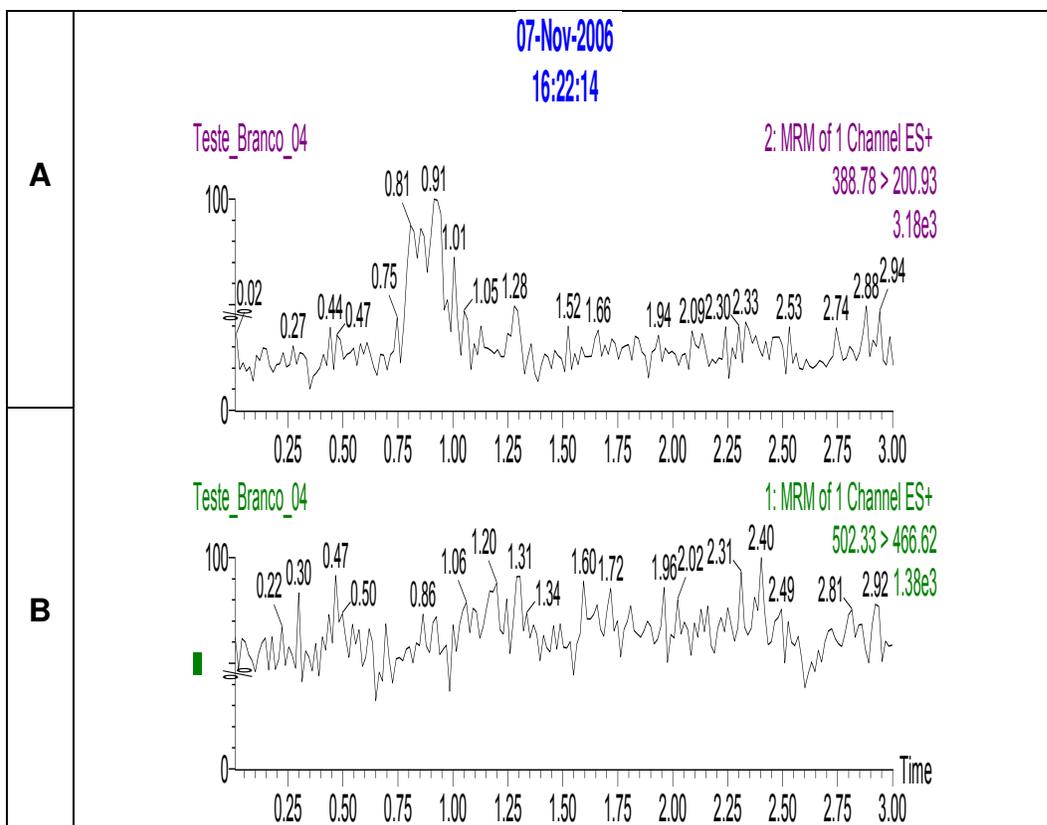


Figura 17- A) Plasma branco normal, lote 26566/3, cromatograma referente ao branco do analito.

B) Plasma branco normal, lote 26566/3, cromatograma referente ao branco do padrão interno.

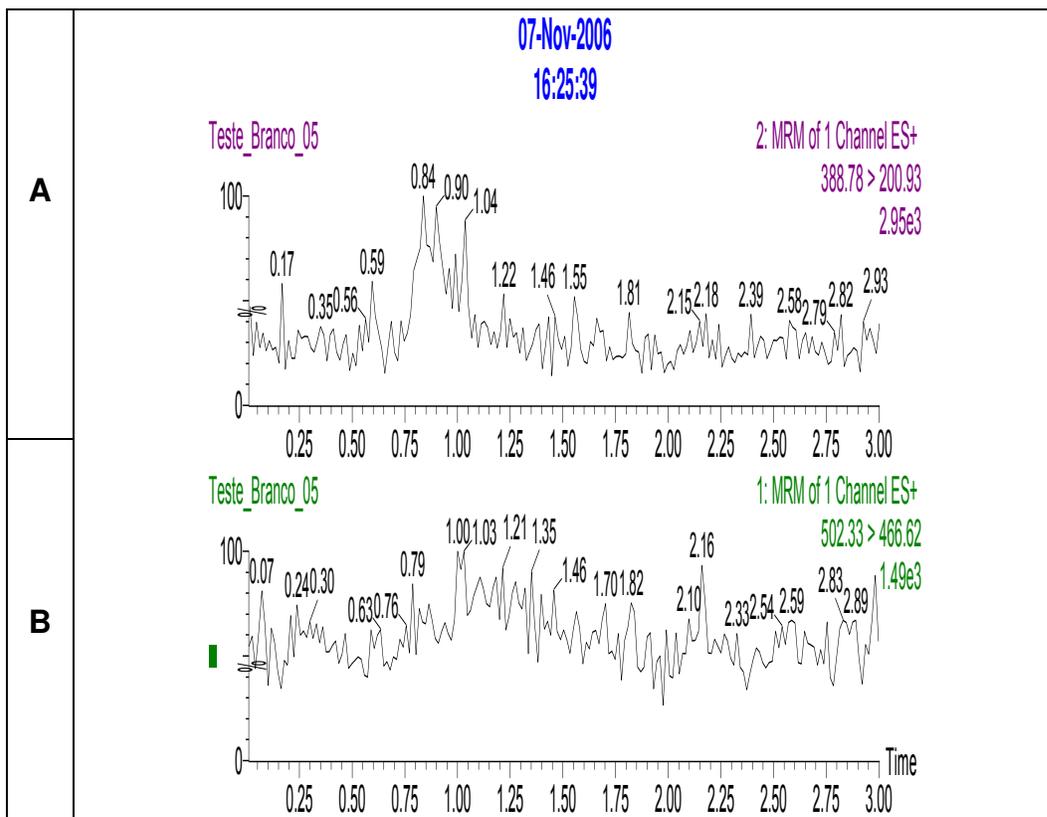


Figura 18- A) Plasma branco hemolisado, lote 480160/3, cromatograma referente ao branco do analito.

B) Plasma branco hemolisado, lote 480160/3. cromatograma referente ao branco do padrão interno.

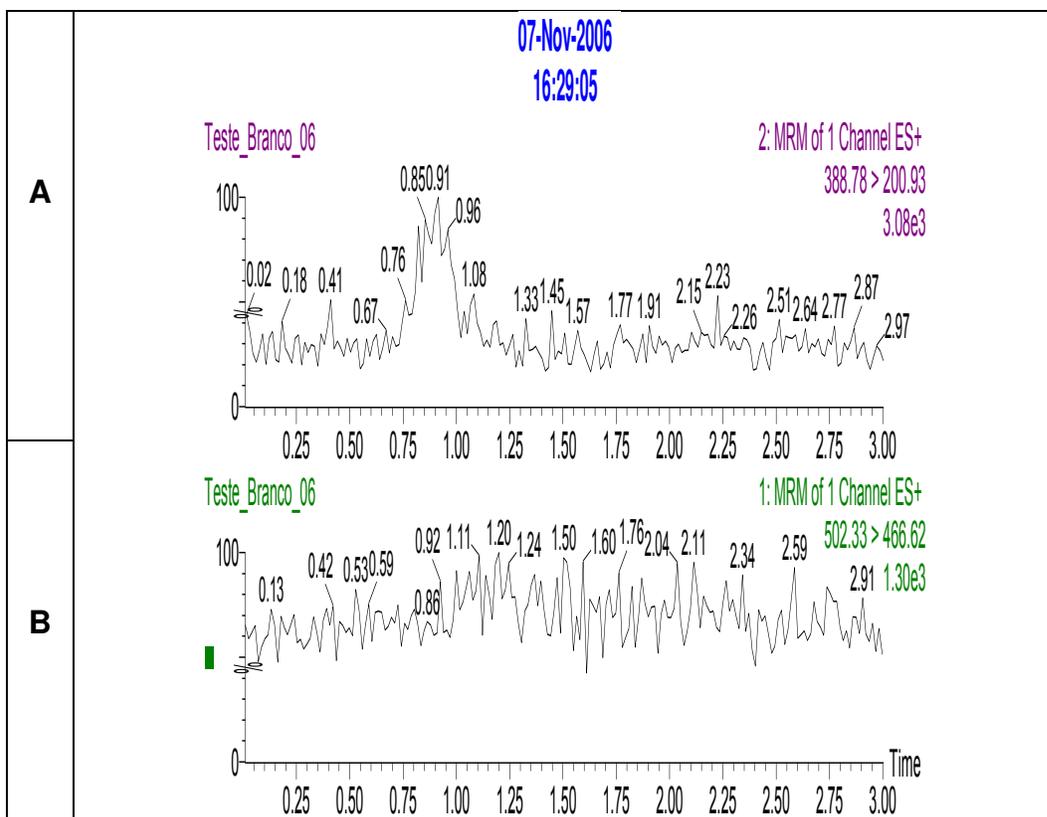


Figura 19- A) Plasma branco lipêmico, lote 51545/1, cromatograma referente ao branco do analito.
B) Plasma branco lipêmico, lote 51545/1, cromatograma referente ao branco do padrão interno.

4.2.2- Determinação do Limite de Quantificação

O Limite de Quantificação (LQ) validado sob as condições encontradas no pré-estudo de validação foi de 0,5 ng/mL. A precisão foi $\leq 20\%$ e a exatidão esteve entre 80-120%.

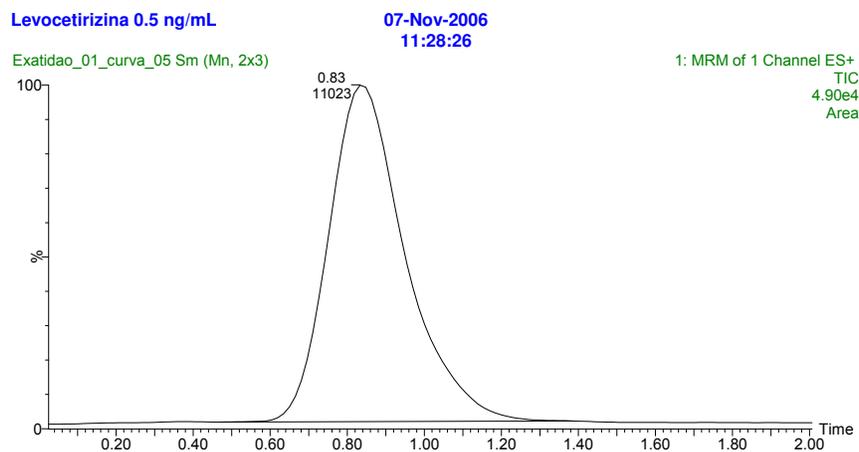


Figura 20- Cromatograma da Levocetirizina na concentração do LQ (0,5 ng/mL).

4.2.3- Linearidade

O método apresentou-se linear na faixa de concentração de 0,5 a 500,0 ng/mL (conforme demonstrado na figura 21) e o coeficiente de correlação (r) de todas as curvas de calibração foi acima de 0,98.

Compound name: Levocetirizina
 Correlation coefficient: $r = 0.997226$, $r^2 = 0.994460$
 Calibration curve: $0.057822 * x + 0.0142815$
 Response type: Internal Std (Ref 2), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x^2$, Axis trans: None

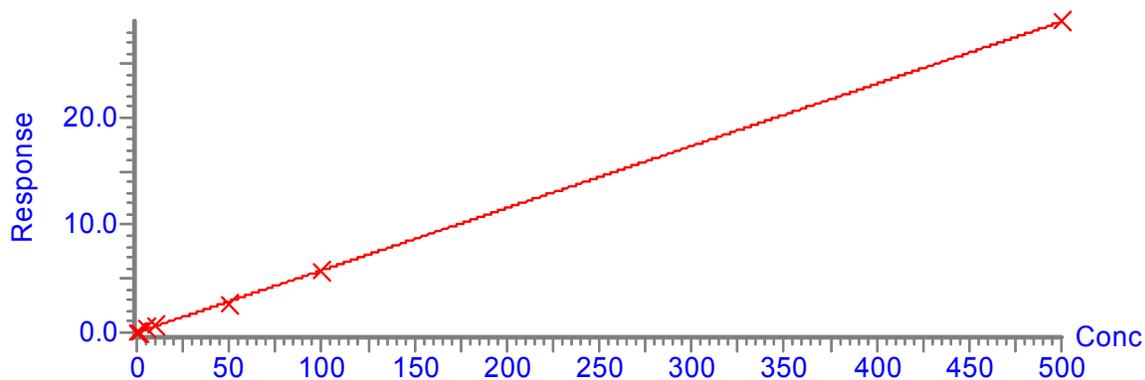


Figura 21- Linearidade da Levocetirizina.

4.2.4- Precisão e Exatidão

Para a obtenção da precisão e exatidão, pelo menos quatro concentrações distintas (LQ e Controles de Qualidade) foram avaliadas usando cinco amostras de cada concentração.

4.2.4.1- Precisão e Exatidão Intra-lote.

Os resultados estão apresentados nas tabelas 13 e 14. A média final apresentada na tabela foi obtida pelo cálculo das concentrações quantificadas de cinco amostras individuais. Como podemos observar, a precisão para as quatro concentrações variou de 3,02 a 17,43%, não excedendo o limite de 15% para os Controles de Qualidade e 20% para o LQ. A exatidão esteve entre 88,00 e 104,00%.

Tabela 13- Análise Intra-Lote do Controle de Qualidade LQ:

Replicatas	LQ (lote 1)	LQ (lote 2)	LQ (lote 3)
1	0,50	0,50	0,50
2	0,40	0,60	0,50
3	0,60	0,50	0,40
4	0,50	0,40	0,40
5	0,60	0,40	0,40
Média	0,52	0,48	0,44
DP	0,08	0,08	0,05
CV (%)	16,09	17,43	12,45
Exatidão(%)	104,00	96,00	88,00

Concentração nominal: LQ= 0,5 ng/mL, DP= Desvio Padrão e CV= coeficiente de variação

Tabela 14- Análise Intra-Lote dos Controles de Qualidade CQB, CQM e CQA:

Replicatas	CQB	CQM	CQA
1	1,50	190,70	371,00
2	1,50	213,80	396,40
3	1,50	204,00	418,30
4	1,40	187,10	404,40
5	1,50	207,70	386,40
Média	1,48	200,66	395,30
DP	0,04	11,36	17,91
CV (%)	3,02	5,66	4,53
Exatidão(%)	98,67	100,33	98,83

Concentração nominal: CQB= 1,5 ng/mL, CQM= 200,0 ng/mL e CQA= 400,0 ng/mL, DP= Desvio Padrão e CV= coeficiente de variação

4.2.4.2- Precisão e Exatidão Inter-lote

A análise dos resultados estão apresentados na tabela 15 e 16. Como podemos observar, a precisão para as quatro concentrações variou de 3,78 a 16,14%, não excedendo o limite de 15% para os Controles de Qualidade e 20% para o LQ. A exatidão esteve entre 96,00 e 99,63%.

Tabela 15- Análise Inter-Lotes do Controle de Qualidade LQ:

	LQ (ng/mL)
Média	0,48
DP	0,08
CV (%)	16,14
Exatidão (%)	96,00

Concentração nominal: LQ= 0,5 ng/mL, DP= Desvio Padrão e CV= coeficiente de variação

Tabela 16- Análise Inter-Lotes dos Controles de Qualidade CQB, CQM 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 (lote 3)
1	1,50	1,40	1,60	190,70	214,00	183,50	371,00	373,60	385,70
2	1,50	1,50	1,40	213,80	213,40	222,50	396,40	368,20	381,40
3	1,50	1,40	1,50	204,00	200,80	210,40	418,30	405,50	391,80
4	1,40	1,30	1,50	187,10	176,60	195,50	404,40	402,90	381,80
5	1,50	1,50	1,50	207,70	182,00	187,00	386,40	408,10	394,60
Média	1,48	1,42	1,50	200,66	197,36	199,78	395,30	391,66	387,06
DP	0,04	0,08	0,07	11,36	17,41	16,40	17,91	19,14	5,93
CV (%)	3,02	5,89	4,71	5,66	8,82	8,21	4,53	4,89	1,53
Exatidão(%)	98,67	94,67	100,00	100,33	98,68	99,89	98,83	97,92	96,77
				CQB	CQM		CQA		
	Média			1,47	199,27		391,34		
	DP			0,07	14,23		14,78		
	CV (%)			4,93	7,14		3,78		
	Exatidão (%)			97,78	99,63		97,84		

Concentração nominal: CQB= 1,5 ng/mL, CQM= 200,0 ng/mL e CQA= 400,0 ng/mL, DP= Desvio Padrão e CV= coeficiente de variação

4.2.5- Recuperação

Os resultados para o analito e para o padrão interno mostraram uma recuperação consistente e reprodutível nas três diferentes concentrações como indicado nas tabelas 17 e 18. Esses resultados estiveram de acordo com os parâmetros de consistência e reprodutibilidade e foram considerados adequados para o método.

Tabela 17- Análise da percentagem de recuperação da Levocetirizina:

Réplicas	Area Solução/Fármaco			Area Plasma/Fármaco		
	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
1	5337,584	639939,438	1066692,625	2423,722	375754,969	713443,063
2	5044,099	623072,813	1033737,625	2990,203	297944,688	811589,563
3	4761,075	625555,375	1254741,750	2946,923	383648,781	760361,375
4	4695,223	597920,938	1264564,750	2701,901	395262,438	839695,125
5	4806,224	610302,375	1303702,125	3250,262	406938,938	815989,125
Média	4929	619358	1184688	2863	371910	788216
DP	264	15948	124661	313	42999	50830
CV (%)	5,35	2,57	10,52	10,94	11,56	6,45
	Recuperação (%)			82,97	85,78	95,04

DP= Desvio Padrão e CV= coeficiente de variação.

Tabela 18- Análise da percentagem de recuperação do padrão interno (Fexofenadina):

Réplicas	Área Solução do Pi	Área Plasma Pi
1	236260,625	178908,969
2	246342,719	165280,266
3	241121,469	142828,078
4	243403,672	189084,574
5	236841,516	195713,250
Média	240794	174363
DP	4297,66	21036,70
CV (%)	1,78	12,06
	Recuperação (%)	72,41

DP= Desvio Padrão e CV= coeficiente de variação.

4.2.6- Testes de Estabilidade

4.2.6.1- Estabilidade no tempo e condições de análise

A Tabela 19 apresenta as variações obtidas quando são comparados os valores médios de CQB, CQM e CQA obtidos no tempo 0 h com os valores médios de CQB, CQM e CQA obtidos no tempo 16 h. Os resultados obtidos estão abaixo do desvio permitido de 15% para os três controles analisados e, portanto, pode-se concluir que as amostras permaneceram estáveis dentro do auto-injetor durante o período de 16 horas.

Tabela 19- Média e Desvios obtidos no estudo de estabilidade da Levocetirizina (ng/mL) em plasma submetido à análise no auto-injetor:

t (0 h)	CQB	CQM	CQA	t (16 h)	CQB	CQM	CQA
Média	1,37	206,67	424,27	Média	1,30	212,77	420,50
DP	0,06	5,83	5,39	DP	0,00	2,95	11,27
CV (%)	4,38	2,82	1,27	CV (%)	0,00	1,39	2,68
					CQB	CQM	CQA
Varição entre o tempo de 0 a 16 h (%)					-4,88	2,95	-0,89

Concentração nominal: CQB= 1,5 ng/mL, CQM= 200,0 ng/mL e CQA= 400,0 ng/mL, DP= Desvio Padrão e CV= coeficiente de variação

4.2.6.2- Estabilidade do fármaco em ciclos de congelamento e degelo

Os resultados apresentados nas tabelas 20 e 21 indicam que a levocetirizina é estável por pelo menos três ciclos de congelamento e degelo, quando estocados à -70°C e descongelados a temperatura ambiente.

Tabela 20- Estudo de estabilidade da Levocetirizina em plasma submetido a três ciclos de congelamento e descongelamento:

Réplicas	Amostras recém-preparadas			CQB			CQM			CQA		
	CQB	CQM	CQA	Deg.1	Deg.2	Deg.3	Deg.1	Deg.2	Deg.3	Deg.1	Deg.2	Deg.3
1	1,40	202,10	382,70	1,60	1,70	1,70	208,60	210,90	219,70	426,90	418,90	351,40
2	1,50	217,40	407,40	1,50	1,70	1,60	228,30	222,20	216,00	415,50	407,60	441,50
3	1,40	210,30	415,60	1,50	1,60	1,40	220,30	229,00	225,00	416,50	423,00	453,20
4	1,50	200,90	426,30	1,30	1,70	1,60	219,50	212,30	223,50	419,40	438,40	436,20
5	1,50	211,80	431,30	1,30	1,30	1,60	214,10	213,30	226,10	439,30	453,00	430,90
Média	1,46	208,50	412,66	1,44	1,60	1,58	218,16	217,54	222,06	423,52	428,18	422,64
DP	0,05	6,93	19,15	0,13	0,17	0,11	7,37	7,79	4,16	9,89	17,73	40,67
CV (%)	3,42	3,32	4,64	9,03	10,63	6,96	3,38	3,58	1,87	2,33	4,14	9,62
Exatidão (%)	97,33	104,25	103,17	96,00	106,67	105,33	109,08	108,77	111,03	105,88	107,05	105,66

Concentração nominal: CQB= 1,5 ng/mL, CQM= 200,0 ng/mL e CQA= 400,0 ng/mL, DP= Desvio Padrão e CV= coeficiente de variação

Na Tabela 21 são apresentadas as variações das médias dos controles de qualidades (CQB, CQM e CQA) para o 3^o degelo em relação às médias obtidas para as amostras recém-preparadas. Pode-se observar que essas variações são $\leq 15\%$.

Tabela 21- Variação (%) das médias dos controles de qualidade para o 3^o degelo em relação às médias das amostras recém-preparadas:

	CQB			CQM			CQA		
	Deg.1	Deg.2	Deg.3	Deg.1	Deg.2	Deg.3	Deg.1	Deg.2	Deg.3
Variação (%)	-1,37	9,59	8,22	4,63	4,34	6,50	2,63	3,76	-1,37

Concentração nominal: CQB= 1,5 ng/mL, CQM= 200,0 ng/mL e CQA= 400,0 ng/mL

4.2.6.3- Estabilidade das amostras de plasma não processadas

Pode-se observar pelos resultados apresentados nas tabelas 22 e 23, que as variações em relação às concentrações nominais encontram-se dentro da faixa permitida, indicando que a levocetirizina quando processada até 6 horas após estar na temperatura ambiente, não apresenta degradação significativa.

Tabela 22- Estabilidade das soluções padrão para a Levocetirizina (ng/mL):

Réplicas	Amostras Recém preparadas 08/11/06			Amostras analisadas após 6 horas a temperatura ambiente		
	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
1	1,40	202,10	382,70	1,50	211,80	380,10
2	1,50	217,40	407,40	1,40	212,20	410,80
3	1,40	210,30	415,60	1,40	216,50	430,70
4	1,50	200,90	426,30	1,50	223,40	407,90
5	1,50	211,80	431,30	1,50	202,40	403,10
Média	1,46	208,50	412,66	1,46	213,26	406,52
DP	0,05	6,93	19,15	0,05	7,66	18,13
CV (%)	3,42	3,32	4,64	3,42	3,59	4,46
Exatidão (%)	97,33	104,25	103,17	97,33	106,63	101,63

Concentração nominal: CQB= 1,5 ng/mL, CQM= 200,0 ng/mL e CQA= 400,0 ng/mL, DP= Desvio Padrão e CV= coeficiente de variação

Na Tabela 23 são apresentadas as variações das médias para os controles de qualidade CQB, CQM e CQA das amostras não processadas 6 h à temperatura ambiente em relação às médias obtidas para as amostras recém-preparadas.

Tabela 23- Variação (%) das médias dos controles de qualidade para as amostras não processadas 6 h à temperatura ambiente em relação às médias das amostras recém-preparadas:

Variação (%)	amostras analisadas após 6 h à temperatura ambiente		
	CQB	CQM	CQA
	0,00	2,28	-1,49

Concentração nominal: CQB= 1,5 ng/mL, CQM= 200,0 ng/mL e CQA= 400,0 ng/mL

4.2.6.4- Estabilidade de soluções padrão

Para avaliar a estabilidade das soluções padrão foram comparadas as áreas dos picos da Levocetirizina e da Fexofenadina das amostras recém-preparadas com as áreas dos picos da Levocetirizina e da Fexofenadina das amostras mantidas à temperatura ambiente por 6 h e das amostras refrigeradas durante 10 dias. As tabelas 24 e 25 mostram que nas condições citadas acima, as soluções-padrão não apresentaram degradação.

Tabela 24- Estabilidade das soluções padrão para a Levocetirizina (área) e Fexofenadina (área):

Réplicas	Recém Preparada		Amostras analisadas 6 h após preparo a temperatura ambiente		Amostras analisadas após 10 dias sob refrigeração	
	Levocetirizina	Fexofenadina	Levocetirizina	Fexofenadina	Levocetirizina	Fexofenadina
1	4734185,000	1134409,875	4532626,500	1204164,375	4743338,500	1163043,125
2	4975220,500	1143659,625	4418268,500	1213534,500	4730752,000	1157566,500
3	4816144,000	1134697,750	4461877,500	1184583,250	4653864,000	1186210,875
Média	4841849,833	1137589,083	4470924,167	1200760,708	4709318,167	1168940,167
DP	122556,601	5259,213	57713,254	14772,692	48435,302	15205,472
CV (%)	2,53	0,46	1,29	1,23	1,03	1,30

DP= Desvio Padrão e CV= coeficiente de variação

Tabela 25- Variação (%) das médias dos controles de qualidade para as soluções padrão mantidas 6 h à temperatura ambiente e soluções padrão depois de 10 dias sob refrigeração em relação às médias das soluções recém-preparadas:

Variação	Amostras analisadas 6 h Após preparo		Amostras após 10 dias sob refrigeração	
	Levocetirizina	Fexofenadina	Levocetirizina	Fexofenadina
	-7,66	5,55	-2,74	2,76

4.2.6.5- Estabilidade de longa duração

Os resultados obtidos no teste de longa duração indicam que a levocetirizina em plasma humano podem ser armazenados em freezer a -70°C por até 68 dias, com nenhuma degradação significativa do analito como apresentado nas tabelas 26 e 27.

Tabela 26- Estabilidade de longa duração para Levocetirizina no fluido biológico:

Réplicas	Amostras Recém Preparadas 08/11/06			Amostras de longa duração 15/01/07		
	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
1	1,40	202,10	382,70	1,40	190,10	403,80
2	1,50	217,40	407,40	1,50	188,10	384,20
3	1,40	210,30	415,60	1,60	203,00	405,00
4	1,50	200,90	426,30	1,60	200,50	385,80
5	1,50	211,80	431,30	1,60	201,00	373,10
Média	1,46	208,50	412,66	1,54	196,54	390,38
DP	0,05	6,93	19,15	0,09	6,89	13,71
CV (%)	3,42	3,32	4,64	5,84	3,51	3,51
Exatidão (%)	97,33	104,25	103,17	102,67	98,27	97,60

Concentração nominal: CQB= 1,5 ng/mL, CQM= 200,0 ng/mL e CQA= 400,0 ng/mL, DP=Desvio Padrão e CV= coeficiente de variação

Na Tabela 27 são apresentadas as variações das médias para cada controle de qualidade (CQB, CQM e CQA) das amostras de longa duração em relação às médias obtidas para as amostras recém-preparadas.

Tabela 27- Variação das médias dos controles de qualidade para as amostras de longa duração em relação às médias das amostras recém-preparadas:

	CQB	CQM	CQA
Varição (%)	5,48	-5,74	-5,40

Concentração nominal: CQB= 1,5 ng/mL, CQM= 200,0 ng/mL e CQA= 400,0 ng/mL

4.3- Análise Farmacocinética e Estatística

O gráfico 1 apresenta a curva média das concentrações plasmáticas de levocetirizina após administração de cada uma das formulações (n= 35 voluntários e cronograma de coletas até 48 horas). Podemos observar na Tabela 28 que os valores correspondentes de C_{max} e T_{max} foram equivalentes entre a formulações estudadas.

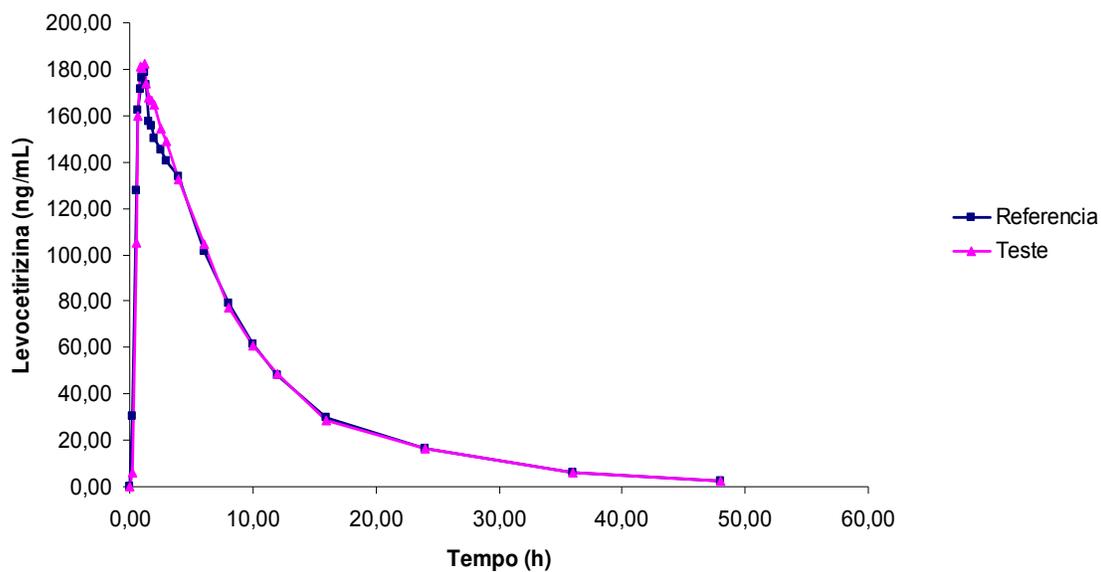


Gráfico 1- Curva média de concentração plasmática *versus* tempo das formulações teste e referência administradas a 35 voluntários.

A concentração plasmática individual do medicamento teste e referência para cada voluntário se encontra no Anexo 5.

Tabela 28- Parâmetros farmacocinéticos das duas formulações de levocetirizina (n= 35 voluntários e cronograma de coleta de amostras até 48 horas):

Parâmetro	Formulação Referência		Formulação Teste	
	Media	Desvio	Media	Desvio
ASC_{0-t} (ng.h/mL)	1,743,71	492,24	1,752,91	447,02
ASC_{0-inf} (ng.h/mL)	1,775,40	507,29	1,785,85	461,27
C_{max} (ng/mL)	228,11	60,55	226,91	61,76
T_{max} (h)	0,83	3,50	0,83	2,34
T_{1/2} (h)	8,07	5,86	8,99	4,67

ASC_{0-t}= área sob a curva desde o tempo 0 até o tempo t (tempo relativo a última concentração do fármaco determinada experimentalmente – acima do limite de quantificação), calculada pelo método dos trapézios.

ASC_{0-inf}= área sob a curva desde o tempo 0 projetada até o infinito.

C_{max}= Concentração máxima.

T_{max}= tempo decorrido até a ocorrência da concentração máxima.

T_{1/2}= Tempo de meia-vida de eliminação.

A tabela 29 mostra os resultados das análises de bioequivalência dos parâmetros farmacocinéticos para ASC_{0-t}, ASC_{0-inf} e C_{max} (n= 35 voluntários e cronograma de coletas até 48 horas).

Tabela 29- Razão entre as médias geométricas das formulações teste e referência, os respectivos intervalos de confiança e o coeficiente de variação intra-indivíduo para os 35 voluntários:

Parâmetro	Razão T/R	IC 90%	CV
ASC_{0-t}	101,11	97,42 – 104,93	9,19
ASC_{0-inf}	101,17	97,49 – 104,99	9,17
C_{max}	99,43	94,29 – 104,86	13,17

ASC_{0-t}= área sob a curva desde o tempo 0 até o tempo t (tempo relativo a última concentração do fármaco determinada experimentalmente – acima do limite de quantificação), calculada pelo método dos trapézios.

ASC_{0-inf}= área sob a curva desde o tempo 0 projetada até o infinito.

C_{max}= Concentração máxima.

IC 90%= Intervalo de Confiança de 90%.

CV= Coeficiente de Variação intra-individual.

A tabela 30 apresenta a comparação entre os dados farmacocinéticos obtidos pelo estudo e os dados publicados por Hair et al (2006).

Tabela 30- Comparação de dados farmacocinéticos:

Parâmetro	Dose (mg)	C _{máx} (ng/mL)	T _{max} (h)	T _{1/2} (h)	ASC (ng mLh)
Referência	5	228	0,83	8,07	1744
Teste	5	227	0,83	8,99	1753
Hair <i>et al.</i> (2006)	5	270	0,75	7,05	2310

Realizou-se uma simulação estatística com número de voluntários e tempos de coleta reduzidos para observarmos a variação nos resultados dos parâmetros farmacocinéticos. Os resultados obtidos nessa simulação são apresentados na tabela abaixo.

Tabela 31- Parâmetros farmacocinéticos das duas formulações de levocetirizina (n= 24 voluntários e cronograma de coletas até 24 horas):

Parâmetro	Formulação Referência		Formulação Teste	
	Media	Desvio	Media	Desvio
ASC _{0-t} (ng,h/mL)	1.570,29	412,14	1.568,14	394,01
ASC _{0-inf} (ng,h/mL)	1.759,41	490,53	1.766,08	503,64
C _{max} (ng/mL)	226,48	57,18	213,05	53,01
T _{max} (h)	0,99	0,46	1,21	0,68
T _{1/2} (h)	7,20	2,05	7,13	2,88

ASC_{0-t}= área sob a curva desde o tempo 0 até o tempo t (tempo relativo a ultima concentração do fármaco determinada experimentalmente – acima do limite de quantificação), calculada pelo método dos trapézios.

ASC_{0-inf}= área sob a curva desde o tempo 0 projetada até o infinito.

C_{max}= Concentração máxima.

T_{max}= tempo decorrido ate a ocorrência da concentração máxima.

T_{1/2}= Tempo de meia-vida de eliminação.

Tabela 32- Razão entre as médias geométricas das formulações teste e referência, os respectivos intervalos de confiança e o coeficiente de variação intra-indivíduo para os 24 voluntários:

Parâmetro	Razão T/R	IC 90%	CV
ASC_{0-t}	100,23	95,53 – 105,15	9,67
ASC_{0-inf}	100,62	95,04 – 106,53	11,50
C_{max}	94,51	89,82 – 99,46	10,27

ASC_{0-t}= área sob a curva desde o tempo 0 até o tempo t (tempo relativo a última concentração do fármaco determinada experimentalmente – acima do limite de quantificação), calculada pelo método dos trapézios.

ASC_{0-inf}= área sob a curva desde o tempo 0 projetada até o infinito.

C_{max}= Concentração máxima.

IC 90%= Intervalo de Confiança de 90%.

CV= Coeficiente de Variação intra-individual.

O gráfico 2 (simulação estatística) apresenta a curva média das concentrações plasmáticas de levocetirizina após administração de cada uma das formulações (n= 24 voluntários e cronograma de coletas até 24 horas). Podemos observar que os valores correspondentes de C_{max} e T_{max} foram equivalentes entre as formulações estudadas.

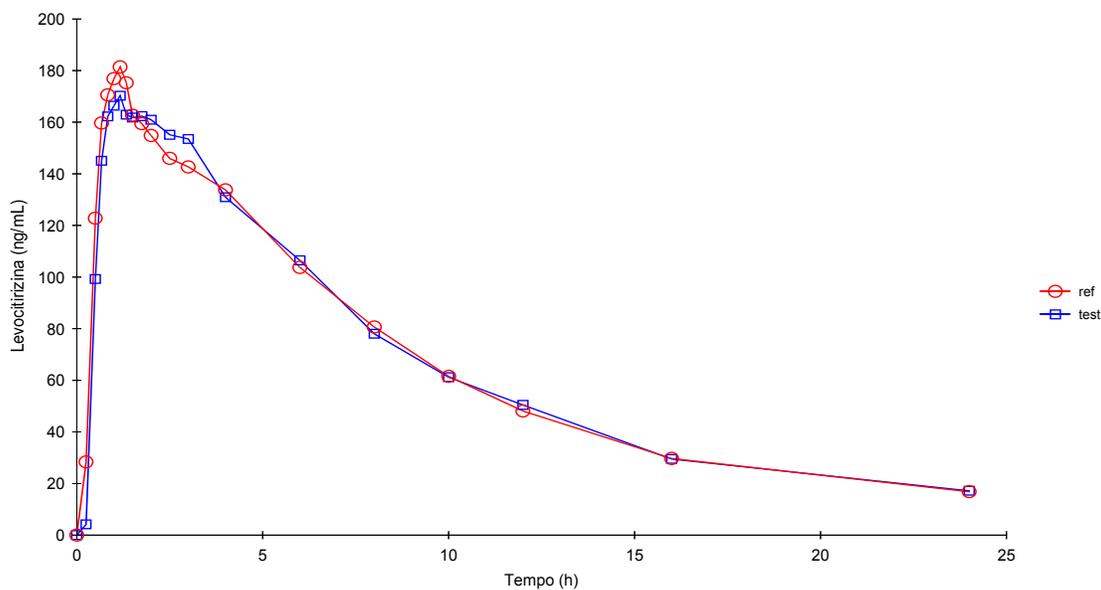


Gráfico 2- Curva média de concentração plasmática *versus* tempo das formulações teste e referência administradas a 24 voluntários.

A tabela 33 mostra a comparação da análise farmacocinética com os dados originais desse estudo (35 voluntários e cronograma de coleta de amostras até 48 horas) com a análise farmacocinética da simulação realizada com 24 voluntários e cronograma de coleta de amostras até 24 horas.

Tabela 33- Comparação dos dados das duas análises estatísticas:

Parâmetro	35 voluntários – até 48 horas			24 voluntários – até 24 horas		
	Razão T/R	IC 90%	CV	Razão T/R	IC 90%	CV
ASC_{0-t}	101,11	97,42 – 104,93	9,19	100,23	95,53 – 105,15	9,67
ASC_{0-inf}	101,17	97,49 – 104,99	9,17	100,62	95,04 – 106,53	11,50
C_{max}	99,43	94,29 – 104,86	13,17	94,51	89,82 – 99,46	10,27

ASC_{0-t}= área sob a curva desde o tempo 0 até o tempo t (tempo relativo a última concentração do fármaco determinada experimentalmente – acima do limite de quantificação), calculada pelo método dos trapézios.

ASC_{0-inf}= área sob a curva desde o tempo 0 projetada até o infinito.

C_{max}= Concentração máxima.

IC 90%= Intervalo de Confiança de 90%.

CV= Coeficiente de Variação intra-individual.

Nas duas análises estatísticas a razão da ASC_{0-t} / ASC_{0-inf} foi de 0,99.

Os resultados obtidos na simulação estatística dos dados farmacocinéticos (24 voluntários e cronograma de coleta de amostras até 24 horas) mostraram-se muito próximos dos resultados obtidos com os dados originais.

5- DISCUSSÃO

No desenvolvimento do método analítico, a Fexofenadina foi escolhida como padrão interno da Levocetirizina por conter grupamentos químicos semelhantes (ácido carboxílico, amina e anéis aromáticos) como mostrado na Figura 9. A observação dessas características na escolha de um padrão interno é fundamental para se obter bons resultados.

O processo de extração que apresentou melhor resultado foi Diclorometano com adição de solução de NaCl saturado pois, a adição de sal facilita a passagem das moléculas para o solvente orgânico e com isso temos uma amostra com menos interferentes.

O objetivo de estudos de bioequivalência é o de verificar a existência ou não de diferenças entre formulações farmacêuticas no que se refere aos parâmetros relacionados à extensão e velocidade de absorção do princípio ativo a partir de sua forma farmacêutica (C_{max} e ASC), administrados, geralmente, por via oral.

Assim, o protocolo clínico foi delineado com o intuito de minimizar a influência de fatores que não estão relacionados à de este processo em particular, considerando para isso a inclusão de um número adequado de voluntários, a coleta de amostras por um período de tempo superior a 3 vezes a meia-vida de eliminação do fármaco, a coleta de pontos próximos a concentração máxima plasmática (C_{max}) e o emprego de um método analítico preciso e exato. Todas essas considerações foram norteadas pelas resoluções (RE) da ANVISA referentes à bioequivalência de medicamentos.

Neste sentido, o plano experimental considerado para o presente estudo foi o tipo aberto, randomizado, dose única, 2 tratamentos, cruzado, com intervalo entre os períodos (washout) de, no mínimo, sete meias vidas de eliminação do fármaco e empregando 35 voluntários sadios (ambos os sexos) em condições de jejum.

O delineamento cruzado é comumente utilizado uma vez que a variabilidade inter-individual é removida da comparação entre as formulações utilizadas no estudo já que a formulação teste e referência são comparadas no mesmo indivíduo, sendo esse seu próprio controle. Dessa forma, para a comparação dos dois produtos, foram empregados 2 períodos e 2 seqüências.

O intervalo estipulado entre as interações, denominado “washout”, compreendeu um período de tempo que garantiu a completa eliminação do fármaco do organismo ou, pelo menos a obtenção de valores de concentração plasmáticas inferiores ao limite de quantificação estipulado para o método cromatográfico utilizado na etapa analítica de forma a evitar a presença de efeitos residuais, o que poderia ter um grande impacto na interferência estatística de bioequivalência entre as formulações.

Nesse estudo, o intervalo proposto entre os dois períodos foi de 7 dias (168 horas), intervalo superior a 7 meias vidas de eliminação do fármaco, já que a meia vida de eliminação ($t_{1/2}$) da levocetirizina é de 7 horas (Hair et al, 2006)).

O estudo foi conduzido em jejum, uma vez que a bula do medicamento referência (Zyxem®) define que a administração pode ser realizada em tal condição, bem como de acordo com a Lista 1 – Forma de Administração – ANVISA.

O estudo foi conduzido com 35 voluntários, porém, observou-se que seria possível a realização desse estudo com um número menor de voluntários, pois o coeficiente de variação intra-individual encontrado nos parâmetros farmacocinéticos avaliados foi de, aproximadamente, 13% para C_{max} . Assim, foi realizada uma simulação estatística com 24 voluntários (Tabelas 31 e 32) e observou-se que não houve diferença significativa nos resultados quando comparados com os dados do desenho original do estudo. (Tabela 33)

O cronograma de coleta de amostras foi definido baseado na meia vida de eliminação e no tempo necessário para atingir a concentração máxima (t_{max}). A meia vida de eliminação relatada nesse trabalho para a levocetirizina foi de aproximadamente 8 horas e o t_{max} foi de 0,83 horas (Morita et al, 2007).

O conhecimento prévio de dados farmacocinéticos, como $T_{máx}$ e $t_{1/2}$, são requisitos extremamente importantes para condução de estudos de bioequivalência, uma vez que esses irão definir o formato da curva de concentração plasmática versus tempo e a determinação precisa dos valores de C_{max} e ASC_{0-t} . A RE nº1170, de 19 de Abril de 2006 recomenda que os tempos de coleta sejam conduzidos durante três a cinco meias vidas de eliminação do fármaco para compreender as etapas de absorção e eliminação do fármaco do organismo e desta forma permitir a adequada estimativa do C_{max} e da constante de eliminação, parâmetro esse fundamental para o cálculo de ASC_{0-inf} .

O cronograma de coletas utilizado nesse estudo foi até 48 horas, porém, com a simulação estatística com cronograma de coleta de amostras até 24 horas observou-se que seria possível a realização do estudo com um menor número de coletas.

Com isso, a simulação estatística demonstrou que haveria redução no número de indivíduos, o que seria um grande benefício tanto no aspecto ético quanto no econômico.

De acordo com os exames laboratoriais pré e pós estudo, os voluntários participantes deste estudo não apresentaram nenhuma alteração significativa em seu hematócrito devido às coletas sanguíneas.

Os dados farmacocinéticos resultantes do presente estudo corroboram com os dados publicados por Hair et al. (Tabela 30)

O desenvolvimento e validação de uma metodologia bioanalítica para quantificação de fármacos em matrizes biológicas é uma ferramenta de grande importância para o controle de qualidade dos medicamentos, É um fator

determinante na geração de dados reprodutíveis e confiáveis após execução de estudos farmacocinéticos.

Para o desenvolvimento do método analítico de quantificação de levocetirizina em plasma realizou-se uma pesquisa bibliográfica dos métodos já existentes e estes foram apresentados na introdução.

O desenvolvimento da metodologia analítica apresentada nesse trabalho iniciou-se com a escolha do padrão interno, que é um fármaco utilizado para auxiliar na quantificação do analito e utilizado para monitoramento do processo de extração da amostra. A fexofenadina foi o fármaco escolhido como padrão interno pois suas características químicas são semelhantes às da levocetirizina (grupos químicos em comum: amina, ácido carboxílico e anéis aromáticos).

A fase móvel utilizada contém acetonitrila pois esta apresentou um ruído menor nos canais utilizados para monitorar o fármaco e o padrão interno quando comparada ao metanol. Adicionou-se ácido fórmico na fase móvel para auxiliar no processo de ionização das moléculas.

A coluna cromatográfica utilizada foi a Polaris C18 3 μ m (50,0 x 2,0mm) por apresentar uma boa separação dos compostos de interesse dos interferentes da matriz.

O limite de quantificação foi de 0,5 ng/mL, um limite de quantificação baixo, porém já reportado por Jager et al (2002). Em contrapartida, o tempo de retenção da levocetirizina foi de 0,91 minutos e de seu padrão interno (fexofenadina) de 0,86 minutos, menor tempo de retenção já relatado na literatura (Anexo 6). Esse fato é desejável em bioequivalência uma vez que o número de amostras biológicas geradas em cada estudo é grande, por isso, um método que seja sensível e rápido é de grande utilidade.

Na maior parte dos artigos citados na introdução (Kowalski et al, 2007; Ming et al, 2006; Jager et al, 2002) o processo de extração utilizado na amostra foi precipitação. A extração utilizada no presente trabalho foi do tipo líquido-líquido, que mostrou-se mais adequada por diminuir consideravelmente as interferências nos tempos de retenção do analito e do padrão interno além de ser um processo de extração rápido.

O método analítico foi devidamente validado por meio da análise dos parâmetros de seletividade/especificidade, sensibilidade, linearidade, precisão, exatidão, recuperação média e estudos de estabilidade, considerando para isso a normativa RE nº 899/03 da ANVISA. O método mostrou-se preciso e exato, intra e inter corridas analíticas, sendo a variação inferior a 15 % para todos os valores obtidos.

A faixa de linearidade validada (0,5 – 500,0 ng/mL) abrangeu todas as concentrações obtidas nas amostras do estudo e todos os coeficientes de correlação linear (r) foram superiores a 0,98, atendendo a RE nº1170/03 da ANVISA.

Os resultados de estabilidade obtidos (coeficiente de variação inferiores a 15 %) confirmaram a estabilidade do fármaco e do padrão interno em todas as condições experimentais do estudo e condições de armazenagem empregados.

Deste modo, o método desenvolvido e validado foi empregado com sucesso na determinação de levocetirizina em amostras biológicas após a administração do fármaco em dose única, já que se apresentou preciso, exato e sensível, contemplado os requisitos da RE no 899/2003 da ANVISA.

Os dados de concentração versus tempo dos 35 voluntários foram empregados na análise estatística, a qual foi conduzida de acordo com a RE no 898/03 da ANVISA. O IC90% dos parâmetros farmacocinéticos avaliados (C_{max} , ASC_{0-t} , ASC_{0-inf}) apresentaram-se dentro do intervalo de 0,80 a 1,25 proposto pela ANVISA.

6- CONCLUSÃO

- O método analítico desenvolvido e validado para a quantificação de levocetirizina em plasma mostrou-se seletivo, sensível, rápido e preciso.
- As duas formulações de levocetirizina 5 mg avaliadas apresentaram-se bioequivalentes já que, o IC 90% para as razões de C_{max} , ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} contemplaram o intervalo de 80-125% proposto pela ANVISA.
- A simulação estatística demonstrou que esse estudo poderia ter sido conduzido com um número menor de voluntários e com um cronograma de coleta de amostras menos extenso, evitando assim a exposição desnecessária de um grande número de voluntários à medicação.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aiache JM, Roca R, Bastide J, et al. Biopharmaceutical Study of new oral dosage forms of indomethacin. *J Pharm Belg*, 1983; 38(1):5-21.

Ansel HC, Popovich NG, Allen Junior LV. *Farmacotécnica, Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*. São Paulo: Premier, 2000.

Arancibia A. Calidad Biofarmacéutica, Estudios “in vitro” e “in vivo”. *Acta Farm Bonaerense*, 1991; 10(2):123-133.

Benedetti MS, Plisnier M, Kaise J, Maier L, Baltes E, Arendt C, McCracken N. Absorption, distribution, metabolism and excretion of [14C]levocetirizina, the R enantiômero of cetirizina, in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol*. 2001; 57:571-582.

Bennett LZ. Understanding Bioequivalence Testing, *Transplantation Proceedings*. 1999; 31(3A):7S-9S.

Brasil, Resolução nº899, de 29 de Maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 de Junho de 2003*.

Brasil, Resolução da diretoria colegida da ANVISA (RDC) nº135, de 29 de Maio de 2003. Estabelece regulamento técnico para medicamento genérico. *Diário oficial da República Federativa do Brasil, Poder executivo, Brasília, DF, 02 de Junho de 2003*.

Brasil, Resolução nº1170, de 19 de Abril de 2006. Determina a publicação do Guia para Provas de Biodisponibilidade Relativa/ Bioequivalência de Medicamentos. *Diário oficial da República Federativa do Brasil, Poder executivo, Brasília, DF, 24 de Abril de 2006*.

Brasil, Resolução nº898, de 29 de Maio de 2003. Determina a publicação do Guia para planejamento e realização da etapa estatística de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. *Diário oficial da República Federativa do Brasil, Poder executivo, Brasília, DF, 02 de Junho de 2003*.

Food and Drug Administration, In vivo bioequivalence guidances; Pharmacopeial. 1993; 19:6501-6508.

Food and Drug Administration, Bioavailability and bioequivalence requirements; abbreviated applications; proposed revisions-FDA, Proposed rule, Fed. Regist., 1998; 63:64222-64228.

Gibaldi M. Biopharmaceuticals and Clinical Pharmacokinetics. 4^a Edition, Philadelphia: Lea & Febiger; 1991, p. 406.

Gilman AG, Hardman JG, Limbird LE. Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica. 11^a Edição, Rio de Janeiro: Mc Graw Hill; 2007, p.563-582.

Hair IP, Scott LJ. Levocetirizine: A review of its use in the management of allergic rhinitis and skin allergies. Drugs. 2006; 66(7): 973-996.

Hang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Farmacologia. 5^a Edição, Rio de Janeiro: Ed, Elsevier; 2003, p.251-263.

Horvitz RA. More on bioavailability and generics. Drug Ther. 1975; 5(9):125-130.

Jackson AJ. Generics and bioequivalence. Rockville: CRC, 1994, p.203.

Kaupila T. Atmospheric Pressure Photoionization - Mass Spectrometry [Academic Dissertation]. Helsinki (Finland); University of Helsinki; 2004a.

Kowalski P, Plenis A. Comparison of HPLC and CE methods for the determination of cetirizina dihydrochloride in human plasma samples. Biomed. Chromatogr. 2007; 21(9): 903-911.

Lloyd DK. Instrumentation: Detectors and Integrators in High Performance Liquid Chromatography, Fundamental Principles and Practice. Glasgow: Blackie Academic & Professional; 1995, p.114-142.

Lough WJ, Wainer IW. High Performance Liquid Chromatography, Fundamental Principles and Practice. Glasgow: Blackie Academic & Professional; 1995, p.1-276.

Meltzler CM. Bioavailability – A problem in equivalence. *Biometrics*, 1974; 30(2): 309-17.

Ming M, Fang F, Yulan S, Shuangjin C, Han L. Development and evaluation of an efficient HPLC/MS/MS method for the simultaneous determination of pseudoephedrine and cetirizina in human plasma: Application to Phase-I pharmacokinetic study. *J. Chromatogr. B*, 2007; 846: 105-111.

Morita MR, Berton D, Boldin R, Barros FAP, Meurer EC, Amarante AR, Campos DR, Calafatti AS, Pereira R, Abib Jr E, Pedrazzoli Jr, J. Determination of levocetirizine in human plasma by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry: Application to a bioequivalence study. *J. Chromatogr. B*, 2007; 862: 132-139.

Smith, MC. The pharmacist and generic drugs – a study of ampicillin. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci.*, 1972. Ed., New York, v. NS 12, n. 10, p. 511-515.

Soares A. Biodisponibilidade comparativa de três formulações de captopril. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceara – CE, p.107, 2002.

Storpirtis S. Fundamentos científicos e conceitos utilizados em farmacocinética, biodisponibilidade e bioequivalencia de medicamentos. São Paulo: s,c,p., 1994, 7p, [Simposio: Biodisponibilidade e Bioequivalencia de Medicamentos, 1994].

Storpirtis S, Consigliere VO. Biodisponibilidade e bioequivalencia de medicamentos: aspectos fundamentais para o planejamento e execução de estudos. *Ver. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo, Sao Paulo*, v. 31, n. 2, p. 63-70, 1995.

The Merck Index. 12^o ed, Whitehouse Station: Merck Research Laboratories, Division of Merck & Co; 1996, p.6032.

Tillement JP, Testa B, Brée F. Compared pharmacological characteristics in humans of racemic cetirizine and levocetirizine, two histamine H₁-receptor antagonists. *Biochem Pharmacol.* 2003; 66:1123-1126.

Vernengo M. Elementos técnicos de una política de medicamentos genéricos. Ginebra: Organización Panamericana de la Salud; Organización Mundial de la Salud, 1993, p.47.

Zaater MF, Tahboub YR, Najib NM. RP-LC method for the determination of cetirizina in serum. *J Pharm Biomed Anal.* 2000; 22:739-744.

8- ANEXOS

ANEXO 1-Tabela de Aleatorização

ALEATORIZAÇÃO DOS MEDICAMENTOS

Estudo de biodisponibilidade relativa de duas form. de dicloridrato de levocetirizina compr. revestido de 5 mg, em voluntários sadios de ambos os sexos, sendo a form. teste produzida pela Eurofarma e a form. referência (Zyxem®) pela Farmalab

Semente SAS: 75875249

Sequência de Administrações:		
Voluntário	Fase 1	Fase 2
1	ZYXEM®	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA
2	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA	ZYXEM®
3	ZYXEM®	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA
4	ZYXEM®	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA
5	ZYXEM®	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA
6	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA	ZYXEM®
7	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA	ZYXEM®
8	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA	ZYXEM®
9	ZYXEM®	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA
10	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA	ZYXEM®
11	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA	ZYXEM®
12	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA	ZYXEM®
13	ZYXEM®	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA
14	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA	ZYXEM®
15	ZYXEM®	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA
16	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA	ZYXEM®
17	ZYXEM®	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA
18	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA	ZYXEM®
19	ZYXEM®	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA
20	ZYXEM®	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA
21	ZYXEM®	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA
22	ZYXEM®	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA
23	ZYXEM®	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA
24	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA	ZYXEM®
25	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA	ZYXEM®
26	ZYXEM®	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA
27	ZYXEM®	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA
28	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA	ZYXEM®

ALEATORIZAÇÃO DOS MEDICAMENTOS

Estudo de biodisponibilidade relativa de duas form. de dicloridrato de levocetirizina compr. revestido de 5 mg, em voluntários sadios de ambos os sexos, sendo a form. teste produzida pela Eurofarma e a form. referência (Zyxem®) pela Farmalab

Semente SAS: 75875249

Sequência de Administrações:		
Voluntário	Fase 1	Fase 2
29	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA	ZYXEM®
30	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA	ZYXEM®
31	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA	ZYXEM®
32	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA	ZYXEM®
33	ZYXEM®	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA
34	ZYXEM®	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA
35	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA	ZYXEM®
36	ZYXEM®	DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA

ANEXO 2- Exames Clínicos

<i>ANEXO - Resumo das Avaliações Clínicas</i>		
Estudo : Dicloridrato de levocetirizina comprimido revestido de 5 mg		
Protocolo : 132/06	Número de Voluntários do Estudo : 36	

Voluntário	N = Sem Anormalidades		A = Com Anormalidades		Temperatura em escala Celsius					
	História Clínica		Exame Clínico		Pressão		Frequência Cardíaca		Temperatura	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
1 - WF260885M	A	N	A	N	119/60	108/71	60	66	36,2	36,2
2 - RB020186M	A	N	N	N	129/80	104/69	64	79	35,4	35,8
3 - LS150177F	A	N	A	N	111/68	100/68	76	90	35,2	35,3
4 - IC091179F	A	N	A	N	115/68	114/74	60	66	36,2	35,6
5 - MM240963M	A	N	N	N	125/69	105/62	89	75	36,4	35
6 - WS200567M	A	N	N	N	112/70	98/64	60	60	35,6	35,4
7 - VR220375F	A	N	A	N	111/77	102/75	88	85	36,3	35,9
8 - SC151181F	A	N	A	N	124/74	112/72	72	70	36,2	36
9 - ED160165F	A	N	N	N	133/75	107/64	65	60	36,2	36,1
10 - TO220479F	A	N	N	N	111/82	116/75	84	86	36,6	36,2
11 - CS030585M	N	N	N	N	124/79	117/72	56	68	35,6	36,5
12 - SF220863F	A	N	A	N	115/85	102/66	60	66	35,4	36,2
13 - AS160880M	A	N	N	N	128/77	123/66	60	63	35,6	35,8
14 - RS260288M	A	N	N	N	130/72	129/62	86	77	35,7	36,7
15 - CS260479M	A	N	N	N	130/85	128/68	69	70	36	36,1
16 - ZP230486F	A	N	N	N	130/85	113/69	90	77	36,2	36
17 - NG160983F	A	N	A	N	116/65	115/76	69	75	36,2	36
18 - FC310777F	A	N	A	N	117/88	135/82	73	62	35,9	36,2
19 - CS120974M	A	N	N	N	131/83	109/81	69	67	36,1	35,4
20 - ES281166F	A	N	A	N	124/84	115/81	67	80	36,4	36,5
21 - AA220874F	A	N	A	N	121/85	111/79	82	78	36,8	36
22 - RS300785M1	A	N	N	N	135/73	122/74	87	71	36,2	35,8
23 - MD280168F	N	N	N	N	124/89	119/83	78	81	35,9	35,1
24 - RT090784M1	A	N	N	N	136/79	114/75	76	79	36,1	36,3
25 - CS030180M	A	N	N	N	134/72	127/71	75	83	36,2	36,6
26 - GP180778F	A	N	N	N	110/77	105/73	63	68	36,1	35,8
27 - GS240488M	A	N	N	N	134/72	117/68	83	68	36,2	35,3
28 - AC171274M	A	N	A	N	134/71	137/81	69	60	35,1	35,8
29 - CM220571F	A	N	A	N	120/80	106/73	90	65	35,8	35
30 - LM180563F	A	N	A	N	120/62	112/61	90	71	36,4	36,6
31 - WL191085M	A	N	N	N	109/60	111/60	63	75	35,1	35,2
32 - ES020885M1	A	N	A	N	138/63	127/85	62	73	35,4	35,5
33 - SS020878F	A	N	A	N	124/84	118/78	79	70	36,3	36,5
34 - DP120681F	N	N	N	N	114/72	101/64	67	63	35,6	36,1
35 - SS171165M	A	N	N	N	119/72	99/64	68	64	35,4	35,6

ANEXO - Resumo das Avaliações Clínicas

Estudo : Dicloridrato de levocetirizina comprimido revestido de 5 mg

Protocolo : 132/06

Número de Voluntários do Estudo : 36



N = Sem Anormalidades A = Com Anormalidades Temperatura em escala Celsius

Voluntário	História Clínica		Exame Clínico		Pressão		Frequência Cardíaca		Temperatura	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
36 - FR150881M	A	N	N	N	120/77	121/72	79	64	36,2	35,7
Descrição das Anormalidades da História Clínica Pré-Estudo										
Vol.	Sistema	Descrição								
1	HISTÓRIA CIRÚRGICA	APENDICECTOMIA (1999)								
2	ALERGIA	POEIRA								
3	HISTÓRIA CIRÚRGICA	RET. MIOMA UTERINO (2004)								
4	HISTÓRIA FAMILIAR	HIPERTENSÃO (PAI E MÃE)								
4	HISTÓRIA CIRÚRGICA	APENDICECTOMIA (1999); HERNIORRAFIA INGUINAL (2005)								
5	ALERGIA	PICADA DE INSETOS								
5	OLHOS - OUVIDOS - NARIZ - GARGANTA	MIOPIA, ASTIGMATISMO								
5	HISTÓRIA CIRÚRGICA	FIMOSE (1993), ADENOIDE (1998)								
6	HISTÓRIA FAMILIAR	CARDIOPATA (PAI FALECIDO)								
7	HISTÓRIA FAMILIAR	PAI (DIABETES, HIPERTENSÃO), MÃE (HIPERTENSÃO)								
7	HISTÓRIA CIRÚRGICA	CESAREA (1X, 2003)								
8	ALERGIA	PICADA DE INSETO								
8	HISTÓRIA FAMILIAR	HIPERTENSÃO (MÃE)								
8	HISTÓRIA CIRÚRGICA	CESÁREA (1998)								
9	HISTÓRIA FAMILIAR	MAE (HIPERTENSÃO), FALECIDA), PAI (HAS, FALECIDO)								
9	HISTÓRIA CIRÚRGICA	PERFURAÇÃO TÍMPANO D (1994)								
10	HISTÓRIA CIRÚRGICA	AMIGDALECTOMIA (1993); CURETAGEM (1999)								
12	OLHOS - OUVIDOS - NARIZ - GARGANTA	MIOPIA								
12	HISTÓRIA CIRÚRGICA	CESÁREAS (3X,ULT. 1998); CURETAGEM (1998)								
13	HISTÓRIA FAMILIAR	PAI (INFARTO,FALECIDO)								
14	HISTÓRIA CIRÚRGICA	CIR. FRATURA BRAÇO DIR. (2005)								
15	HISTÓRIA CIRÚRGICA	FIMOSE (1995)								
16	ALERGIA	POEIRA								
16	HISTÓRIA FAMILIAR	PAI (HIPERTENSÃO)								
17	HISTÓRIA FAMILIAR	HIPERTENSÃO (MÃE)								
17	HISTÓRIA CIRÚRGICA	OOFORRECTOMIA À ESQ (2001)								
18	HISTÓRIA FAMILIAR	MÃE (HIPERTENSÃO)								
18	HISTÓRIA CIRÚRGICA	MAMOPLASTIA REDUTORA (1995); ADENOIDECTOMIA (1992); CESÁREA (2X, ULT. 2001)								
19	HISTÓRIA CIRÚRGICA	POSTECTOMIA (1993), OMBRO ESQ. (1998)								
20	GENITOURINÁRIO	G1P1A0 (NL) DUM:20/09/2008 MAC: PILULA ENDOMETRIOSE (DESDE 1994)								
20	HISTÓRIA FAMILIAR	INFARTO (MÃE FALECIDA)								
20	HISTÓRIA CIRÚRGICA	CIRURGIA PÉ DIR. (1993); LAPAROSCOPIA (1994)								
21	HISTÓRIA FAMILIAR	HIPERTENSÃO (PAI E MÃE)								
21	HISTÓRIA CIRÚRGICA	CIR. PELVICA (1992)								
21	OUTROS	NÃO POSSUI OVÁRIOS (CONGÊNITO)								
22	ALERGIA	POEIRA								
22	HISTÓRIA FAMILIAR	HIPERTENSÃO (MÃE)								

Página2

ANEXO - Resumo das Avaliações Clínicas

Estudo : Dicloridrato de levocetirizina comprimido revestido de 5 mg

Protocolo : 132/06

Número de Voluntários do Estudo : 36



Vol. 24	ALERGIA	RINITE
Vol. 24	HISTÓRIA CIRÚRGICA	AMIGDALECTOMIA (INF.)
Vol. 25	ALERGIA	DETERGENTE
Vol. 25	HISTÓRIA FAMILIAR	HIPERTENSÃO (PAI)
Vol. 25	HISTÓRIA CIRÚRGICA	POSTECTOMIA (2002); AMIGDALECTOMIA (INF); RET. CISTO PAVILHAO AUDITIVO (1999)
Vol. 26	OLHOS - OUVIDOS - NARIZ - GARGANTA	REFERE MIOPIA
Vol. 27	ALERGIA	POEIRA
Vol. 28	OLHOS - OUVIDOS - NARIZ - GARGANTA	CERATOCONEA OLHO D
Vol. 28	HISTÓRIA FAMILIAR	MAE (HAS), PAI (HAS)
Vol. 28	HISTÓRIA CIRÚRGICA	TRANSPLANTE CORNEA OLHO D (2004)
Vol. 29	HISTÓRIA CIRÚRGICA	CESÁREA (1993)
Vol. 30	OLHOS - OUVIDOS - NARIZ - GARGANTA	MIOPIA
Vol. 30	HISTÓRIA CIRÚRGICA	PERINEOPLASTIA (1992); CURETAGEM (1980); HISTERECTOMIA (1996); COLECISTECTOMIA (2001)
Vol. 31	RESPIRATÓRIO	BRONQUITE NA INFÂNCIA
Vol. 32	HISTÓRIA CIRÚRGICA	TRAUMA MÃO E (2004)
Vol. 33	HISTÓRIA CIRÚRGICA	RET. NÓDULO ABDOMINAL (1998); RET. CISTO SINOVIAL MÃO E(2000) ; CESÁREAS (1996; 2001)
Vol. 35	ALERGIA	FRUTOS DO MAR
Vol. 35	OLHOS - OUVIDOS - NARIZ - GARGANTA	MIOPIA
Vol. 35	HISTÓRIA CIRÚRGICA	RINOPLASTIA (1989), PLASTICA EM ORELHAS (1989)
Vol. 36	HISTÓRIA CIRÚRGICA	FIMOSE (1999)

Descrição das Anormalidades do Exame Clínico Pré-Estudo

	Sistema	Descrição
Vol. 1	ABDOMEN	CICATRIZ APENDICECTOMIA.
Vol. 3	ABDOMEN	CICATRIZ CIRURGICA DEVIDO RETIRADA MIOMA.
Vol. 4	ABDOMEN	CICATRIZ APENDICECTOMIA E HERNIORRAFIA.
Vol. 7	ABDOMEN	CICATRIZ CESAREA.
Vol. 8	ABDOMEN	CICATRIZ CESAREA.
Vol. 12	ABDOMEN	CICATRIZ CESAREA.
Vol. 17	ABDOMEN	CICATRIZ DE OOFORECTOMIA.
Vol. 18	ABDOMEN	CICATRIZ CESAREA.
Vol. 20	EXTREMIDADES	CICATRIZ CIRURGICA EM PÉ DIREITO.
Vol. 21	ABDOMEN	CICATRIZ DE LAPAROTOMIA
Vol. 28	OLHOS	CICATRIZ DE TRAUMA OLHO DIREITO.
Vol. 29	ABDOMEN	CICATRIZ DE CESAREA.
Vol. 30	ABDOMEN	CICATRIZ HISTERECTOMIA.
Vol. 32	EXTREMIDADES	CICATRIZ CIRURGICA EM PULSO ESQUERDO.
Vol. 33	ABDOMEN	CICATRIZ CESAREA.
Vol. 33	EXTREMIDADES	CICATRIZ CIRURGICA MÃO ESQUERDA.

ANEXO 3- Parecer do Comitê de Ética



PARECER PROJETO: Nº 063/2006.

CEP. 12/09/06.
(GRUPO III)

I – IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO DE BIODISPONIBILIDADE RELATIVA DE DUAS FORMULAÇÕES DE DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA COMPRIMIDO REVESTIDO DE 5MG, EM VOLUNTÁRIOS SADIOS, AMBOS OS SEXOS, SENDO A FORMULAÇÃO TESTE PRODUZIDA PELA EUROFARMA LABORATÓRIO LTDA E A FORMULAÇÃO REFERÊNCIA (ZYXEM) PELA FARMALAB INDÚSTRIAS QUÍMICAS E FARMACÊUTICAS LTDA.”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Dr. Eduardo Abib Júnior.

INSTITUIÇÃO: Scentryphar – Pesquisa Clínica Ltda.

CAAE: 1593.0.000.263-06

Código: STPh 132/06

II – OBJETIVOS

Avaliar a biodisponibilidade relativa da formulação teste contendo dicloridrato de Levocetirizina, em comparação com a formulação referência Zyxem após administração oral, em jejum.

III – SUMÁRIO

Trata-se de um estudo aberto, aleatorizado, cruzado, dois períodos, dois tratamentos, duas seqüências, onde os voluntários recebem, em cada período, a formulação teste ou a formulação referência. Estão envolvidos no estudo 36 voluntários sadios de ambos os sexos.

1

Rua Duque de Caxias 257 sl.21 Centro Campinas SP Fone: 19 3239-0649 Fax: 19 3235-3772
www.escolassertiva.com.br cep@escolassertiva.com.br

Depois de uma seleção, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão do protocolo, os voluntários receberão em cada um dos períodos de internação, um comprimido contendo 5mg de Cloridrato de Levocetirizina, por via oral, em dose única, com um copo de água mineral (200mL). Seguida de coletas de sangue de pelo menos 3 a 5 meias vidas. Os períodos de tratamento devem obedecer um intervalo mínimo de 7 meias-vidas. Serão coletadas 44 amostras de sangue. O volume de sangue por amostra será de 8ml, sendo no total do estudo coletado 432ml de sangue por voluntário. Cada período de internação será de 36 horas.

IV – COMENTÁRIO DOS RELATORES

O protocolo foi apresentado de forma clara e completa, esclarecidas as características do medicamento a ser estudada, a metodologia do estudo, critérios aplicados, bem como os devidos cuidados com os voluntários. A relevância do medicamento em questão é justificável para a execução de um protocolo de bioequivalência. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido encontra-se regular com a resolução 196/96.

V- PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da M. M. Assert Serviços Médicos Ltda, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos no Protocolo, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP da Instituição M. M. Assert Serviços Médicos Ltda. (Escola Assertiva).

VI – INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

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

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

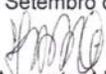
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e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

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

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

VII – DATA DA REUNIÃO

Ad-Referendum aprovado em 12 de Setembro de 2006.



Thomaz Augusto Alves Rocha e Silva
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Escola Assertiva.

ANEXO 4- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

“Estudo de biodisponibilidade relativa de duas formulações de dicloridrato de levocetirizina comprimido revestido de 5 mg, em voluntários sadios, ambos os sexos, sendo a formulação teste produzida pela Eurofarma Laboratórios Ltda e a formulação referência (Zyxem®) pela Farmalab Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda.”

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO

Este estudo tem por objetivo dosar no sangue a quantidade de dicloridrato de levocetirizina (cetirizina), para comparar os dois medicamentos (teste e referência) e verificar se eles são equivalentes.

Você receberá um comprimido revestido de cada uma das duas medicações, cada um em um período de internação diferente. A ordem que você tomará cada medicação obedecerá a um sorteio.

Este medicamento é indicado no tratamento dos sintomas associados a enfermidades alérgicas.

PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS E RESPONSABILIDADES

Antes de sua participação no estudo será avaliada a sua condição de saúde. Uma enfermeira fará seu histórico clínico (se você teve ou tem alguma doença e se você faz uso de algum medicamento, etc), medirá o seu pulso, sua temperatura, sua pressão arterial. Também será feito um exame do coração (eletrocardiograma). Um médico lhe fará um exame físico. Durante a visita serão coletadas amostras de sangue, urina e fezes para exames laboratoriais. Os exames laboratoriais incluem exame de sangue completo como hemograma completo, bioquímica sangüínea (glicose no sangue, proteínas totais, albumina, bilirrubina total, fosfatase alcalina, transaminases oxalacética e pirúvica, gamaglutamil transferase, creatinina, uréia, ácido úrico, colesterol e triglicerídeos); exame sumário de urina (Urina I). Exames para a hepatite B e C e para AIDS (HIV1 e HIV2), no sangue, e exame de fezes (protoparasitológico), serão feitos somente no pré-estudo. O teste de gravidez (β HCG) será feito no pré-estudo, podendo ser repetido na noite das internações. Durante o estudo, você será internado duas vezes, por aproximadamente 36 horas em cada período de internação, com intervalo mínimo de 07 dias.

Em cada período de internação:

- a) Você deverá permanecer em jejum por pelo menos 10 horas antes da medicação;
- b) Será retirada uma amostra de sangue de 20 mL antes da administração da medicação;
- c) Será administrado um comprimido de dicloridrato de levocetirizina (5 mg) com 200 mL de água sem gás;
- d) Serão coletadas 22 amostras de sangue de 8 mL cada, através de cateter (pequena cânula) introduzido em veia superficial do antebraço, em tempos pré-determinados para o estudo, para posterior dosagem do medicamento;
- e) Em intervalos regulares, será verificada sua pressão, pulso e temperatura,

Serão também servidas refeições padronizadas e bebidas em horários preestabelecidos,

Após a coleta de 24:00 horas você receberá alta do hospital, devendo retornar à Scentryphar para as coletas de sangue correspondentes aos tempos de 36:00 e 48:00 horas após a administração do medicamento.

Um total de 432 mL de sangue serão colhidos durante todo o estudo. A duração total de sua participação na pesquisa está estimada em até 30 dias, a contar da última coleta de amostra do período 02.

RESPONSABILIDADES DO VOLUNTÁRIO

É condição indispensável, para participação no ensaio clínico, que você esteja em boas condições de saúde e, portanto, não esteja no momento sob tratamento médico ou fazendo uso de quaisquer drogas ou medicações. Algumas regras deverão ser seguidas para sua participação no estudo: a) não pode ser dependente de drogas ou álcool e caso o investigador tenha alguma suspeita, poderá solicitar exame de urina para detecção do uso de drogas ou um teste para detecção de uso de álcool - bafômetro; b) não pode ter doado sangue ou plasma dentro dos três meses que antecedem o estudo ou ter doado 1500 mL (um litro e meio) no período de um ano antecedendo ao estudo; c) não pode tomar bebidas contendo toranja (pomelo/grapefruit) cafeína e xantinas (café, chá, coca-cola, etc) nas 48 horas que antecedem as internações até a última coleta; d) atividade física excessiva deverá ser evitada.

É ainda de sua responsabilidade em relação a sua participação no ensaio clínico: a) comparecer às internações na data e horários informados; b) contatar o investigador clínico (Dr, Eduardo Abib Junior ou Dr, Moises L, Pirasol Vanuci) e/ou a coordenadora clínica (enfermeira Silvana) em caso de eventos adversos, dúvidas ou necessidade e antes de tomar qualquer decisão por conta própria; c) retornar à Scentryphar nas datas e horários combinados; d) tomar toda a medicação prevista; e) ingerir toda a alimentação e líquidos que tenham sido previstos; f) retornar à unidade na data e horário combinados para a realização da consulta e exames de alta, independentemente de haver sido interrompida sua participação no estudo ou de sua desistência.

Aos voluntários do sexo feminino é condição indispensável para participação no ensaio clínico que não estejam grávidas, isso será comprovado através de exame (β HCG - para detecção de gravidez). Sua participação não será permitida caso você engravide após a realização dos exames clínico-laboratoriais, se você estiver amamentando ou se estiver pretendendo engravidar durante o prazo de duração do estudo. Caso, mesmo tendo considerado estas precauções, vier a suspeitar que engravidou durante a participação no estudo, deverá comunicar imediatamente o fato à equipe e deverá interromper sua participação sem prejuízo dos seus direitos.

RESPONSABILIDADES DA SCENTRYPHAR

É DE RESPONSABILIDADE DO INVESTIGADOR GARANTIR QUE OS VOLUNTÁRIOS ENVOLVIDOS RECEBAM UM TRATAMENTO DEFINITIVO PARA QUALQUER EVENTO ADVERSO, SE NECESSÁRIO, OS EVENTOS DEVERÃO SER SEGUIDOS CLINICAMENTE E POR ANÁLISES LABORATORIAIS (QUANDO INDICADOS) ATÉ QUE OS PARÂMETROS VOLTEM AO NORMAL. ESTAS ATIVIDADES PODEM PERMANECER MESMO APÓS O ESTUDO TER SIDO FINALIZADO.

A EQUIPE DA UNIDADE CLÍNICA DEVERÁ MONITORAR A SEGURANÇA DOS VOLUNTÁRIOS DESDE A OCORRÊNCIA DE UM EVENTO ADVERSO ATÉ A RECUPERAÇÃO SATISFATÓRIA, EM CASOS DE EMERGÊNCIA. A UNIDADE TEM LOCAL PRÓPRIO, EQUIPADO COM DESFIBRILADOR, MONITOR, OXÍMETRO, RESPIRADOR, MATERIAL PARA PEQUENA CIRURGIA E COM MEDICAÇÃO DE URGÊNCIA PARA QUALQUER EVENTUALIDADE, ALÉM DISSO, CONTA EM ANEXO COM UMA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA (UTI).

POSSÍVEIS RISCOS E DESCONFORTOS

A ADMINISTRAÇÃO ORAL DE DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA PODE CAUSAR REAÇÕES ADVERSAS COMO SECURA DA BOCA, DOR DE CABEÇA, FADIGA, SONOLÊNCIA, TONTURA, DISTÚRBIOS DIGESTIVOS E DOR ABDOMINAL, EM CASOS RAROS, FORAM OBSERVADOS REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE.

ENTRETANTO O APARECIMENTO DE EFEITOS INDESEJÁVEIS APÓS ADMINISTRAÇÃO DE DOSE ÚNICA DE DICLORIDRATO DE LEVOCETIRIZINA TEM MENOR PROBABILIDADE DE APARECER, ALÉM DOS EFEITOS CITADOS, A ADMINISTRAÇÃO DE QUALQUER MEDICAMENTO PODE CAUSAR REAÇÕES IMPREVISÍVEIS.

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

BENEFÍCIOS OU COMPENSAÇÕES

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

INTERCORRÊNCIAS (efeitos indesejáveis)

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

Durante o período de 180 dias a partir da data da assinatura deste termo, o voluntário estará assegurado (Seguro de Vida em Grupo) pela empresa Jade Corretora de Seguros Ltda.

RESSARCIMENTO

De acordo com valores previamente estabelecidos (R\$ 480,00), os voluntários serão ressarcidos das despesas e do tempo despendido na realização do estudo clínico após a consulta de alta. Caso desista, ou seja, dispensado antes do estudo ser finalizado, o voluntário receberá proporcionalmente ao tempo despendido, no final do estudo. A desistência ou dispensa antes do comparecimento para a primeira internação não dá direito a ressarcimento.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

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

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

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

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

DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES QUANTO A PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

OS REGISTROS QUE POSSAM IDENTIFICAR SUA IDENTIDADE SERÃO MANTIDOS EM SIGILO, A SCENTRYPHAR NÃO IDENTIFICARÁ O VOLUNTÁRIO POR OCASIÃO DA PUBLICAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS.

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

CONTATOS E PERGUNTAS

Caso surja alguma intercorrência, você deverá procurar a Scentryphar (Fone 3232-6335) e pedir que façam contato com os médicos responsáveis pelo ensaio clínico ou então entrar em contato diretamente com os médicos nos telefones indicados no final deste *Termo de Consentimento*.

Poderá contatar o Dr. Eduardo Abib Júnior para receber informações adicionais relacionadas à pesquisa ou aos seus direitos como voluntário, ou contatar a secretária do Comitê de Ética da escola Assertiva fone 3239-0649 para apresentar recursos ou reclamações em relação ao ensaio clínico.

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

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

Eu, _____, _____ anos, RG _____, declaro que li cuidadosamente todo este documento, denominado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e que tive oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo e também sobre o Estudo, Recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas e reafirmo estar livre e espontaneamente decidindo participar do Estudo, sob responsabilidade dos médicos / Pesquisadores Eduardo Abib Júnior e Moisés L P Vanunci e coordenação das enfermeiras Silvana Fidelis de Souza e Elaine Cristina Virgílio da Scentryphar Pesquisa Clínica Ltda.

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

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

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

X		X
Nome do Voluntário	Data	Assinatura
<hr/>		
Responsável pela obtenção do termo de consentimento	Data	Assinatura
<hr/>		
Testemunha (Necessário somente se o voluntário não souber ler)	Data	Assinatura

CONTATOS:

Dr, Eduardo Abib Júnior
(19) 3253 6164; (19) 9792 2913

Dr, Moisés Luis Pirasol Vanuncci
(19) 3254-9229; (19) 9165 2367

ANEXO 5- Tabela de Concentrações Plasmáticas Individual

Vol T (h)	1		2		3		4		5		6	
	R	T	R	T	R	T	R	T	R	T	R	T
00.00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
00.25	7,200	0,000	80,500	5,100	1,700	0,000	1,200	4,400	56,100	0,700	8,800	3,000
00.50	141,300	7,000	389,200	272,900	20,900	9,600	53,900	181,300	167,800	88,000	26,000	27,200
00.66	195,100	9,300	305,000	277,800	90,800	17,200	82,500	222,200	139,800	139,500	81,300	47,400
00.83	173,900	44,500	262,900	310,400	95,200	24,200	127,600	218,300	157,500	166,600	154,400	70,200
01.00	170,500	142,600	231,400	230,300	179,700	30,800	142,900	207,700	121,300	148,100	176,900	136,600
01.16	169,700	180,500	260,800	209,300	137,200	27,000	236,200	183,000	111,500	142,800	148,100	182,100
01.33	172,100	176,900	203,200	231,500	124,000	29,100	253,700	183,000	117,100	120,400	202,200	126,600
01.50	135,800	158,800	181,200	205,500	167,800	24,900	202,400	164,300	109,400	126,400	132,100	172,800
01.75	170,700	157,500	169,500	244,600	149,000	40,400	178,500	151,700	110,600	108,500	142,400	156,000
02.00	153,100	188,000	180,700	210,500	128,700	89,300	168,300	142,900	100,100	114,000	156,800	156,800
02.50	150,900	168,100	176,900	211,300	136,100	133,100	154,600	145,900	86,600	104,500	137,500	149,400
03.00	152,600	156,000	149,300	202,800	112,400	114,600	143,800	131,200	90,400	96,900	132,000	126,400
04.00	141,900	143,900	156,800	165,000	93,900	103,200	129,500	116,100	126,500	109,600	115,500	102,700
06.00	115,500	102,200	133,700	140,200	67,200	67,600	92,400	93,200	87,100	79,500	74,700	92,800
08.00	85,600	67,300	103,000	102,600	45,700	49,000	75,200	78,900	81,600	66,000	69,800	62,500
10.00	57,900	58,700	78,900	87,600	32,800	31,200	56,500	58,200	43,600	41,100	56,800	53,300
12.00	57,700	53,200	64,000	69,800	22,700	24,800	44,900	47,200	53,300	42,700	40,900	39,300
16.00	34,000	35,400	42,700	42,000	13,300	14,200	25,700	29,300	37,300	26,600	24,500	23,400
24.00	26,000	20,100	26,000	28,200	5,500	6,900	13,900	17,100	21,200	16,700	16,000	13,900
36.00	8,300	9,500	10,500	9,700	1,700	1,600	4,300	6,200	6,700	8,700	8,000	6,200
48.00	2,700	2,900	3,900	4,300	0,500	0,800	1,600	2,300	3,500	3,200	3,200	2,500

Vol T (h)	7		9		10		11		12	
	R	T	R	T	R	T	R	T	R	T
00.00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
00.25	1,600	1,800	0,000	0,000	177,400	7,100	86,200	17,600	8,900	1,900
00.50	16,500	118,600	0,600	55,000	221,300	205,400	275,100	224,400	183,700	253,400
00.66	74,000	189,900	12,100	219,400	250,500	225,300	265,700	234,300	325,700	382,000
00.83	122,900	172,600	64,600	242,500	206,000	217,400	236,000	253,400	339,300	352,400
01.00	190,400	171,100	172,300	243,300	191,300	198,100	218,600	236,100	322,300	331,200
01.16	150,300	163,200	244,300	234,900	190,400	181,500	200,900	241,100	299,900	300,600
01.33	177,200	147,100	205,800	201,500	162,400	197,500	175,900	235,200	324,200	294,200
01.50	178,200	149,100	214,700	202,300	186,900	194,700	149,200	190,600	308,200	286,600
01.75	151,900	137,900	208,200	205,800	197,200	160,800	125,400	169,100	286,800	252,700
02.00	143,100	134,800	217,500	172,200	159,900	167,900	210,800	181,900	298,000	256,900
02.50	126,600	129,200	176,500	199,500	149,200	190,200	162,200	167,000	278,000	226,400
03.00	120,200	124,500	158,600	148,700	169,000	175,000	145,100	165,200	259,300	247,100
04.00	108,900	99,200	171,500	141,000	114,800	143,300	138,400	162,200	230,600	232,400
06.00	93,000	136,600	101,900	91,200	98,700	104,400	107,300	110,900	178,500	158,500
08.00	61,700	76,900	82,400	71,200	77,700	68,000	75,900	94,900	161,100	126,100
10.00	53,000	75,500	63,000	49,400	52,500	41,000	58,800	69,100	114,200	113,100
12.00	36,000	48,900	48,700	38,800	37,100	34,600	47,600	53,500	114,100	90,900
16.00	25,800	24,800	24,200	23,300	20,400	18,600	35,800	44,400	52,000	53,700
24.00	8,800	12,500	10,500	8,700	10,200	7,400	24,600	34,600	23,200	21,800
36.00	3,500	3,000	3,300	3,100	2,300	2,200	10,600	12,800	.	9,800
48.00	1,300	.	1,400	1,200	0,800	0,900	4,900	5,800	4,200	3,500

Vol T (h)	13		14		15		16		17		18	
	R	T	R	T	R	T	R	T	R	T	R	T
00.00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
00.25	6,600	0,000	1,400	0,000	8,800	0,000	26,600	0,500	7,300	2,000	0,000	0,000
00.50	85,000	10,900	49,900	2,100	195,400	62,000	162,300	51,300	168,500	96,100	4,400	69,600
00.66	145,000	72,700	154,100	12,500	197,900	117,600	231,900	113,400	218,000	157,400	7,000	133,100
00.83	140,700	166,400	201,000	49,300	185,400	138,900	237,600	119,300	194,200	153,800	10,800	180,100
01.00	156,400	214,900	210,000	70,000	164,600	159,100	259,700	149,300	152,400	130,700	14,700	160,700
01.16	175,100	231,700	232,600	105,700	148,700	151,700	222,900	147,600	135,600	138,500	20,500	198,500
01.33	210,400	198,800	177,400	117,300	148,000	146,600	220,500	149,800	127,100	131,000	22,400	157,100
01.50	258,100	210,200	188,700	163,500	149,200	152,800	201,700	179,800	111,300	115,300	36,000	192,200
01.75	198,300	184,700	167,000	192,800	161,200	143,600	190,200	195,800	116,800	107,500	32,400	172,200
02.00	202,300	177,700	189,000	211,500	146,000	143,300	175,500	202,500	105,700	121,600	25,900	162,600
02.50	176,000	166,100	160,200	175,100	133,500	115,900	137,000	187,800	99,100	133,800	166,000	137,400
03.00	169,600	164,100	173,600	175,600	129,300	129,100	146,200	182,100	131,900	114,900	146,900	211,100
04.00	143,700	155,700	167,100	162,500	139,400	114,000	136,600	118,400	94,100	91,500	137,000	138,300
06.00	118,900	143,400	147,900	150,100	97,100	94,600	89,500	94,700	108,200	77,500	130,900	109,700
08.00	121,600	106,700	109,700	134,500	94,400	74,000	70,300	72,400	67,300	50,000	96,700	62,300
10.00	79,400	81,900	91,100	93,200	71,500	63,400	56,600	50,000	57,100	40,000	71,400	51,300
12.00	61,600	75,200	68,000	73,800	57,300	51,500	43,300	35,900	32,800	28,500	42,500	61,500
16.00	43,000	42,100	48,600	46,500	31,900	29,800	23,500	19,700	21,800	19,300	25,400	26,400
24.00	19,100	21,200	30,700	28,900	22,700	16,700	11,200	12,900	14,000	9,000	10,000	13,000
36.00	13,700	12,800	10,300	8,700	8,300	7,400	3,400	3,100	3,100	3,200	3,200	2,700
48.00	4,200	4,700	3,400	4,100	3,900	3,900	1,200	1,200	1,200	1,400	1,000	1,000

Vol T (h)	19		20		21		22		23		24	
	R	T	R	T	R	T	R	T	R	T	R	T
00.00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
00.25	3,300	0,000	57,700	0,000	1,100	0,000	123,700	3,000	9,300	50,000	1,600	1,700
00.50	56,800	4,400	160,700	48,100	8,800	0,000	211,300	100,300	224,000	213,400	95,800	147,200
00.66	107,500	28,700	187,800	171,500	58,600	8,400	219,100	128,500	226,300	213,900	142,000	175,700
00.83	144,300	74,600	190,800	210,700	194,300	25,600	172,500	198,700	193,300	197,000	124,800	154,000
01.00	148,800	132,800	166,900	211,000	235,200	44,000	167,200	175,700	168,100	186,500	124,600	145,900
01.16	173,600	141,300	168,400	210,900	284,600	102,900	168,400	160,100	156,600	159,500	141,300	163,600
01.33	150,800	125,700	170,300	185,600	275,300	138,400	160,700	162,600	146,700	181,500	135,100	136,400
01.50	147,600	112,900	127,400	150,200	180,700	189,800	159,900	134,900	135,000	167,700	110,400	114,800
01.75	177,400	166,100	148,100	150,700	226,700	273,000	138,500	121,000	130,200	185,900	127,000	105,400
02.00	163,300	188,400	139,900	146,700	155,000	213,900	129,400	123,700	119,400	129,000	111,600	106,700
02.50	133,600	153,200	130,900	135,900	186,400	226,700	110,200	113,600	118,700	142,500	115,200	102,300
03.00	161,400	143,700	124,800	121,200	181,700	205,800	105,900	115,800	95,000	201,000	117,700	127,800
04.00	154,600	118,700	123,400	112,200	177,600	154,700	95,400	98,500	107,000	135,900	105,300	122,800
06.00	119,600	107,600	85,900	87,100	134,000	125,700	70,700	70,700	69,700	140,600	86,800	98,700
08.00	70,700	79,700	48,600	54,100	98,700	85,600	59,000	56,300	48,700	95,600	67,200	81,800
10.00	59,600	61,300	43,700	35,800	99,000	87,800	42,200	44,400	34,900	72,100	54,100	63,300
12.00	56,800	54,400	31,600	34,900	54,800	56,700	33,800	32,300	25,200	52,400	41,600	59,400
16.00	29,600	29,900	17,500	15,700	42,700	35,300	22,500	21,600	13,400	17,000	27,400	39,700
24.00	22,600	18,400	9,600	7,500	24,600	22,200	13,500	13,600	5,100	10,500	18,900	32,700
36.00	5,500	6,300	2,700	2,300	8,700	8,900	5,500	3,800	1,500	4,200	10,500	13,300
48.00	1,900	2,700	0,800	0,900	1,800	3,500	1,700	1,100	.	1,500	3,200	4,700

Vol T (h)	25		26		27		28		29		30	
	R	T	R	T	R	T	R	T	R	T	R	T
00.00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
00.25	3,300	1,000	13,600	54,300	1,000	0,000	120,500	0,000	16,700	0,700	82,900	39,200
00.50	28,300	133,800	181,300	221,100	58,400	3,900	256,800	120,500	148,200	121,000	335,500	222,500
00.66	114,300	183,100	242,600	262,900	76,200	34,500	220,300	159,900	153,800	155,700	321,000	264,800
00.83	164,700	152,900	187,200	221,200	127,000	64,100	204,500	207,100	180,100	154,200	298,800	231,100
01.00	158,200	136,800	205,600	200,900	117,500	95,900	143,400	167,700	171,800	121,600	252,800	260,800
01.16	175,800	127,900	192,700	137,700	114,600	85,900	124,800	161,600	144,300	144,900	247,900	250,600
01.33	144,400	136,100	146,800	180,300	121,700	86,200	141,900	138,700	159,100	210,600	239,800	222,400
01.50	132,200	123,100	132,600	170,400	90,900	101,400	127,300	123,000	149,700	184,000	175,700	199,600
01.75	122,200	112,300	118,900	155,900	87,000	125,200	102,200	112,500	145,600	187,400	236,000	199,700
02.00	136,100	120,300	120,700	163,200	91,200	132,400	81,100	123,700	158,400	226,300	179,600	228,800
02.50	101,200	108,000	115,300	131,700	78,600	96,500	89,900	118,300	128,300	161,100	172,300	192,000
03.00	107,500	103,300	130,100	106,300	74,300	72,600	121,600	140,400	111,900	161,200	144,400	164,000
04.00	100,300	100,100	105,000	101,100	72,300	75,200	100,700	111,600	102,800	132,000	141,300	164,500
06.00	80,200	77,900	77,700	73,900	48,400	56,800	64,100	98,700	87,300	89,200	103,200	124,100
08.00	62,900	55,700	58,500	66,300	31,700	44,900	60,300	81,700	62,900	69,200	71,800	74,800
10.00	47,800	45,600	49,300	46,400	35,300	38,400	48,900	63,000	49,400	44,700	62,300	59,600
12.00	37,500	50,400	37,600	31,300	24,200	27,800	34,300	43,700	35,100	40,400	38,000	44,400
16.00	29,200	29,100	24,700	22,900	16,200	20,500	24,100	23,200	24,200	23,300	17,400	24,400
24.00	15,300	17,500	11,300	9,300	10,500	13,300	13,700	13,800	9,400	10,000	8,700	10,300
36.00	6,200	5,600	2,100	1,900	3,900	5,900	6,000	5,200	3,600	2,100	1,400	2,600
48.00	2,700	2,700	0,900	0,800	1,600	2,300	2,400	2,700	1,600	0,900	0,600	0,700

Vol T (h)	31		32		33		34		35		36	
	R	T	R	T	R	T	R	T	R	T	R	T
00.00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
00.25	1,300	0,600	0,600	0,000	124,200	6,900	7,500	0,900	14,300	0,500	1,700	9,600
00.50	53,900	108,400	40,000	14,500	319,600	246,100	41,600		25,300	25,700	65,200	112,400
00.66	128,300	226,600	142,900	100,300	262,000	367,600	96,400	189,600	28,600	175,300	176,400	178,400
00.83	139,800	239,600	234,800	227,700	226,000	349,600	95,000	288,700	32,200	283,800	182,800	180,400
01.00	138,100	228,600	318,800	298,400	210,600	263,800	159,900	285,600	37,300	245,100	172,600	159,200
01.16	136,300	218,100	319,400	354,700	218,600	239,200	216,000	308,800	35,000	245,300	153,200	146,300
01.33	137,500	179,400	323,900	319,900	217,000	227,600	219,300	244,600	34,700	216,300	125,000	142,100
01.50	130,300	200,600	286,700	281,200	185,200	214,700	172,800	177,700	35,000	202,600	127,000	141,700
01.75	122,700	175,300	283,700	268,100	197,500	191,200	168,300	223,700	49,600	186,500	110,500	115,800
02.00	152,500	141,600	242,900	220,800	169,100	221,000	162,700	148,100	70,100	186,800	119,400	112,100
02.50	174,200	163,700	221,700	211,000	170,100	200,700	200,700	146,800	121,900	140,100	105,000	116,300
03.00	176,800	156,500	210,800	186,000	144,500	189,200	161,000	118,500	119,700	140,300	99,400	102,500
04.00	177,000	161,100	205,200	204,000	140,200	168,700	145,100	115,500	183,700	161,100	87,600	99,900
06.00	114,800	164,300	146,800	148,200	89,600	102,100	132,000	88,200	133,900	97,200	63,500	72,000
08.00	88,200	88,500	109,300	118,600	77,900	67,100	119,200	90,800	88,600	78,300	56,400	50,300
10.00	81,900	74,200	91,000	98,700	57,900	56,500	68,600	71,100	75,600	62,500	43,900	46,700
12.00	54,200	63,600	97,300	61,400	40,600	39,600	59,600	47,200	60,000	52,900	35,900	32,200
16.00	46,700	37,100	53,400	41,000	22,000	25,900	40,100	30,000	40,500	30,300	22,600	19,400
24.00	23,600	28,000	34,500	22,800	9,500	13,100	16,100	14,100	22,100	17,500	12,700	10,800
36.00	12,900	10,600	12,400	10,200	3,200	4,300	5,300	6,400	9,400	8,400	3,900	4,000
48.00	6,800	4,400	5,300	3,700	0,500	0,700	1,700	2,500	4,300	2,900	1,500	1,200



Determination of levocetirizine in human plasma by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry: Application to a bioequivalence study

M.R. Morita^{a,c,*}, D. Berton^a, R. Boldin^a, F.A.P. Barros^a, E.C. Meurer^a, A.R. Amarante^b,
D.R. Campos^c, S.A. Calafatti^a, R. Pereira^b, E. Abib Jr.^{b,c}, J. Pedrazolli Jr.^{a,c}

^a Core Clinical Research, 12914-160 Bragança Paulista, SP, Brazil

^b Scentryphar Clinical Research, Brazil

^c FCM/UNICAMP, Brazil

Received 13 June 2007; accepted 25 November 2007

Available online 4 December 2007

Abstract

We describe a liquid chromatography–tandem mass spectrometric method (LC–MS/MS) for levocetirizine quantification (I) in human plasma. Sample preparation was made using a fexofenadine (II) addition as internal standard (IS), liquid–liquid extraction using cold dichloromethane, and dissolving the final extract in acetonitrile. I and II (IS) were injected in a C18 column and the mobile phase composed of acetonitrile:water:formic acid (80.00:19.90:0.10, v/v/v) and monitored using positive electrospray source with tandem mass spectrometry analyses. The selected reaction monitoring (SRM) was set using precursor ion and product ion combinations of m/z 389 > 201 for I and m/z 502 > 467 for II. The limit of quantification and the dynamic range achieved were 0.5 ng/mL and 0.5–500.0 ng/mL. Validation results on linearity, specificity, accuracy, precision and stability, as well as its application to the analysis of plasma samples taken up to 48 h after oral administration of 5 mg of levocetirizine dichloride in healthy volunteers demonstrate its applicability to bioavailability studies.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Mass spectrometry; Bioavailability; Levocetirizine

1. Introduction

Levocetirizine (CAS—130018-77-8) (I), 2-[2-[4-[(*R*)-(4-chlorophenyl)-phenyl-methyl] piperazinyl-1-yl]ethoxy] acetic acid, the *R*-enantiomer of racemic cetirizine, is a selective, potent, H₁-antihistamine compound indicated for the treatment of allergic rhinitis and chronic idiopathic urticaria [1]. The recommended dosing of levocetirizine is 5 mg per day. It has a rapid onset, achieving maximum plasma concentration (t_{max}) in 0.9 h [2], with peak serum levels (C_{max}) of approximately 270 ng/mL [1]. In the plasma, 91% of the drug is bound to proteins and its volume of distribution (V_d) is small (0.4 L/kg). The drug undergoes minimal metabolism, which increases the bioavailability

and its half-life of elimination time is 8 h. Levocetirizine is generally well tolerated in adults, adolescents and children with allergic conditions [2].

The use of LC coupled with electrospray tandem mass spectrometry has become the first choice in bioavailability studies owing to the fast, sensitive, and reliable results generated by its use [3]. The state-of-the-art instruments use the two powerful techniques to separate interference and MS/MS to analyze with selectivity and sensitivity to give very reliable results of concentrations in biological fluids.

Other techniques have been previously used to determine cetirizine in human plasma. These methods include gas chromatography (GC) [4], high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection [5,6] and HPLC-MS/MS [7,8]. The HPLC-UV method has higher limit of quantification (10.0 ng/mL) than others. The LC-MS/MS method described by Jager et al. has a low limit of quantification (0.5 ng/mL) but, the retention time is 1.87 min. In the methods mentioned above,

* Corresponding author at: Core Clinical Research, 171, Doutor Tancredo de Almeida Neves St., 12914-160 Bragança Paulista, SP, Brazil.

E-mail address: mrmorita1@yahoo.com.br (M.R. Morita).

the extraction used to prepare the sample is protein precipitation, which could lead to high level of interferences.

This article describes LC–MS/MS method with sensitivity as good as the previous one (0.5 ng/mL), faster than articles previously reported (retention time: 0.91 min) that uses liquid–liquid extraction for levocetirizine quantification in human plasma and reports its application for bioavailability study.

2. Experimental

2.1. Materials and reagents

Levocetirizine (lot number 0281105) was obtained from Symbio Labs Limited (São Paulo, SP) and fexofenadine (lot number FEX0503020) was obtained from Ind. Swift Laboratories Limited (Rio De Janeiro, RJ). Acetonitrile, methanol (HPLC grade) and NaCl were purchased from J.T. Baker (Deventer, Netherlands). Dichloromethane and formic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Water was purified using a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). All other chemicals were of analytical grade and used without further purification.

2.2. Analyses conditions and instrumentation

Elution was performed using acetonitrile:water:formic acid (80.00:19.90:0.10, v/v/v) at the mobile phase, at a flow-rate of 0.2 mL/min, the injection volume was 5 µL and total run time was set for 2.0 min. The samples were injected into an Alliance HT 2795 (Waters, Milford, MA, USA) at room temperature, and the stationary phase was a Polaris C₁₈ (particle size, 3 µm; 50 mm × 2.0 mm, i.d.) column (Varian, Palo Alto, CA, USA). Mass spectrometric analysis was performed using a Quattro Premier XE (Waters, Milford, MA, USA) tandem mass spectrometry, equipped with an electrospray (ESI) source. The temperatures of desolvation gas and source block were 350 °C and 100 °C, respectively. The electrospray source was operated in the positive ionization mode (ESI+) at 3 kV, and selected reaction monitoring mode (SRM), *m/z* 389 > 201 and *m/z* 502 > 467 were used for quantification of levocetirizine and fexofenadine, respectively. Cone voltage, collision energy and collision gas pressure (argon) were 25.0 V, 12.0 V, and 2.75×10^{-3} mbar, respectively for levocetirizine, and 30.0 V, 20.0 V, and 2.75×10^{-3} mbar for fexofenadine, respectively.

2.3. Standards and quality control samples preparation

A stock solution of levocetirizine (100 µg/mL) was prepared in Milli-Q water. An aliquot of this solution was added to a blank plasma obtaining a final concentration of 2 µg/mL. This solution was used to spike blank plasma in order to obtain calibration standards of 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 50.0, 100.0 and 500.0 ng/mL and three levels of quality controls (QCs) fixed at 1.50, 200.00 and 400.00 ng/mL (low, medium and high). The spiked plasma was stored at –70 °C. Stock solutions of fexofenadine (internal standard) were prepared by dissolving the drug in methanol to

a final concentration of 100 µg/mL. This solution was diluted with methanol to get a final concentration of 2 µg/mL.

2.4. Sample extraction

Twenty-five microliter of internal standard solution (fexofenadine, 2 µg/mL) was added to 200 µL plasma and mixed for 1 min. Then, 50 µL of saturated NaCl and 1000 µL of cold dichloromethane were added and the contents were mixed again for 5 min. The tube was centrifuged at $16,100 \times g$, for 5 min at 4 °C and the lower organic phase (700 µL) was transferred to another tube and evaporated to dryness under an air stream at room temperature. The residue was dissolved in 200 µL of acetonitrile and mixed for 5 min. The sample was then transferred to the glass autosampler vial and 5 µL was injected into the chromatographic system.

2.5. Recovery

The efficacy of levocetirizine extraction from human plasma was measured analyzing three levels of quality control samples (QCs). The drug recovery was determined by comparing peak areas obtained from the spiked plasma samples (QCs) after extraction and reconstitution to the standard solution at the same concentration of the spiked plasma samples. The recovery of IS was also evaluated using the same procedure. The recovery of analyte and IS should be consistent, precise, reproducible and higher than 50% according to our protocol of validation.

2.6. Limit of quantification

The limit of quantification (LOQ) was defined as the lowest concentration of the analyte that could be determined with precision and accuracy under the stated experimental conditions. Biological samples spiked with levocetirizine were injected in decreasing concentrations until the lowest concentration quantified with precision and accuracy, expressed by relative standard deviation (R.S.D.) lower than 20%. The experimental LOQ obtained was 0.5 ng/mL.

2.7. Analytical curves

The analytical curves were constructed using concentration values ranging from 0.5 to 500.0 ng/mL of levocetirizine in human plasma. Linear analytical curves were obtained by weighted linear regression (weighing factor: $1/x$), the ratio of levocetirizine peak area to fexofenadine peak area was plotted versus the ratio of levocetirizine concentration to that of the internal standard, in ng/mL. The suitability of the calibration model was confirmed by back-calculating the concentrations of the calibration standards. For calibration curves, the correlation coefficient (*r*) should be higher than 0.98.

2.8. Linearity, precision and accuracy

The linearity was evaluated by analyses of three calibration curve batches. The acceptance criteria were that the coefficient

of variation (CV) and accuracy must not exceed 20% for LOQ and 15% for other standards.

Four different concentrations (0.50, 1.50, 200.00 and 400.00 ng/mL) of QC samples in five replicates were analyzed in three different batches in order to determine intra- and inter-batch precision and accuracy. The accuracy of the method was shown as relative error (RE) and calculated based on the difference between the mean calculated and nominal concentrations; whereas, precision was evaluated by calculating the within- and between-run CV. The acceptance criteria for each quality control were that the CV accuracy must not exceed 15% and 20% for the LOQ.

2.9. Freezing and thawing stabilities

Freezing and thawing stabilities for levocetirizine in plasma samples were evaluated after three cycles and the analytical process with control concentrations in four plasma batches. Samples were frozen at -70°C in three cycles of 24, 36 and 48 h. Autosampler stability was studied over a 16-h storage period in the autosampler tray with quality control concentrations. The acceptance criteria for each quality control were that the CV and accuracy must not exceed 15%.

2.10. Bioequivalence study

Thirty-five adult volunteers, aged between 18 and 50 years with an index of corporal mass between 19 and 28.5 kg/m^2 , were selected for the study after assessment of their health status by clinical evaluation (physical examination, electrocardiogram) and the following laboratory tests: albumin, alkaline phosphatase, AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase), blood glucose, creatinine, total bilirubin and total protein, triglyceride, total cholesterol, hemoglobin, hematocrit, total and differential white blood cells count, routine urinalysis and negative serology for HIV, HBV and HCV. All the subjects gave written informed consent and the Asseriva Ethics Committee approved the clinical protocol.

The study was a single-dose, two-way randomized crossover design with 7 days washout period between doses.

During each period, the volunteers were hospitalized at 7:30 p.m. and had a supper before 9:00 p.m., after an overnight fast they received (at $\sim 7:00$ a.m.) a single-dose of levocetirizine dichloridate (5 mg of either formulation). Water (200 mL) was given immediately after the drug administration and the volunteers then fasted for 4 h, after which period a standard lunch was served. After 7 h, they were served a snack. After 12 and 14 h were served meals. No other food was permitted during the "in house" period and liquid consumption was allowed *ad libitum* 2 h after levocetirizine dichloridate administration (with the exception of xanthine-containing drinks, including tea, coffee and cola). At 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24 and 36 h after the dose administration, systolic and diastolic arterial pressure (measured non-invasively with a sphygmomanometer), heart rate and temperature were recorded. The hospitalization period was 36 h. The volunteer came to the unit to supply

blood samples at 48.0 h post-dosing. The following formulations were employed: levocetirizine dichloridate (test formulation) and Zyxem[®] (standard reference formulation from Farmalab Ltda).

Blood samples (8 mL) from a suitable antecubital vein were collected by indwelling catheter into heparin-containing tubes at 0, 0.25, 0.5, 0.66, 0.83, 1.0, 1.16, 1.33, 1.5, 1.75, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 16.0, 24.0, 36.0 h and 48.0 h post-dosing. The blood samples were centrifuged at $\sim 2000 \times g$ for 10 min at 4°C and the plasma was stored at -70°C until assayed for levocetirizine content.

2.11. Pharmacokinetics and statistical analysis

Pharmacokinetic parameters were calculated from plasma levels applying a non-compartmental method using SAS 9.1.3 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Following Food and Drug Administration (F.D.A.) guideline [9], blood samples were taken from each subject ($n=35$) considering a period of 3–5 times the terminal elimination half-life ($t_{1/2}$). C_{max} and T_{max} values were determined directly from plasma levocetirizine concentration–time profiles. The area under the concentration–time curve (AUC_{0-t}) was obtained by the trapezoidal method. The total area under the curve ($\text{AUC}_{0-\infty}$) was calculated up to the last measured concentration and extrapolations were obtained using the last measured concentration and the terminal elimination rate constant (K_e). The terminal elimination rate constant, K_e , was estimated from the slope of the terminal exponential phase of the plasma of levocetirizine concentration–time curve (by means of the linear regression method). The terminal elimination half-life, $t_{1/2}$, was then calculated as $0.693/K_e$. Results were reported as mean \pm standard deviation through out the paper. Regarding AUC_{0-t} , $\text{AUC}_{0-\infty}$ and C_{max} , bioequivalence was assessed by means of an analysis of variance (ANOVA) and calculating the standard 90% confidence intervals (90% CIs) of the ratios test/reference (logarithmically transformed data). Bioequivalence was considered when the ratio of averages of log-transformed data were within 80–125% for AUC_{0-t} , $\text{AUC}_{0-\infty}$ and C_{max} .

3. Results and discussion

3.1. Method development

Mass spectrometric detection coupled with liquid chromatography has been known as the state-of-the-art technique to perform bioanalytical analysis with maximum selectivity and sensitivity. The MS tuning was carried out by direct infusion of solutions of both levocetirizine and fexofenadine (IS) into the ESI source of the mass spectrometer.

The critical parameters in the ESI-MS/MS equipment include ionization in the solution (mobile phase), flow rate, needle (ESI) voltage and polarity (charge separation), drying gases (ion evaporation model and charged residue model) [10], and ion transmission. In our case, the formation of protonated ionic levocetirizine and fexofenadine (IS) molecules was observed (Fig. 1).

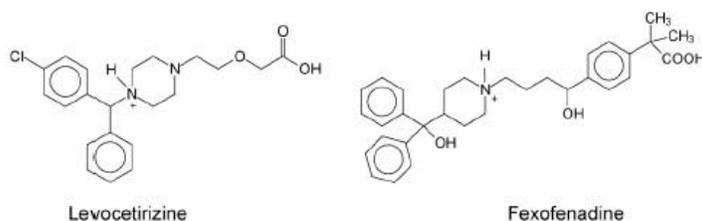


Fig. 1. Chemical structures of levocetirizine and fexofenadine (IS).

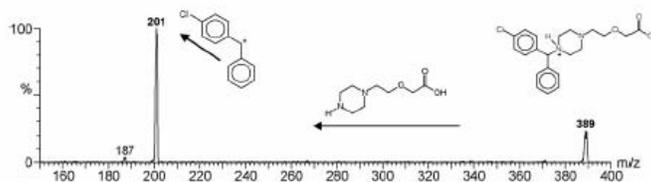


Fig. 2. CAD mass spectra of the levocetirizine protonated molecule.

A collisionally activated dissociation (CAD) product ion spectrum for levocetirizine yielded high-abundance fragment ions of m/z 201 (Fig. 2).

The proposed dissociation mechanism for the protonated levocetirizine of m/z 389, a protonated 2-piperazinyl-1-yl]ethoxy]acetic acid loss forming the product ion of m/z 201 that is a tropylium ion stabilized by resonance.

A CAD product ion spectrum for internal standard fexofenadine yielded high-abundance fragment ions of m/z 484 and m/z 467 (Fig. 3).

The proposed dissociation mechanism for the protonated fexofenadine of m/z 502, corresponds to two water losses in tandem forming more stabilized ions (resonance stabilization).

After the SRM channels were tuned, the mobile-phase was changed from an organic phase to a more aqueous phase with acid dopant to obtain a fast and selective LC method. The better signal was obtained using acetonitrile:water:formic acid

(80.00:19.90:0.10, v/v/v) that was tested using three triplicate curves with five low quality controls, five medium quality controls and five high quality controls.

3.2. Specificity

The analysis of levocetirizine and fexofenadine using a SRM function was highly selective, with no interfering compounds or significant ion suppression from endogenous substances observed at the retention times for levocetirizine and fexofenadine. The chromatographic run was executed using a short (50 mm) Polaris column, which is convenient for running a high throughput of samples. There was no chromatographic separation, owing to the high degree of similarity shared by the two structures, with the adjusted retention time being as short as 1.4 min, in order to increase the analytical capability. Chromatograms obtained from plasma spiked

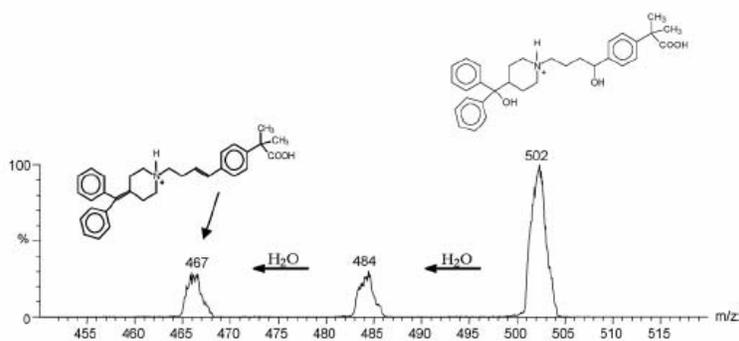


Fig. 3. CAD mass spectra of the fexofenadine protonated molecule.

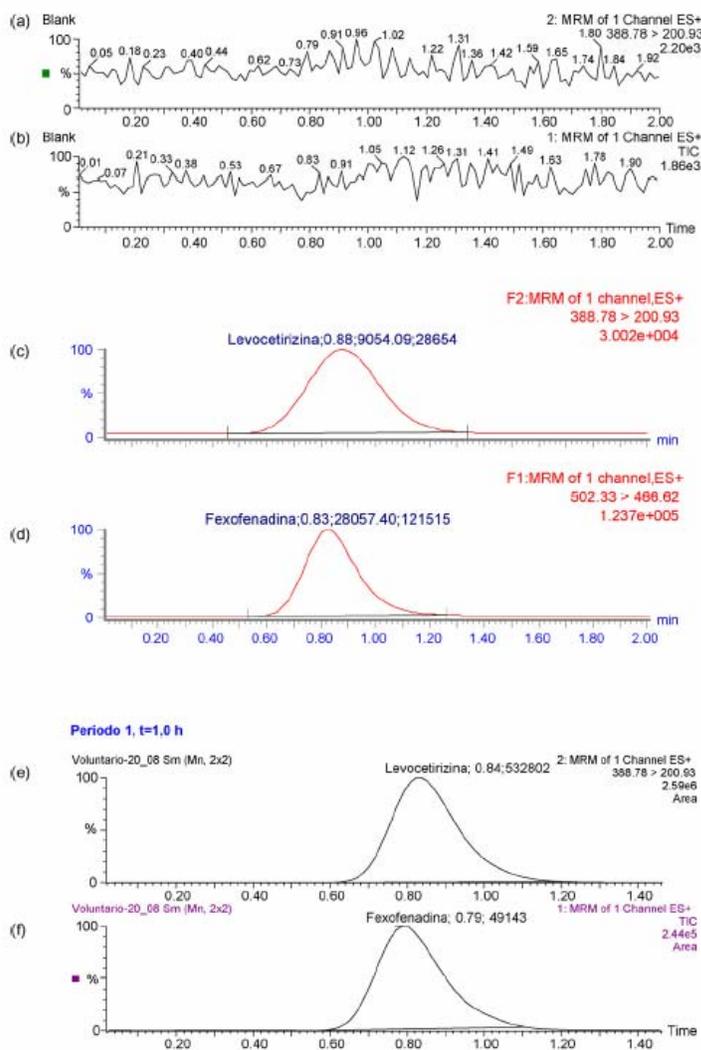


Fig. 4. Representative SRM chromatograms of levocetirizine in human plasma: (a) levocetirizine and (b) fexofenadine blank human plasma, (c) levocetirizine and (d) fexofenadine-spiked human plasma containing 0.50 ng/mL levocetirizine and internal standard, (e) levocetirizine and (f) fexofenadine from a volunteer 1 h after administration of 5 mg of levocetirizine.

with levocetirizine (0.5 ng/mL) and fexofenadine (2 µg/mL) are shown in Fig. 4c and d. Levocetirizine and fexofenadine from a volunteer 1 h after administration of 5 mg of levocetirizine are shown in Fig. 4e and f.

The matrix effect was evaluated directly by extracting blank plasma and then spiking with the analyte at the LOQ concentration. There was no difference observed between the

signal for the solution and the spiked extract at the LOQ concentration.

3.3. Linearity, precision and accuracy

Calibration curves were plotted as the peak area ratio (drug/IS) versus drug concentration. The assay was linear in the

Table 1
Calibration curves from one batch of the validation section

Spiking plasma concentration (ng/mL)	Concentration measured (mean) (ng/mL)	R.S.D. ^a (%) (n=3)	Relative error ^b
0.50	0.50	0	0
1.00	1.03	5.82	3.00
5.00	5.43	6.99	8.60
10.00	9.83	2.13	-1.70
50.00	49.13	3.46	-1.74
100.00	96.43	1.10	-3.57
500.00	487.17	0.94	-2.56

Relative error of the mean is calculated as. Typical calibration curve for levocetirizine: $y = 0.0613675x + 0.0120891$ (correlation coefficient, $r = 0.997608$), y : concentration in ng/mL, x : ratios of levocetirizine peak area to that of IS.

^a Standard deviation/mean concentration measured $\times 100$.

^b $(\text{Mean concentration measured} - \text{spiked plasma concentration}) / \text{spiked plasma concentration} \times 100$.

concentration range of 0.5–500.0 ng/mL. The R.S.D. were less than 7%. The relative error (RE) of the mean of the measured concentrations ranged from 8.60% to -3.57%. The determination coefficients (R^2) were greater than 0.997 for all curves (Table 1). Precision and accuracy for this method were controlled by calculating the intra-batch and inter-batch variation at three concentrations (1.50, 200.00 and 400.00 ng/mL) of QC samples in five replicates. As shown in Table 2, the intra-batch R.S.D.s and REs were less than 6%. These results indicate that the method is reliable and reproducible within its analytical range.

3.4. Freezing and thawing stabilities

The results of the freeze–thaw stability studies are shown in Table 3. Quantification of the analyte in plasma subjected to a number of freeze–thaw (-70°C to room temperature) cycles showed that the analyte is stable after three cycles. No analyte degradation had taken place over a 16-h storage period in the autosampler tray with the final concentrations of levocetirizine ranging from 88.89% to 104.42% of the theoretical values. In addition, the long-term stability of levocetirizine in QC samples after 68 days of storage at -70°C was also evaluated. The concentrations ranged from 97.33% to 104.25% of the theoretical values. Levocetirizine was therefore stable in human plasma for at least 68 days at -70°C .

3.5. Recovery

There were tested a variety of extractions, ethyl acetate, hexane, chloroform, otherwise the best recovery was achieved for the liquid–liquid extraction with dichloromethane. The recovery was calculated by comparing the peak area ratios of levocetirizine in plasma samples with the peak area ratios of solvent samples, was estimated at control levels of levocetirizine. The recovery of levocetirizine, determined at three different concentrations (1.50, 200.00 and 400.00 ng/mL), were 82.97%, 85.78% and 95.04%, respectively; the overall average recovery was 87.93%.

The recovery of IS was also tested using the same methodology the mean recovery of fexofenadine was 103.44%.

3.6. Application to biological samples

The proposed analytical method was applied to a bioequivalence study of two levocetirizine formulations. This randomized crossover study was conducted with 35 subjects after a single oral dose (5 mg) of the drug. Typical plasma concentration versus time profiles is shown in Fig. 4. Plasma concentrations of levocetirizine were in the standard curve range and remained above the 0.5 ng/mL (quantification limit for the entire sampling period). The observed maximum plasma concentration (C_{\max}) was 228.11 ± 60.55 ng/mL for the reference and 226.91 ± 61.76 ng/mL for the test. Time to achieve

Table 2
Precision and accuracy (analysis with spiking plasma samples at three different concentrations)

Spiking plasma concentration (ng/mL)	Within-run			Between-run		
	Concentration measured (mean \pm S.D.) (ng/mL)	R.S.D. ^a (%) (n=5)	Relative error ^b (%)	Concentration measured (mean \pm S.D.) (ng/mL)	RSD ^a (%) (n=15)	Relative error ^b (%)
1.50	1.48	2.70	-1.33	1.47	4.76	-2.00
200.00	200.66	5.66	0.33	199.27	7.14	-0.36
400.00	395.30	4.53	-1.17	391.34	3.77	-2.16

^a (Standard deviation/mean concentration measured) $\times 100$.

^b $(\text{Mean concentration measured} - \text{spiked plasma concentration}) / \text{spiked plasma concentration} \times 100$.

Table 3
Freeze and thaw stabilities of the samples

Sample concentration (ng/mL)	Initial (0h)		Cycle 1 (24 h)		Cycle 2 (36h)		Cycle 3 (48h)	
	Concentration measured (mean ± S.D.) (ng/mL)	R.S.D. ^a (%) (n = 5)	Concentration measured (mean ± S.D.) (ng/mL)	R.S.D. ^a (%) (n = 5)	Concentration measured (mean ± S.D.) (ng/mL)	R.S.D. ^a (%) (n = 5)	Concentration measured (mean ± S.D.) (ng/mL)	R.S.D. ^a (%) (n = 5)
150	1.46 ± 0.05	3.42	1.44 ± 0.13	9.02	1.60 ± 0.17	10.62	1.58 ± 0.11	6.96
200.00	208.50 ± 6.93	3.32	218.16 ± 7.37	3.37	217.54 ± 7.79	3.58	222.06 ± 4.16	1.87
400.00	412.66 ± 19.15	4.64	423.52 ± 9.89	2.33	428.18 ± 17.73	4.14	422.64 ± 40.67	9.61

^a (Standard deviation/mean concentration measured) × 100.

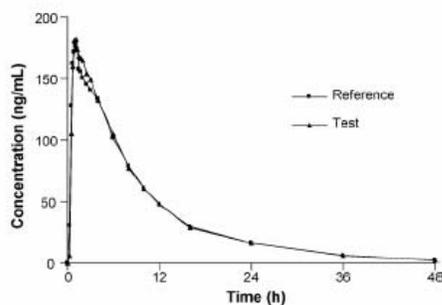


Fig. 5. Plasma concentration–time curves of levocetirizine test and reference formulations administrated to 35 volunteers.

maximum plasma concentration (T_{max}) was 0.83 ± 3.50 h for the reference and 0.83 ± 2.34 h for the test. The value of area under the curve from time 0 to the last sampling time (AUC_{0-t}) was 1743.71 ± 492.24 ng h/mL for the reference and 1752.91 ± 447.02 ng h/mL for the test, and area under the curve from 0 to ∞ ($AUC_{0-\infty}$) was 1775.40 ± 507.29 ng h/mL for the reference and 1785.85 ± 461.27 ng h/mL for the test.

The elimination half-life ($t_{1/2}$) was 8.07 ± 5.86 h for the reference and 8.99 ± 4.67 h for the test. The pharmacokinetic data obtained were similar to those reported by Passalacqua and Canonica [2]. In addition, the mean ratio of $AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$ was higher than 80% in accordance with the Food and Drug Administration Bioequivalence Guideline [11].

The ratio of test/reference (T/R) and 90% percent confidence intervals (90 CIs) for overall analysis were comprised within the previously stipulated range (80–125%).

The ratio T/R and 90 CIs (in parenthesis) was 99.43% (94.29–104.86%) for C_{max} , 101.11% (97.42–104.93%) for AUC_{0-t} and 101.17% (97.49–104.99%) for $AUC_{0-\infty}$. Therefore, the results demonstrated the bioequivalence of the two formulations of levocetirizine (Fig. 5).

4. Conclusion

In conclusion, the use of LC–MS/MS allows an accurate, precise and reliable measurement of levocetirizine concentrations in human plasma for up to 48 h after a single oral dose of 5 mg to healthy volunteers. The described method has proven to be fast and robust, with each sample requiring less than 3 min analysis time. The sensitivity of the assay is sufficient to follow accurately the pharmacokinetics of this drug.

References

- [1] P.I. Hair, L.J. Scott, *Drugs* 66 (2006) 973.
- [2] G. Passalacqua, G.W. Canonica, *Clin. Ther.* 27 (2005) 979.
- [3] L.C. Silva, L.S. Oliveira, G.D. Mendes, G. Garcia, A.S. Pereira, G. De Nucci, *J. Chromatogr. B* 832 (2006) 302.
- [4] E. Baltés, R. Coupez, L. Brouwers, J. Gobert, *J. Chromatogr.* 430 (1988) 149.
- [5] M.F. Zaater, Y.R. Tahboub, N.M. Najib, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 22 (2000) 739.