

*Andréia Maria Lopes Guermani Orives*

**DETERMINAÇÃO DE AMLODIPINA ATRAVÉS DA  
TÉCNICA LC-MS-MS EM ESTUDO DE  
BIOEQUIVALÊNCIA**

*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 – Andréia Maria Lopes Guermani Orives.*

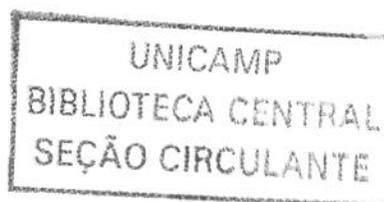
*Campinas, 18 de agosto de 2004.*

*Prof. Dr. Ronilson Agnaldo Moreno  
- Orientador -*

**CAMPINAS**

**2004**

- i -



**ANDRÉIA MARIA LOPES GUERMANI ORIVES**

**DETERMINAÇÃO DE AMLODIPINA ATRAVÉS DA TÉCNICA  
LC-MS-MS EM ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA**

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

**ORIENTADOR: PROF. DR. RONILSON AGNALDO MORENO**

|            |                                     |
|------------|-------------------------------------|
| UNIDADE    | BC                                  |
| Nº CHAMADA | UNICAMP                             |
| V          | EX                                  |
| TOMBO BC/  | 61682                               |
| PROC.      | 16-86-05                            |
| C          | <input type="checkbox"/>            |
| D          | <input checked="" type="checkbox"/> |
| PREÇO      | 11,00                               |
| DATA       | 03-1-05                             |
| Nº CPD     |                                     |

(Or 16d)

BiBID. 338471

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

Or 4d  
16

Orives, Andréia Maria Lopes Gurmani

Determinação de amlodipina através da técnica LC-MS-MS em estudo de bioequivalência / Andréia Maria Lopes Guermani Orives. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientadores : Ronilson Agnaldo Moreno

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

1. Biodisponibilidade de medicamentos. 2. Farmacocinética. 3. Espectrometria de massa. I. Ronilson Agnaldo Moreno. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



---

## **Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado**

---

**Orientador:**

---

**Prof. Dr. Ronilson Agnaldo Moreno**

---

**Membros:**

---

**Prof. Dr. Ronilson Agnaldo Moreno**

---

**Prof. Dr. Marcos Dias Fontana**

---

**Prof. Dr. José Luiz Donato**

---

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

---

**Data: 18/08/2004**

---

*O que for a profundezza do teu ser,  
assim será tu desejo.*

*O que for o teu desejo, assim será tua vontade.*

*O que for a tua vontade, assim serão  
teus atos.*

*O que forem teus atos, assim será teu  
Destino.*

*Brihadaranyaka Upanishad*

## ***SUMÁRIO***

|   | <i>PAG.</i> |
|---|-------------|
| <b>RESUMO</b>   | <i>xii</i>  |
| <b>ABSTRACT</b>   | <i>xiii</i> |
| <b>INTRODUÇÃO</b>   | 13          |
| Medicamentos Genéricos: Histórico                             | 14          |
| Testes de Bioequivalência e sua Importância para os Genéricos | 16          |
| Métodos Analíticos Aplicados a Testes de Bioequivalência      | 17          |
| Fármacos Antagonistas do Cálcio                               | 27          |
| <b>OBJETIVOS</b>  | 37          |
| <b>CASUÍSTICA</b>   | 38          |
| <b>MÉTODOLOGIA</b>  | 39          |
| Protocolo Clínico   | 39          |
| Aspectos Éticos   | 47          |
| Etapa Analítica e Estatística                                 | 48          |
| Materiais   | 51          |
| Preparo de Soluções   | 54          |
| <b>RESULTADOS</b>   | 59          |
| <b>DISCUSSÃO</b>  | 69          |
| <b>CONCLUSÃO</b>  | 71          |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                             | 72          |
| <b>ANEXOS</b>   | 78          |

## ***LISTA DE ABREVIATURAS***

|             |  |
|-------------|--|
| $\mu$       | Micra  |
| $\gamma$ GT | Gama Glutamil Transferase  |
| $\mu$ L     | Microlitro   |
| AUC 0-144   | Área Sob a Curva da Concentração Plasmática em relação ao Tempo desde a administração do fármaco até a última coleta sanguínea |
| AUC 0-inf   | Área Sob a Curva da Concentração Plasmática em relação ao Tempo tendendo ao infinito   |
| AUC last    | Área Sob a Curva da Concentração Plasmática final  |
| A-V         | Átrio - Ventricular  |
| C max       | Concentração Plasmática Máxima   |
| CID         | DIC - Dissociação Induzida por Colisão   |
| cm          | Centímetro   |
| CV          | Coefficiente de Variância  |
| Da          | Dalton   |
| DC          | Direct Current   |
| DP          | Desvio Padrão  |
| ECG         | Eletrocardiograma  |
| FDA         | Food and Drug Administration   |
| g           | Gramma   |
| h           | Hora   |
| HAS         | Hipertensão Arterial Sistólica   |

|          |  |
|----------|--|
| HCG      | Human Corionic Gonadotrophine  |
| HPLC     | High Performance Liquid Chromatography                                       |
| IC       | Intervalo de Confiança   |
| Kg       | Quilograma   |
| kV       | Quilovolts   |
| L        | Litro  |
| L/Kg     | Litro por quilo  |
| LC-MS-MS | Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa tipo Massa<br>Massa |
| LOQ      | Limite de Quantificação  |
| M        | molar  |
| m/z      | Razão Massa Carga  |
| mbar     | Milibar  |
| mg       | Miligrama  |
| min.     | Minuto   |
| mL       | Mililitro  |
| mm       | Milímetro  |
| MRM      | Monitoramento de Reação Múltipla   |
| MS-MS    | Espectrometria tipo Massa Massa  |
| Ng       | Nanograma  |
| ° C      | Grau Centígrado  |
| OMS      | Organização Mundial da Saúde   |
| R        | Referência   |

|                 |  |
|-----------------|--|
| RF              | Rádio Frequência                                       |
| RT              | Tempo de Retenção                                      |
| s               | Segundo  |
| SGOT            | TGO – Transaminase Glutamil Oxalacética                |
| SGTP            | TGP – Transaminase Glutamil Pirúvica                   |
| T               | Teste  |
| t $\frac{1}{2}$ | Meia Vida de Eliminação do fármaco                     |
| T max           | Tempo para se atingir a Concentração Plasmática Máxima |
| UI/mL           | Unidade Internacional por Mililitro                    |
| V               | Volts  |
| v/v             | Volume por Volume                                      |
| vs              | Versus   |

## ***LISTA DE TABELAS***

|                  |  | <i>PAG</i> |
|------------------|--|------------|
| <b>Tabela 1</b>  | Características básicas de 4 tipos de funções do modo MS-MS2 | 26         |
| <b>Tabela 2</b>  | Esquema Experimental   | 45         |
| <b>Tabela 3</b>  | Descrição dos produtos Teste e Referência                    | 51         |
| <b>Tabela 4</b>  | Relação dos reagentes a serem utilizados                     | 52         |
| <b>Tabela 5</b>  | Relação dos equipamentos empregados                          | 53         |
| <b>Tabela 6</b>  | Preparo das soluções padrão de Amlodipina                    | 54         |
| <b>Tabela 7</b>  | Acurácia e Precisão Intra-ensaio                             | 66         |
| <b>Tabela 8</b>  | Acurácia e Precisão Inter-ensaio                             | 66         |
| <b>Tabela 9</b>  | Recuperação da amlodipina                                    | 67         |
| <b>Tabela 10</b> | Parâmetros Farmacocinéticos                                  | 68         |
| <b>Tabela 11</b> | Parâmetros Estatísticos                                      | 68         |

## ***LISTA DE FIGURAS***

|  | <i>PAG</i> |
|--|------------|
| <b>Figura 1</b> Componentes do Espectrômetro de Massa  | 20         |
| <b>Figura 2</b> Esquema do Espectrômetro de Massa triplo quadrupolar   | 22         |
| <b>Figura 3</b> Esquema de operação de analisadores quadrupolares  | 22         |
| <b>Figura 4</b> Formação de íons em um eletrospray convencional  | 23         |
| <b>Figura 5</b> Trajetória dos íons no eletrospray convencional e em um z-spray  | 24         |
| <b>Figura 6</b> Fluxo de partículas no z-spray   | 24         |
| <b>Figura 7</b> Desenho esquemático do eletrospray do tipo Z-spray   | 25         |
| <b>Figura 8</b> Esquema do analisador quadrupolar  | 27         |
| <b>Figura 9</b> Esquema estrutural de um canal de cálcio   | 29         |
| <b>Figura 10</b> Detalhamento da estrutura de um canal de cálcio com suas subunidades $\alpha$ , $\beta$ , $\delta$ , e $\gamma$ | 30         |
| <b>Figura 11</b> Estrutura tridimensional de um canal de cálcio voltagem dependente  | 30         |
| <b>Figura 12</b> Estrutura química da amlodipina   | 33         |
| <b>Figura 13</b> Rota proposta para a dissociação da amlodipina e da desipramina   | 60         |

## ***LISTA DE GRÁFICOS***

|  | <i>PAG</i> |
|--|------------|
| <b>Gráfico 1</b> Espectrograma MRM branco  | 61         |
| <b>Gráfico 2</b> Espectrograma padrão para zero (plasma branco + desipramina)                                | 61         |
| <b>Gráfico 3</b> Espectros de massa amlodipina: 3 A (ion precursor), 3B (ion produto) e 3C (desipramina)     | 62         |
| <b>Gráfico 4</b> Espectrogramas branco normal, lipêmico e hemolizado   | 63         |
| <b>Gráfico 5</b> Espectrogramas amlodipina com padrão interno nas concentrações 0,1ng/ml; 2,0ng/ml e 15ng/ml | 64, 65     |
| <b>Gráfico 6</b> Curva Concentração Plasmática versus Tempo  | 65         |

## **RESUMO**

O objetivo deste estudo foi avaliar a bioequivalência de duas formulações de amlodipina em comprimidos ( Amlodipina® 5 mg comprimidos, Laboratório Teuto Brasileiro Ltda., formulação teste e Norvasc ® 5 mg, Laboratórios Pfizer Ltda., como referência ) após administração oral a 24 voluntários adultos saudáveis de ambos os sexos.

O estudo foi aberto, randomizado com duas fases, onde os voluntários receberam uma dose única de besilato de amlodipina 5 mg. As amostras de plasma foram obtidas em um período total de 144 h. As concentrações de amlodipina plasmáticas foram analisadas por um método baseado na cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa usando como fonte de ionização eletrospray íon positivo ( LC-MS-MS ) e desipramina como padrão interno. Foram obtidos os seguintes parâmetros das curvas de concentração plasmática x tempo: AUC<sub>last</sub>, AUC<sub>0-inf</sub> , AUC<sub>0-144h</sub> and C<sub>max</sub>. O intervalo estatístico proposto foi de 80 a 125% de acordo com o FDA.

## ***ABSTRACT***

The aim of this study was to assess the bioequivalence of two amlodipine tablet formulations ( Amlodipine ® 5 mg tablet formulation elaborated by Laboratório Teuto Brasileiro Ltda., Brazil as test formulation and Norvasc ® 5 mg tablet formulation from Laboratórios Pfizer Ltda., Brazil as reference formulation ) after their oral administration to 24 healthy adult volunteers of both sexes.

The study was conducted using an open, randomized two-period crossover design, in which twenty-four healthy volunteers received a single oral dose of amlodipine besylate tablet 5 mg. Plasma samples were obtained over a 144 h period. Plasma amlodipine concentrations were analysed by a method based on liquid chromatography with positive ion electrospray ionization ( LC-MS-MS ) using desipramine as internal standard. From the amlodipine plasma concentration vs time curves, the following pharmacokinetic parameters were obtained: AUC<sub>last</sub>, AUC<sub>0-inf</sub>, AUC<sub>0-144h</sub> and C<sub>max</sub>. The statistical interval proposed was 80 to 125% according to the US Food and Drug Administration Agency.

# **INTRODUÇÃO**

**”A disponibilidade  
e o acesso aos medicamentos  
constituem parâmetros que permitem  
medir a qualidade dos serviços  
de saúde  
e constituem indicadores  
sociais de justiça e equidade  
na distribuição das riquezas de uma nação”.**

**(Declaração sobre Políticas Farmacêuticas dos Países Andinos  
Cartagena, Colômbia, março de 93).**

A adoção de uma política de medicamentos genéricos, envolvendo a produção, a garantia de qualidade, a prescrição, a dispensação e o uso dos mesmos é parte fundamental de uma diretriz para promoção do uso racional de medicamentos em nosso país – uma das principais diretrizes preconizadas pela Organização Mundial da Saúde.

A política de medicamentos genéricos é mais uma aliada para garantir à população o acesso a medicamentos de qualidade, com preços bem mais baixos. Para alcançar esse objetivo, é fundamental a participação ativa e consciente dos profissionais responsáveis pela prescrição e dispensação de medicamentos – médicos, odontólogos e farmacêuticos.

## **Histórico: Medicamentos Genéricos**

A indústria de medicamentos genéricos teve origem na década de 60, sendo os Estados Unidos o primeiro país a adotar essa política.

Em 1962 o National Research Council of the National Academy of Sciences foi instruído para avaliar cerca de 3 mil medicamentos. No entanto, somente em 1984 houve condições específicas para o crescimento da indústria de genéricos. Elas foram estabelecidas pelo Drug Price Competition and Patent Restoration Act, que determinou mecanismos simplificados para o registro de versões genéricas de todos os medicamentos aprovados após 1962, desde que apresentassem informações sobre sua bioequivalência com o produto original, entre outras exigências. Os medicamentos similares surgiram no Brasil após 1971, quando o país resolveu não reconhecer as patentes de medicamentos (Conselho Regional de Medicina do Estado de São Paulo - CREMESP 2001; Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo - CRF, 2001).

Com a sanção, em 1996, da Lei de Patentes, voltou-se à situação anterior a 1971: “medicamentos patenteados no exterior e cuja patente ainda não havia vencido não podem ser copiados, devendo esperar o prazo de vencimento da patente, que é de 20 anos”.

Em 10 de fevereiro de 2000, cria-se, no Brasil, o medicamento genérico (Lei nº 9.787 ou Lei dos Genéricos), já existente em vários outros países.

O medicamento genérico é intercambiável com o referência (geralmente, o inovador) porque tem qualidade comprovada através de testes in vitro e in vivo e é considerado seu equivalente terapêutico, ou seja, tem a mesma eficácia clínica e o mesmo potencial para gerar efeitos adversos em relação ao referência (STORPIRTIS, 1999).

Cabe ressaltar que a equivalência terapêutica, para a maioria dos casos, é assegurada através da bioequivalência e constitui a base para a intercambialidade entre o medicamento de referência e o genérico.

Os medicamentos similares, entretanto, nunca foram obrigados a comprovar equivalência farmacêutica com o inovador.(STORPIRTIS, 1999).

São fatores que impulsionam a produção de genéricos: eficácia e baixo custo dos genéricos (mais baratos que os medicamentos de marca); previsão de que 35 bilhões de dólares em patentes de medicamentos expiram nos próximos anos; crescimento dos custos de saúde; envelhecimento da população, com aumento das doenças crônicas, o que ocasiona elevados gastos públicos com o setor saúde; disseminação das novas e custosas tecnologias médicas; decréscimo da mortalidade e aumento da perspectiva de vida da população (Conselho Regional de Medicina do Estado de São Paulo – CREMESP, 2001; Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo - CRF, 2001).

De acordo com a Internacional Federation of Pharmaceutical Manufacturers Association (IFPMA), associação internacional composta por produtores de medicamentos do mundo inteiro, a implementação de uma política de medicamentos genéricos depende também dos níveis médios dos preços dos medicamentos vigentes em cada país. Nos locais onde o custo médio dos medicamentos é mais acessível, como França, Espanha e Itália, os genéricos não tiveram muito sucesso, já que grande parte da população nesses locais tem acesso garantido aos remédios necessários para os tratamentos. Já nos países onde a indústria farmacêutica pratica preços muito altos, como Estados Unidos, Inglaterra, Holanda e Alemanha, dentre outros, o mercado de genéricos tem evoluído cada vez mais. É esse também o caso do Brasil (Conselho Regional de Medicina do Estado de São Paulo – CREMESP, 2001; Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo - CRF, 2001).

## Testes de Bioequivalência e sua Importância para os Genéricos

A biodisponibilidade é uma propriedade biológica, avaliada após a administração do medicamento no organismo por uma via extravascular, através da determinação de parâmetros relacionados à absorção do fármaco. Ela se refere à quantidade de fármaco absorvido a partir da forma farmacêutica administrada e à velocidade do processo de absorção (UNITED STATES, 1998). Ou seja, indica a velocidade e a extensão da absorção de um princípio ativo em uma forma de dosagem, a partir de sua curva de concentração vs tempo na circulação sistêmica ou sua excreção na urina.

Por se tratar de um parâmetro relacionado à absorção, não se aplica a fármacos administrados por via intravascular, uma vez que o processo de absorção não ocorre nesta via. A absorção é a transferência do fármaco do local de administração para a corrente sanguínea. Assim, por definição, um fármaco administrado por via intravenosa é 100% biodisponível, isto é, toda a dose do fármaco é administrada diretamente na corrente circulatória e está disponível para interagir com os receptores e desencadear o efeito farmacológico (STORPIRTIS, 1999).

Partindo do princípio de que a ação terapêutica de uma substância ativa depende da sua disponibilização no local de ação, numa concentração efetiva, durante um período determinado, é previsível que, na presença de resultados farmacocinéticos semelhantes, se obtenha uma ação terapêutica equivalente.

Em outras palavras, se um mesmo indivíduo apresentar durante um período adequadamente estabelecido, concentrações plasmáticas semelhantes de um mesmo fármaco, a partir de dois medicamentos, supõem-se que se observem efeitos similares. Assim, a bioequivalência é um estudo comparativo entre as biodisponibilidades de dois medicamentos que possuem a mesma indicação terapêutica e que são administrados pela mesma via extravascular e na mesma dose molar.

Dois medicamentos são considerados bioequivalentes quando não forem constatadas diferenças estatisticamente significativas entre a quantidade absorvida e a velocidade da absorção.

## Cromatografia Líquida de Alta Performance

Embora o termo cromatografia tenha sido primeiramente empregado em 1906, por um botânico russo na separação dos componentes de um extrato de folhas, somente na década de 30 é que esta técnica foi redescoberta e aperfeiçoada .

Na década de 60 surge a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência como a aplicação de cromatografia líquida às teorias e instrumentações desenvolvidas originalmente para a cromatografia gasosa: a eficiência de uma separação aumenta com a diminuição do tamanho da partícula da fase estacionária. Portanto a principal diferença entre a cromatografia clássica e o HPLC é a utilização de fases estacionárias com micropartículas (10, 5 ou 3  $\mu$ ) esféricas, de preferência. Estas fases, por serem muito menos permeáveis, tornaram necessária a utilização de bombas para a eluição da fase móvel (LOUGH, 1995; WAINER, 1995; DEGANI et al., 1997).

A utilização destas novas fases estacionárias, associada ao desenvolvimento da instrumentação, levou esta técnica a uma melhor performance em termos de resolução, quantificação e detecção em um menor tempo de análise.

O HPLC tem como base a eluição de uma fase líquida móvel sobre uma fase sólida estacionária. A separação das diferentes substâncias presentes no fluido biológico analisado na fase móvel, processa-se por interação com a fase estacionária, através de processos de partição, adsorção ou troca iônica. Os dados obtidos apresentam-se como alturas ou áreas de picos da substância eluída, em diferentes tempos, saindo primeiramente da coluna àquela com menor interação e por fim aquela com maior interação com a fase estacionária. A concentração de cada substância é obtida pela relação entre o analisado e o padrão interno (LESLIE, 1994).

É necessário que as amostras sejam previamente tratadas antes de serem injetadas no HPLC. Utiliza-se como pré-tratamentos: precipitação de proteínas do soro ou plasma, extração líquido-líquido e líquido-sólido. Adiciona-se , um padrão interno à amostra no início do processo para compensar perdas por transferência e variações de volume nas diferentes etapas, uma vez que o método extrativo do analisado possa vir a interferir na exatidão, precisão e seletividade do processo. A recuperação do analisado não precisa ser necessariamente de 100%, mas a extensão da recuperação do analisado e

do padrão interno deve ser consistente, precisa e reprodutiva (LESLIE, 1994; UNITED STATES, 2001).

O HPLC acoplado à espectrometria de massa é um método de separação química utilizado em testes de bioequivalência para análise de fármacos em fluidos biológicos com a finalidade de purificar o fluido biológico avaliado para depois introduzir as diferentes substâncias separadas no dispositivo de análise que é o espectrômetro de massas. (LESLIE, 1994; HOFFMANN, 1996). Sem esta etapa preliminar, muitas amostras biológicas iriam produzir uma grande quantidade de picos ininterpretáveis, devido à multiplicidade de substâncias presentes.

## Espectrometria de Massa

A espectrometria de massa iniciou-se com WIEN (1898) quando utilizou em seus experimentos a deflexão magnética para análise. THOMSON (1913) obteve os primeiros espectros de massa ( $N_2$ ,  $O_2$ ,  $CO$ ,  $CO_2$  e  $COCl_2$ ). Até hoje muitos espectrômetros de massa têm sido desenvolvidos de acordo com o esquema fundamental de Wien.

O espectrômetro é um equipamento que mede individualmente a massa de moléculas que foram convertidas a íons, por exemplo moléculas que foram carregadas eletricamente. A unidade de massa mais conveniente a ser utilizada é Dalton, sendo que  $1 \text{ Da} = 1/12$  da massa de um átomo do isótopo de carbono 12. Seguindo esta convenção tem-se que o isótopo de carbono  $C_{12}$  tem exatamente 12 unidades de massa .

O espectrômetro não mede a massa molecular diretamente, mas sim a proporção massa/carga dos íons provenientes das moléculas. A unidade geralmente utilizada para este propósito é a unidade fundamental da carga, a magnitude da carga em um elétron. Como a carga em um íon é definida como um número  $z$  da unidade fundamental de carga, a proporção massa – carga é tida como  $m/z$  . Em muitas situações, os íons incontáveis na espectrometria de massa tem apenas 1 carga ( $z = 1$ ), assim o valor  $m/z$  é numericamente igual à massa molecular (iônica) em Da .

A amostra, a qual pode ser sólida, líquida ou vapor, entra em uma câmara de vácuo através de um injetor. Dependendo do tipo de injetor e da técnica de ionização

utilizada, a amostra pode já estar na forma de íons em solução, ou pode ser ionizada durante o processo de volatilização.

Os íons na fase gasosa são classificados no analisador de massa de acordo com suas razões  $m/z$  para então serem coletados pelo detector. No detector o fluxo de íons é convertido para uma corrente elétrica proporcional. O sistema de dados registra a magnitude destes sinais elétricos como uma função  $m/z$  e converte esta informação a um espectro de massa (Figura 1).

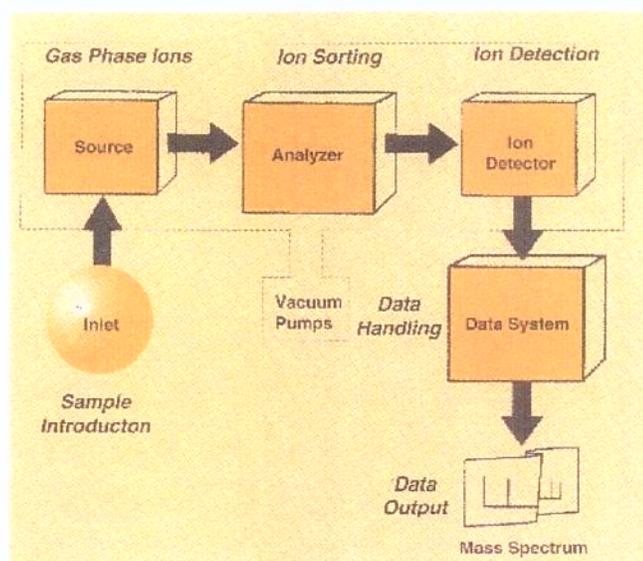


Figura 1. Componentes de um Espectrômetro de Massa

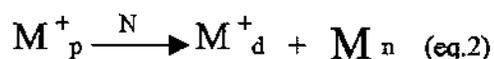
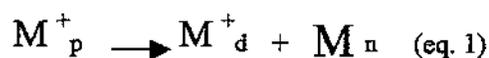
O espectro de massa é um gráfico da intensidade do íon como uma função da razão massa-carga ( $m/z$ ). Os espectros de massas são geralmente representados como simples histogramas.

Para se obter espectros de massas de compostos presentes em uma mistura, os componentes individuais devem ser separados primeiramente para então serem analisados pela espectrometria de massa. Conforme visto anteriormente, a separação é necessária para se evitar uma identificação ambígua por causa de dois compostos criarem espectros sobrepostos ou mesmo devido a um composto gerar muitos íons fragmentos.

## Espectrometria massa - massa (MS/MS)

### Conceitos e Princípios

O conceito básico da espectrometria do tipo massa-massa (MS/MS) pode ser descrito como a seleção de um íon pai no primeiro estágio da análise, e então a análise de íon (s) filho (s), frequentemente formado(s) em um processo CID (dissociação induzida por colisão), em um segundo estágio da análise (KENERETH et al., 1988).



Das três espécies da equação 1 (eq.1), apenas o íon filho atualmente é detectado. Entretanto, como o primeiro analisador é ajustado para deixar passar apenas o íon precursor, a relação da equação 1 determina implicitamente ( $M_n$ ). O processo CID é representado através da equação 2, sendo (N) o gás inerte utilizado para a colisão (KENERETH et al., 1988).

Em resumo, no espectrômetro de massa, a substância é convertida em forma volátil, introduzida em uma câmara de vácuo e, então ionizada. Os íons resultantes são acelerados em um campo elétrico como um feixe, que é defletido, em geral, pela aplicação de um campo magnético transversal. O grau de deflexão de íons individuais depende da razão de sua massa para sua carga (razão  $m/z$ ), sendo aqueles com maior razão  $m/z$  defletidos em menor grau. Ao final do equipamento encontra-se uma estreita fenda, através da qual uma parte do feixe de íons passa a um detector, que mede sua intensidade em um momento qualquer. Ao variar a potência do campo magnético, assim também o feixe de íons (separado de acordo com suas razões  $m/z$ ), passa através da fenda do detector em seqüência, produzindo um espectro (Figura 2 e Figura 3).

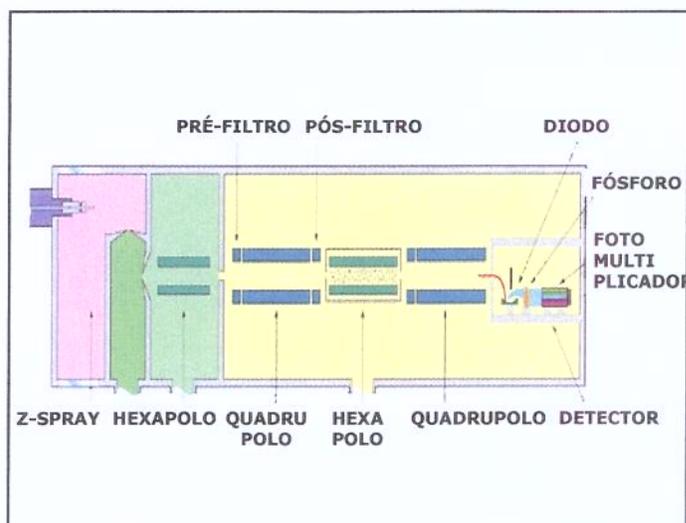


Figura 2 Esquema do Espectrômetro de Massa triplo quadrupolar

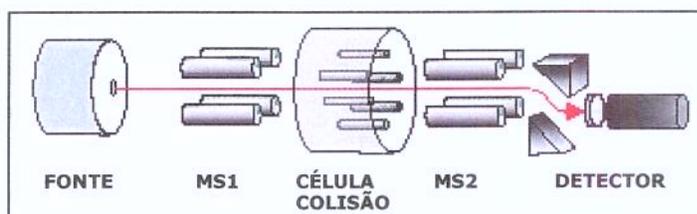


Figura 3. Esquema de operação de analisadores quadrupolares

## Fonte Ionizadora

Diferentes interfaces são utilizadas no acoplamento entre a cromatografia líquida e a espectrometria de massa, o que pode ser um problema, pois o espectrômetro requer íons em fase gasosa e as substâncias normalmente analisadas pelo HPLC são compostos não voláteis (HOFFMANN et al.,1996). Tanto o eletrospray convencional quanto o z-spray, parecem ser os métodos ideais de ionização entre o HPLC e a espectrometria de massa.

Na ionização por eletrospray, a fase móvel é borrifada após deixar o capilar, na extremidade do qual existe uma diferença de potencial de vários quilovolts. O tamanho das gotículas é dependente da carga de cada uma, da natureza da fase móvel, da velocidade do fluxo e da diferença de potencial.

As gotículas caminham contra um fluxo de nitrogênio, que as faz diminuir de tamanho por evaporação do solvente, restando várias moléculas do analisado, que,

carregadas eletricamente, vão se separando até praticamente sobraem íons isolados (Figura 4), cuja carga dependerá do número de sítios de ionização de cada molécula em questão ou agregados eletricamente carregados (HOFFMANN et al., 1996).

A principal diferença entre o eletrospray convencional e o z-spray está na trajetória dos íons analisados (Figura 5 e Figura 6)

Enquanto que no eletrospray convencional a trajetória dos íons descreve uma linha reta desde o início do tubo de entrada da fonte até o orifício do skimmer, no z-spray, os íons traçam um movimento em “z” devido a própria configuração geométrica da fonte e das diferenças de potencial existentes (ddp). Devido a esta configuração da trajetória em “z” poucas moléculas neutras chegam até o segundo skimmer (cone de extração) e assim para o analisador de massa (Figura 7) (MICROMASS, 2000).

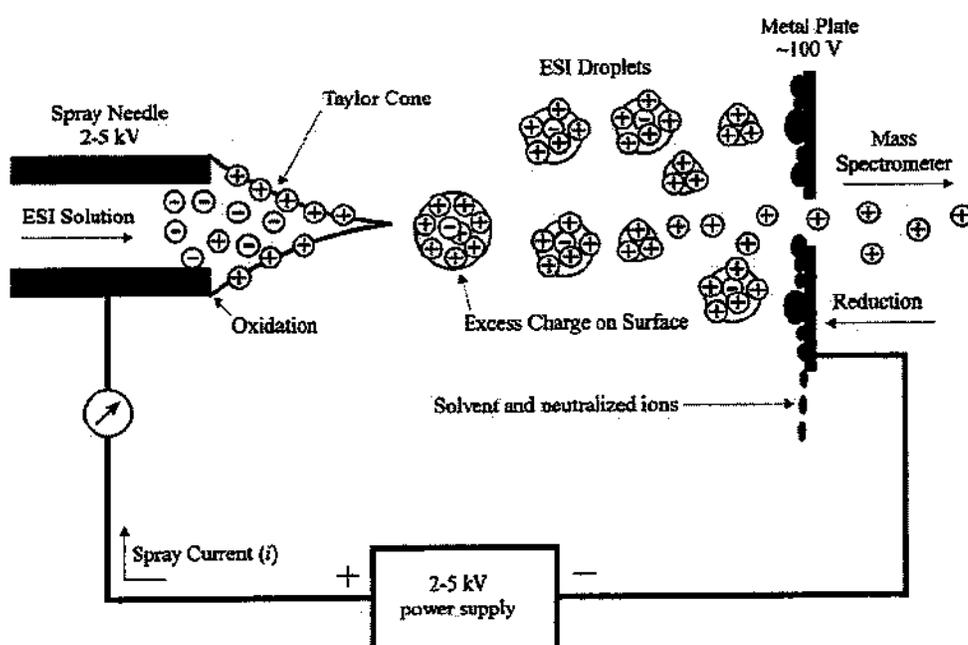


Figura 4. Formação de íons em um eletrospray convencional

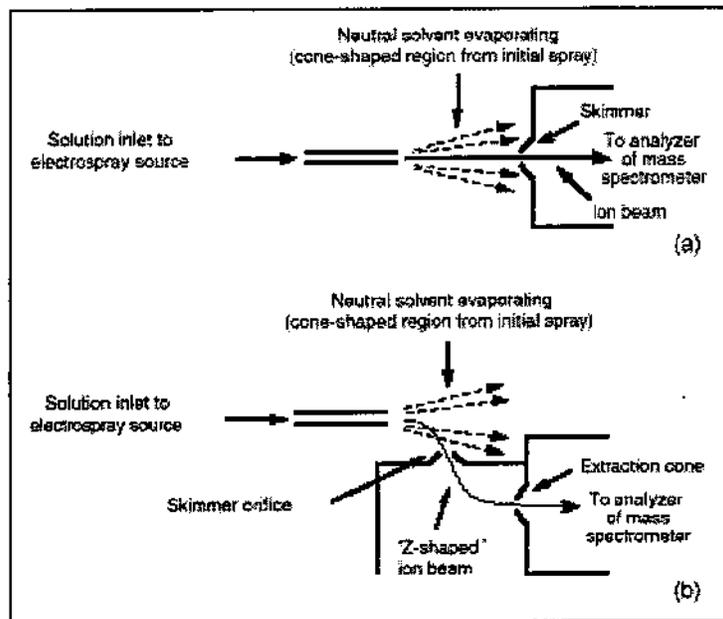


Figura 5. Trajetória dos íons em um eletrospray convencional(a) e em um z-spray (b)

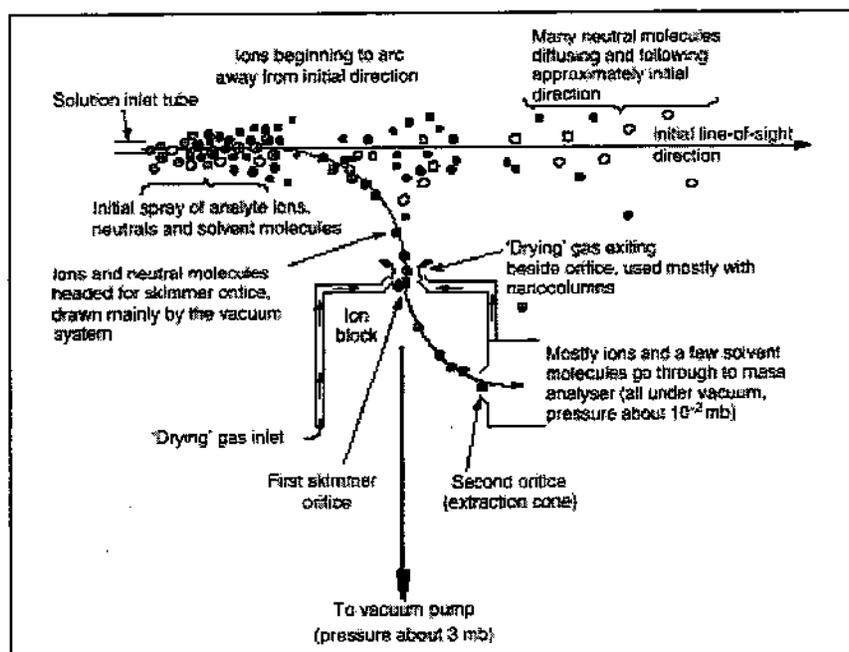


Figura 6. Fluxo de partículas no z-spray

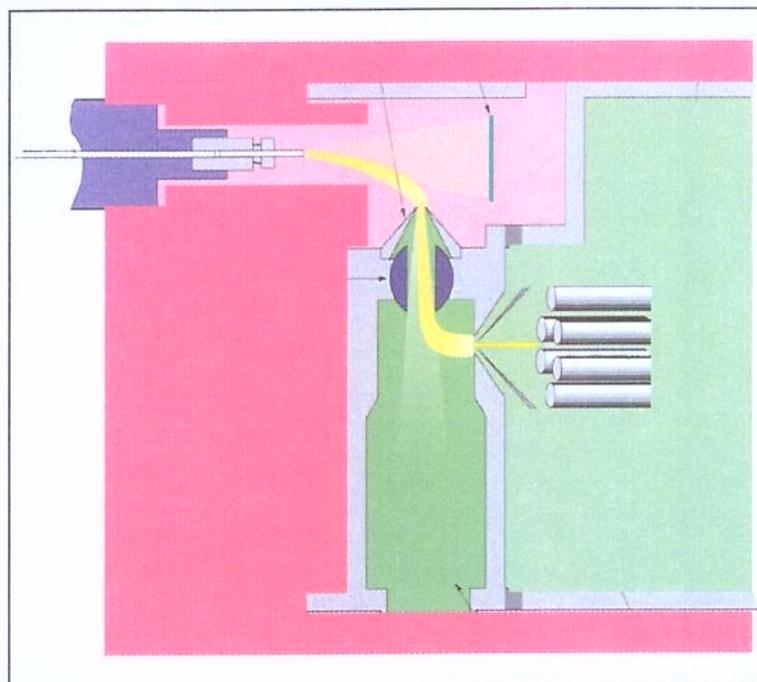


Figura 7. Desenho esquemático do eletrospray do tipo Z-spray.

## Decomposição iônica ativada por colisão (CID)

O método MS/MS requer a fragmentação dos íons precursores selecionados no primeiro analisador para que o segundo analisador faça a análise dos íons produtos. A base do processo CID pode ser descrita como: a) a colisão de um íon com o um gás inerte promove um estado de excitação iônica ( devido a uma fração da energia de colisão ser transformada em energia interna); b) este aumento da energia interna faz com que o íon torne-se instável decompondo-se (KENERETH et al, 1988).

## Analísadores de massa

Assim como há uma grande variedade de fontes ionizadoras, há também vários tipos de analisadores de massa conforme visto anteriormente. As três características mais importantes em um analisador são: o limite de massa superior, a transmissão e a resolução. O limite de massa determina o maior valor da razão  $m/z$  que pode ser medida. A transmissão é a razão entre o número de íons que alcançam o detector e

àqueles que são produzidos na fonte. O poder de resolução é a habilidade de produzir sinais distintos para dois íons de pequena diferença de massa.

O quadrupolo é um dispositivo que usa a estabilidade das trajetórias para separar íons de acordo com suas razões  $m/z$ . Em um analisador de massa quadrupolar os tubos ou hastes (polos) estão dispostos equidistantemente de um eixo central imaginário na forma de um quadrado (Figura 8).

Potenciais estáticos e alternados são aplicados em oposição aos pares de tubos resultando assim, um campo elétrico flutuante. Os íons positivos ou negativos vindos da fonte são injetados ao longo do eixo central do quadrupolo, que selecionará apenas os íons de massa de interesse, permitindo que estes sejam filtrados para serem detectados no analisador de massa. Portanto os íons de massa superior ou inferior àquela selecionada serão defletidos e perdidos nas laterais do aparelho. Esta seleção é feita pela variação do potencial elétrico ou frequência; geralmente é mais fácil manter a frequência constante e alterar a voltagem. Pela alteração do campo elétrico, as massas de todos os íons formados podem ser escaneadas seqüencialmente da maior para a menor ou vice-versa originando assim, um espectro de massa (HOFFMANN et al., 1996).

### Modo de operação MS-MS

|                                 | MS1                                 | CEL.COLISAO                               | MS2                               |
|---------------------------------|-------------------------------------|---|-----------------------------------|
| ESPECTRO<br>ÍON PRODUTO         | estático<br>seleção massa precursor | apenas RF<br>passam<br>todas as<br>massas | scanning                          |
| ESPECTRO ION<br>PRECURSOR       | scanning                            |   | estático<br>seleção massa produto |
| MRM                             | estático<br>seleção massa precursor |   | estático<br>seleção massa produto |
| ESPECTRO<br>CONSTANTE<br>NEUTRO | scanning sincronizado<br>com MS2    |   | scanning sincronizado<br>com MS1  |

Tabela 1. Características básicas de 4 tipos de funções do modo MS-MS.

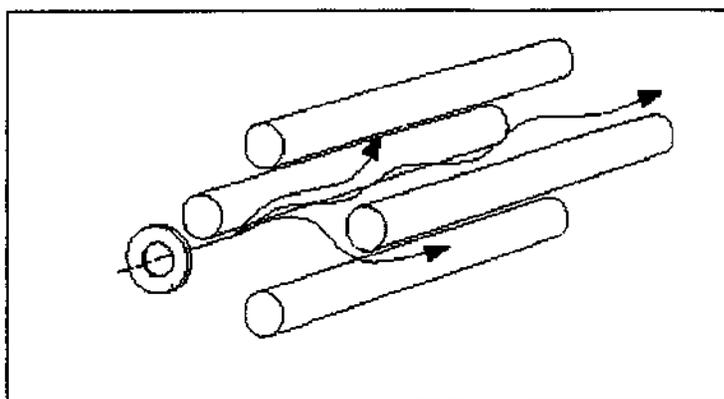


Figura 8. Esquema do analisador quadrupolar

## Fármacos Antagonistas do Cálcio

Há 20 anos atrás os bloqueadores dos canais da cálcio foram introduzidos na farmacoterapia como vasodilatadores coronarianos para o tratamento de doenças cardíacas coronarianas (FIECKENSTEIN, 1983).

As pesquisas foram conduzidas para o desenvolvimento de fármacos que fossem mais seletivos, com duração de ação mais longa e com menor inotropismo negativo, surgindo desta forma, os antagonistas dos canais de cálcio de segunda geração (nitrendipina, nisoldipina, nimodipina, isradipina, felodipina, nicardipina e nivaldipina) e posteriormente os de terceira geração (amlodipina, lacidipina, lercadinipina e manidipina) As não-diidropiridinas tem demonstrado um efeito inotrópico negativo mais pronunciado sobre o coração, uma vez, que se ligam de forma similar aos canais de cálcio tipo L cardíacos e vasculares (STEFFEN, 2004).

Enquanto o verapamil (fenilalquilamina) e o diltiazem (benzotiazepina), exibem efeitos eletrofisiológicos em função de um bloqueio adicional dos canais de cálcio do tipo T, as diidropiridinas, cujo protótipo é a nifedipina, agem predominantemente bloqueando os canais tipo L, induzindo assim, uma vasodilatação periférica (GODFRAIND, 1986).

Por muito tempo se questionou a segurança dos bloqueadores dos canais de cálcio em pacientes com hipertensão, e em particular com diabetes mellitus. Duas

revisões chegaram a conclusões opostas com respeito à proteção cardiovascular dos bloqueadores dos canais de cálcio comparados com diuréticos ou beta-antagonistas, provavelmente devido a diferenças em relação aos critérios adotados para a triagem e o número de pacientes incluído nos estudos (BLOOD...,2000; PAHOR,2000; STEFFEN, 2004) . STAESSEN et al. (2001), ao estudar os diversos fármacos antihipertensivos percebeu que todas as drogas a longo prazo, tinham eficácia e segurança semelhantes e que os bloqueadores dos canais de cálcio, protegiam mais contra derrame cerebral que infarto do miocárdio com um benefício global cardiovascular se comparados a fármacos antihipertensivos mais antigos.

## Propriedades Farmacológicas

Os canais de cálcio voltagem-dependentes são proteínas contendo domínios de seqüência homóloga dispostos em fileira no interior de uma única subunidade grande ou de múltiplas subunidades menores também com seqüência homóloga, que apresentam regiões hidrófobas que distendem a membrana formando um poro interno. Esta subunidade formadora do canal é conhecida como  $\alpha_1$ , há também outras subunidades associadas ( $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) (CATTERALL, 1988). As diidropiridinas ligam-se somente a subunidade  $\alpha_1$ (Figura 9, Figura 10 e Figura 11).

Esses canais iônicos são divididos em três subtipos: L, N e T baseados em suas condutâncias e sensibilidade à voltagem (SCHWARTZ et al.,1988; TSIEN et al., 1988). Apenas o canal do tipo L é sensível aos bloqueadores dos canais de cálcio. Embora as diidropiridinas se liguem a um local comum, os bloqueadores dos canais de cálcio de diferentes estruturas ligam-se a pontos distintos do canal L. Essa seletividade parece surgir devido a abundância dos canais L no músculo cardíaco e liso, sendo que os fatores farmacocinéticos e o aumento da afinidade dos ligantes pelo canal quando a membrana é despolarizada também parecem contribuir (MILLER, 1987).

As diidropiridinas podem ainda inibir as fosfodiesterases dos nucleotídeos cíclicos. Essa dupla ação, inibição do cálcio citosólico e aumento da concentração dos nucleotídeos cíclicos, contribui para um maior efeito sobre o relaxamento vascular (GOODMAN et al, 1990).

Os Bloqueadores de Canal de Cálcio tem por mecanismo de ação geral a inibição do influxo de cálcio na célula muscular lisa, por bloqueio competitivo com o  $Ca^{+2}$  que entra pelos canais lentos voltagem dependentes (Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo – SOCESP, 1994)

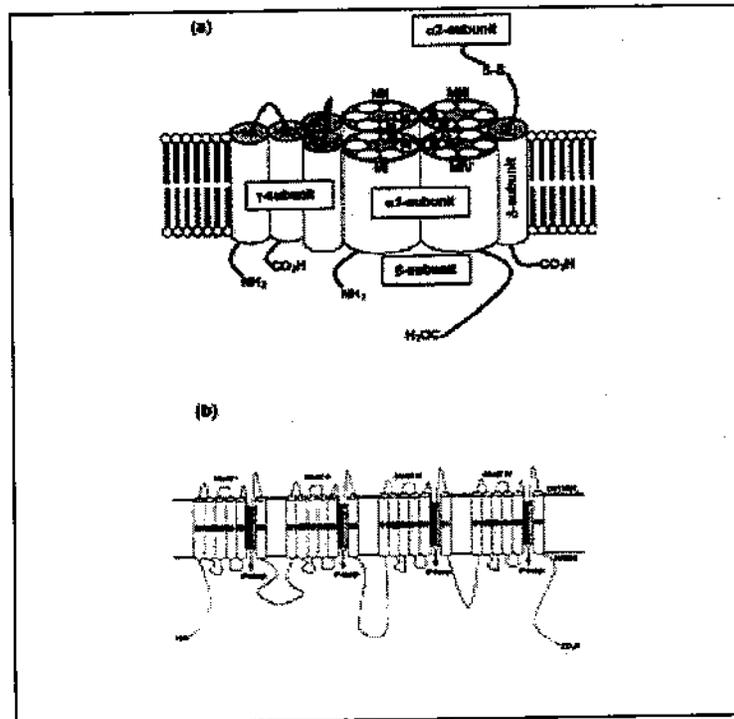


Figura 9. Esquema estrutural de um canal de cálcio. (a) Estrutura molecular de um canal de cálcio voltagem dependente (CCVD). Adaptado de VARADI *et al.* (1999). (b) Rearranjo transmembrana proposto para um CCVD. Adaptado de CATTERALL (1988).

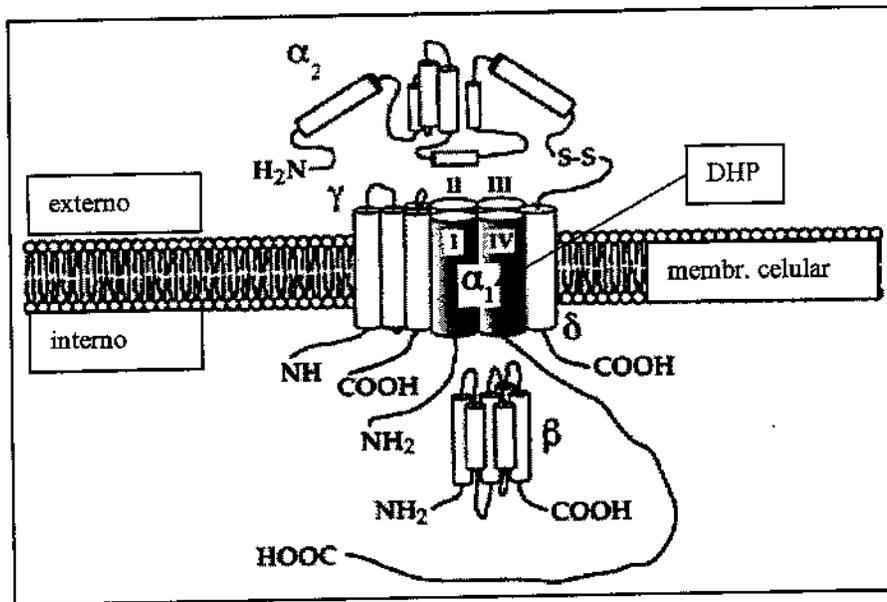


Figura 10. Detalhamento da estrutura de um canal de cálcio com suas subunidades  $\alpha_1$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  e  $\gamma$ . A seta aponta para a subunidade alfa 1 onde as diidropiridinas (DHP) ligam-se.

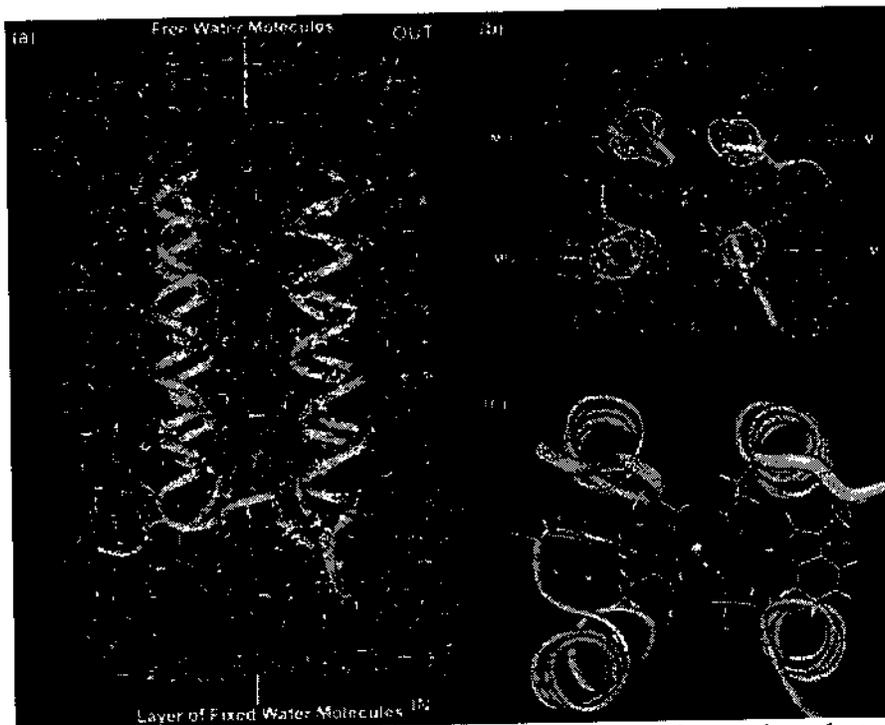


Figura 11. Estrutura tridimensional de um canal de cálcio dependente de voltagem. (a) visão vertical (b) visão horizontal do poro interno (c) interação com íons cálcio.

A base científica portanto, para a incorporação dos antagonistas do cálcio na terapêutica cardiovascular decorre, principalmente, do papel do cálcio como ativador da contração muscular e da atividade específica das células dos nós sinusal e A-V.

No miocárdio o cálcio se incorpora à troponina e reverte a inibição que o complexo troponina-tropomiosina exerce sobre o acoplamento dos filamentos de actina e miosina, etapa essencial para o início da contração muscular. Na musculatura lisa dos vasos, o estímulo para este acoplamento faz-se pela ligação do cálcio com a calmodulina. Por sua vez, a despolarização das células do nó sinusal e do nó A-V é altamente dependente da corrente lenta de cálcio (GOODMAN et al, 1990).

### **Usos Clínicos dos Fármacos Bloqueadores dos Canais de Cálcio**

São vasodilatadores de 1º escolha no tratamento da HAS. Também possuem ação anti-anginosa. O Verapamil e Diltiazem diferem das diidropiridinas pela ação depressora sobre o miocárdio (ROSSI e CUNHA, 1998). Os bloqueadores dos canais de cálcio também são promissores numa ampla variedade de distúrbios, inclusive miocardiopatia hipertrófica, enxaqueca, fenômeno de Raynaud, preservação pós infarto de tecido e aterosclerose. A escolha de um determinado fármaco bloqueador dos canais de cálcio deve ser feita com o conhecimento dos seus possíveis efeitos adversos específicos, bem como de suas propriedades farmacológicas (KATZUNG e BERTRAM, 1994)

### **Efeitos Colaterais e Contra-indicações**

Verapamil e Diltiazem: Constipação intestinal, mais comum do verapamil; edema, cefaléia, mais freqüente do diltiazem; náuseas, tonturas, dispnéia e astenia; Ação cardiodepressora, bradicardia. Verapamil nunca deve ser usado associado a beta-bloqueador. Atenção especial deve ser dada distúrbios de condução pré existentes, a insuficiência cardíaca e ao uso de digitálicos.

Diidropiridinas: Taquicardia, cefaléia e rubor facial é tríade presente em 10% dos pacientes no início do tratamento. Podem causar ainda edema pré-tibial, náuseas, tonturas e palpitações. A amlodipina possui menor grau destes efeitos devido sua ação

lenta e duradoura. Não causam depressão miocárdica. (Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo – SOCESP, 1994)

## **Interações Medicamentosas**

Os antagonistas dos canais de cálcio podem aumentar o nível sérico de digoxina, com possibilidade de intoxicação digitálica. O diltiazem, mais especificamente, pode aumentar em cerca de 20% os níveis de digoxina. Além disso, verapamil e diltiazem têm ação aditiva à digoxina em alguns aspectos farmacológicos, podendo desencadear bradicardia sintomática e bloqueios de condução.

Drogas neuropsiquiátricas concomitantemente com antagonistas dos canais de cálcio podem resultar em interações importantes: o diltiazem inibe a catabolização do anticonvulsivante carbamazepina e pode levar à toxicidade; o uso de barbitúricos, por meio da ativação das isoenzimas da citocromo monoxidase P450, diminui a biodisponibilidade do diltiazem, da nifedipina e do verapamil; o verapamil e a nifedipina aumentam a biodisponibilidade da fenitoína; o lítio associado aos antagonistas dos canais de cálcio (verapamil e diltiazem) têm sua concentração aumentada, podendo levar a psicoses e rigidez corpórea. Essa associação é problemática e requer medidas freqüentes do lítio sérico (ROSSI e CUNHA, 1998).

## **Outras Interações Importantes**

Aminofilina concomitantemente com o verapamil: pode levar à diminuição da catabolização hepática da aminofilina e esta, eventualmente, atingir níveis tóxicos.

Rifampicina e verapamil ou diltiazem: praticamente existe inativação da atividade dos antagonistas dos canais de cálcio, por catabolismo acelerado.

Ciclosporina pode ter os níveis séricos aumentados pelo verapamil e pelo diltiazem, podendo atingir níveis tóxicos.

Eritromicina, empregada em pacientes utilizando felodipina, pode acarretar sintomas desagradáveis, como rubor e calor facial, por inibição do catabolismo dos antagonistas dos canais de cálcio.

A cimetidina, aumenta as concentrações séricas da nifedipina e do diltiazem, por meio da diminuição da catabolização destes, podendo levar a níveis tóxicos. (ROSSI e CUNHA, 1998).

## Amlodipina

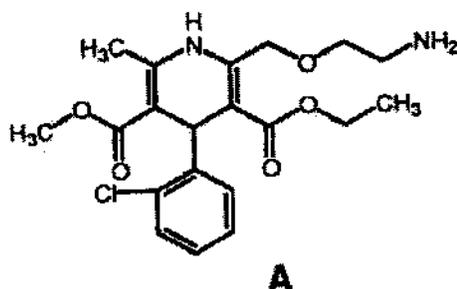


Figura 12: Estrutura química da amlodipina

A amlodipina é um derivado 1,4 di-hidropiridínico, estruturalmente relacionado com a nifedipina, que tem uma substituição do grupo amino básico, que lhe confere propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas específicas (BURGES, 1985, 1987).

Por ser um antagonista de canal de cálcio de ação prolongada, é usada no tratamento da hipertensão arterial e angina pectoris (ARROW, BAEZ e FAULKNER, 1986).

## Farmacologia Clínica

No homem, os efeitos dominantes da amlodipina são decorrentes da vasodilatação sistêmica. Nos estudos de farmacocinética em voluntários normotensos, com doses de até 5 mg somente pequenas mudanças hemodinâmicas foram evidenciadas (WILLIAMS, 1988). Em hipertensos, doses diárias entre 2,5mg a 5mg produzem decréscimos dose-dependente na pressão arterial. A amlodipina diminui a resistência vascular periférica sem causar taquicardia reflexa além de ser efetiva em dose única no controle da hipertensão com queda da pressão sistólica e diastólica

(BURGES, 1987; MASON, 1989). Na terapia com amlodipina ocorre uma vasodilatação renal, e conseqüente discreto aumento na filtração glomerular. A amlodipina causa também um aumento, dose-dependente, da duração do exercício antes do início da angina pectoris em pacientes com doença arterial coronariana. Parte desta melhora é devida a uma redução das necessidades de oxigênio pelo miocárdio e parte devido a uma vasodilatação das artérias e arteríolas coronarianas (BURGES, 1987). Não foi notado efeito da amlodipina no sistema renina-angiotensina ou no sistema nervoso simpático, ou alterações nas concentrações de fator natriurético no homem (ABERNETHY, 1990).

### **Farmacocinética**

A amlodipina é bem absorvida após administração oral, com 60-80% da dose oral alcançando a circulação sistêmica. Os picos de concentração plasmática são vistos em torno de 6-12 horas (média 7,6h) após a sua administração. Isto evita alterações plasmáticas rápidas presentes com outros antagonistas do cálcio e conduz a uma baixa incidência de efeitos colaterais (REID, 1988; WILLIAMS, 1988; OSTERLOH, 1989).

A amlodipina é distribuída extensivamente por todo o corpo, tendo um volume de distribuição de 15 - 25 l/kg indicando distribuição extensiva da droga nos tecidos periféricos. Experimentos *in vivo* indicam alta concentração na membrana plasmática celular. É extensivamente ligada as proteínas plasmáticas (92-98%). A meia vida de eliminação plasmática varia de 30-60 h (média 35,7h) e isto é o resultado de um clearance metabólico baixo e uma extensiva distribuição nos tecidos periféricos. (FAULKNER, 1986; REID, 1988; WILLIAMS, 1988; ABERNETHY, 1990).

A amlodipina atinge o estado de equilíbrio plasmático após 7-9 dias de dose única diária (LAHER, 1988; REID, 1988).

A amlodipina é extensivamente metabolizada no fígado e menos de 10% é excretada de forma inalterada na urina (REID, 1988).

Não ocorre mudanças na disposição de amlodipina em pacientes com doença renal (LAHER, 1988), mas o clearance total da droga está diminuído em pacientes idosos hipertensos (ABERNETHY, 1990) e indivíduos idosos sadios (ELLIOTT, 1988).

## **Apresentação Farmacêutica**

Comprimidos de 5 mg e 10 mg estão disponíveis para uso clínico, (PFIZER, U.K) e é a dosagem da qual estudos de biodisponibilidade foram derivados.

## **Posologia**

Para o controle da hipertensão é recomendado 5 mg em única dose diária. A dosagem pode ser aumentada, se necessário, para até 10 mg ao dia. Doses semelhantes são administradas para o tratamento da angina pectoris estável (MARTINDALE, 1993).

## **Efeitos Adversos**

Como outros antagonistas de cálcio, edema periférico e eritema ocorrem na proporção de 5 -10% dos pacientes, ruborização facial em 2-5% dos pacientes. Queixas de fadiga ocorrem frequentemente nos pacientes tratados com placebo (4,6% vs 2,9%), cefaléia (8,1% em ambos grupos), vertigem (3% vs 3,4%). Existe evidência que esses efeitos são mais comuns em pacientes tratados com doses maiores do que 5 mg diária (OSTERLOH, 1989).

Neonatos, gestantes, aleitamento materno, crianças constituem grupos de risco uma vez que os estudos não foram concluídos até o momento, portanto a amlodipina não deve ser prescrita nesses casos.

Doença Renal - A farmacocinética da amlodipina não está modificada em indivíduos com prejuízo da função renal, efeitos clínicos não foram avaliados (LAHER, 1988).

## **Métodos Analíticos Empregados para Quantificar Concentrações Séricas de Amlodipina no Plasma**

Há vários métodos analíticos que podem ser utilizados para a quantificação em fluídos biológicos de antagonistas de cálcio dihidropiridínicos, como a amlodipina. Para a quantificação da concentração plasmática de amlodipina, YASUDA et al. (1996), MARZO (2000) e CARVALHO et al. (2001) usaram como método analítico a cromatografia líquida acoplada a um sistema de espectrometria de massa (LC-MS-MS).

Enquanto YASUDA et al. (1996) usou o método de ionização química à pressão atmosférica para a produção de íons (fonte ionizadora - APCI), CARVALHO et al. (2001) adotou em seu experimento a ionização por eletrospray íon positivo, obtendo-se assim um LOQ de 0.14 ng/ml e RT = 4.5 min. e LOQ de 0.1 ng/ml; RT = 3.4 min. respectivamente. Outro método como a cromatografia em camada descrita por PANDYA (1995), obteve um LOQ = 2.0 ng/ml enquanto que no método descrito por JOSEFSSON (1995), cromatografia líquida com detecção amperométrica, o limite de quantificação foi muito menor, determinando assim, maior sensibilidade do método (LOQ = 0.2 ng/ml; RT = 8.5 min). MONKMAN (1995) através da cromatografia gasosa automatizada, obteve como limite de quantificação e tempo de retenção para seu experimento 0.5 µg/l e 9.9 min respectivamente. A cromatografia líquida com detecção UV foi utilizada por LUKSA et al. (1997a) na determinação do comportamento farmacocinético dos enantiômeros de amlodipina após administração única. Neste experimento LUKSA et al. (1997a) obteve um LOQ de 0.2 ng/ml para um tempo de retenção muito alto (maior que 40 min). O mesmo autor cita ainda um LOQ = 5.0 ng/ml e RT = 9.8 min para a detecção por eletroforese (LUKSA et al., 1997 b).

## **OBJETIVO**

Avaliar se a formulação de besilato de amlodipina (comprimido) 5 mg produzida pelo Laboratório Teuto Brasileiro Ltda atinge níveis plasmáticos equivalentes ao besilato de amlodipina comprimidos 5 mg do produto de referência elaborado pelos Laboratórios Pfizer Ltda. (Norvasc<sup>®</sup>), administrados em 24 voluntários sadios adultos de ambos os sexos.

## CASUÍSTICA

Vinte e quatro voluntários sadios da ambos os sexos, adultos, com idade entre 21 e 41 anos, entre os 10% do peso corporal ideal, foram selecionados para o estudo. O grupo masculino foi composto por 12 voluntários com idade entre:  $27 \pm 6$  anos. [21-38], altura:  $173.0 \pm 9.0$  cm [162.0-195.0], peso:  $72.4 \pm 10.0$  Kg [60.0-80.0]. O grupo feminino foi composto por 12 voluntárias com idade entre:  $30.6 \pm 7$  anos [21-41], altura:  $160.0 \pm 5$  cm [152-168] e peso:  $61.2 \pm 7$  Kg [52.0-71.0].

# **METODOLOGIA**

## **Protocolo Clínico**

### **Tipo de Estudo**

Estudo aberto, randomizado, cruzado, onde os voluntários recebem os medicamentos teste e referência em dois períodos.

### **Delineamento do estudo**

O desenho consistirá de um estudo aberto, randomizado, aleatório, de 24 voluntários saudáveis, adultos de ambos os sexos de 18 a 45 anos. Depois da seleção e observado um período de pelo menos 2 semanas sem fazer uso de qualquer medicação, os voluntários que forem considerados qualificados para participar do estudo, serão internados por dois períodos de aproximadamente 26 horas, com pelo menos vinte e um dias de intervalo entre os internamentos.

### **População**

Voluntários saudáveis, adultos de ambos os sexos com idade de 18 a 45 anos. O voluntário tem seu peso dentro de uma variação de 10%, de acordo com sua altura e estrutura óssea

### **Medicamentos Teste e Referência**

Besilato de Amlodipina (comprimido) 5 mg, Laboratório Teuto Brasileiro Ltda - teste  
Besilato de Amlodipina (comprimido) 5 mg - Norvasc®, Laboratórios Pfizer Ltda - referência

## **Posologia**

Os voluntários receberão em cada um dos períodos de internamento, por via oral em dose única, com um copo de água (200 mL), 5 mg de uma das formulações dos seguintes produtos: Besilato de Amlodipina (comprimido) 5 mg, - Laboratório Teuto Brasileiro Ltda; Besilato de Amlodipina (comprimido) 5 mg - Norvasc®, Laboratórios Pfizer Ltda.

## **Local e Forma de Confinamento dos Voluntários**

Os voluntários serão confinados na Clínica São Lucas, que possui uma unidade para ensaios clínicos. Esta unidade de ensaios clínicos dispõe de uma estrutura assistencial própria que consiste de 24 leitos, 01 posto de enfermagem, 01 copa, 01 sala de expurgo, 01 sala de limpeza, 01 sala para guarda de materiais destinados para ensaios clínicos e farmacoclinicos, além de toda infra-estrutura para internamento de voluntários. Sua estrutura laboratorial possui equipamentos para processamento e armazenamento de amostras biológicas.

Será solicitado ao voluntário que se apresente, para internamento, na Clínica São Lucas aproximadamente as 20:00 horas na noite anterior de cada período e que permaneça na Unidade 12 horas após a administração da medicação. Os voluntários terão assistência e cuidados especializados durante todo o período do estudo.

## **Seleção do Voluntário - Entrada do Voluntário no Estudo**

Os voluntários serão aceitos no estudo somente se eles forem considerados saudáveis como determinado pela história médica, exame físico e os exames laboratoriais que antecedem o início do estudo. Os voluntários realizarão eletrocardiograma (ECG), na avaliação inicial, pré-estudo, e após o último período de internamento.

Uma vez avaliada a higidez, os voluntários serão submetidos a uma entrevista livre para a avaliação da saúde mental, bem como condições emocionais para participar

da investigação, antes do início do estudo. Após isso, os voluntários terão esclarecidas todas as dúvidas restantes, e caso concordem, assinarão o termo de consentimento para participação no estudo.

### **Exames Laboratoriais**

Os seguintes exames laboratoriais serão realizados antes e após o estudo: análise hematológica: hemoglobina, hematócrito, contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de plaquetas; análise bioquímica: ureia, creatinina, bilirrubina total, proteína total, albumina, glicose em jejum, fosfatase alcalina, SGOT, SGTP, colesterol total, triglicérides, ácido úrico,  $\gamma$ GT; urina: sumário de urina (urina I); análise sorológica para: hepatite B, hepatite C e HIV, serão realizados somente antes do estudo. Teste de gravidez será realizado no pré estudo para os voluntários do sexo feminino.

### **Crítérios de Inclusão**

Os seguintes critérios devem ser satisfeitos para que o voluntário possa participar do estudo: a) Homem ou mulher que não esteja grávida, e tem de 18 a 45 anos de idade; b) O voluntário tem seu peso dentro de uma variação de 10%, de acordo com sua altura e estrutura óssea; c) Foi submetido a uma história clínica e exame físico, ECG, e exames laboratoriais complementares e considerado saudável; d) Concordou livremente e assinou o termo de consentimento, após todos os elementos essenciais do protocolo terem sido esclarecidos, antes de qualquer procedimento.

### **Crítérios de Exclusão**

Qualquer um dos seguintes critérios excluirá o voluntário do estudo: a) Os resultados dos exames laboratoriais complementares estão fora dos valores considerados normais ( $\pm 10\%$ ), a menos que sejam considerados clinicamente irrelevantes; b) O voluntário participou de qualquer estudo experimental ou ingeriu qualquer droga experimental dentre dos três meses do início deste estudo; c) Fez uso de medicação

regular dentro das 2 semanas que antecederam o início deste estudo, ou fez uso de qualquer medicação uma semana antes do início deste estudo; d) Foi internado por qualquer motivo até 8 semanas antes do início deste estudo; e) Tem história de abuso de álcool ou drogas, ou ingeriu bebidas alcoólicas nas 48 horas que antecedem o período de internação para iniciar o estudo; f) Tem história de doença hepática, renal, pulmonar, gastro-intestinal, epiléptica, hematológica ou psiquiátrica; tem hipo ou hipertensão de qualquer etiologia que necessite de tratamento farmacológico; tem história ou teve infarto do miocárdio, angina e/ou insuficiência cardíaca;g) O voluntário doou ou perdeu 450 ml ou mais de sangue dentre dos três meses que antecederam ao estudo;h) O voluntário é mulher com teste positivo para gravidez; i) O voluntário tem qualquer condição que o impede de participar do estudo pelo julgamento do investigador.

### **Restrições e proibições**

Todos os voluntários devem chegar a clínica São Lucas tendo feito uma refeição normal noturna (jantar). O início do ensaio clínico está previsto para 7 horas do dia seguinte.

Deverão permanecer em jejum a partir das 21:00 horas da noite do internamento até 03:00 horas após a ingestão da medicação, prevista para a manhã seguinte, quando uma refeição será servida. Líquidos serão permitidos *ad libitum* após as refeições, mas bebidas contendo xantinas (incluindo chá, café e cola) deverão ser evitadas.

Não será permitido fumar durante o período de internamento. Consumo de álcool deverá ser limitado durante o período de estudo e evitado completamente durante as 48 horas que antecedem cada dose.

Medicações concomitantes deverão ser evitadas, quando possível. Qualquer medicação, deverá ser registrada na folha apropriada.

### **Crítérios para retirada do estudo**

As seguintes condições devem ser consideradas como critérios de retirada do estudo: voluntário não deseja continuar no estudo por razões pessoais; efeitos adversos

da droga do estudo; voluntário não deseja continuar no estudo por razões outras que a ocorrência de eventos adversos da droga de estudo; por ex. indisponibilidade, intolerância aos procedimentos do estudo; testes laboratoriais anormais julgados de relevância clínica; doença intercorrente requerendo medicação.

## **Eventos Adversos**

É de responsabilidade do investigador clínico documentar todas as experiências adversas que ocorram durante o estudo.

Uma experiência adversa inclui qualquer alteração prejudicial, patológica ou indesejada nas funções anatómicas, físicas ou metabólicas conforme indicada pelos sinais físicos, sintomas e/ou alterações laboratoriais que ocorram em qualquer fase do estudo clínico associada ou não com o medicamento do estudo.

Todas as experiências adversas que ocorram após o início do estudo devem ser relatadas. Todas as experiências adversas subseqüentes, se não estiver sendo administrado nenhum medicamento (isto é, durante o período de “wash out”), devem ser registradas indiferentemente se são ou não consideradas relacionadas com o medicamento.

Qualquer evento adverso ocorrendo durante o período de estudo será registrado em detalhes na página apropriada para relato de evento adverso . As perguntas realizadas para saber se o voluntário teve algum evento adverso deverão ser limitadas a perguntas gerais, tais como: "Como você está ?"

Será solicitado aos voluntários que relate qualquer evento adverso e quando isto ocorreu. Será também solicitado que notifique ao investigador se foi necessário usar medicação adicional.

## **Procedimentos de Emergência**

O Hospital 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).

### **Avaliação da Causalidade**

Devem ser empreendidos todos os esforços pelo investigador clínico para explicar cada experiência adversa e avaliar sua relação, se houver, com o medicamento do estudo. Deve ser avaliada a causalidade usando as seguintes categorias: não relacionada, desconhecida, possível ou sim.

### **Avaliação do Voluntário**

Qualquer voluntário com evento adverso será seguido clinicamente e por estudos laboratoriais (quando indicados) até que os parâmetros voltem ao normal.

### **Pós Estudo**

Após três dias do final do estudo, os voluntários serão reavaliados clinicamente e por exames laboratoriais subsidiários realizados na fase pré-estudo.

### **Coleta de Sangue**

Após as 10 horas de jejum o ensaio terá início com uma coleta de sangue (8 mL) imediatamente antes da administração de 5 mg de uma das preparações de besilato de amlodipina, através de "butterfly" heparinizado introduzido em veia superficial do antebraço do voluntário, e outras coletas, aos seguintes intervalos a partir da administração: Zero; 1h; 2h; 4h; 6h; 8h; 10h; 12h; 14h; 24h; 48h; 96h; 120h e 144 após administração da droga.

No total serão coletadas 30 amostras de sangue, 14 em cada etapa, sendo 14 para dosagem plasmática de amlodipina e uma coleta de 25 ml para calibração do equipamento analítico. A coleta das amostras será feita através de cateter heparinizado

introduzido em veia superficial do antebraço do voluntário. Um total de aproximadamente 300 mL de sangue será coletado durante os dois períodos do estudo, incluindo o volume coletado para os exames pré e pós estudo. Após a coleta de cada amostra, o cateter será lavado com 2 mL de solução de heparina sódica (5IU/mL).

## Esquema do Estudo

### Período pré-estudo

|                    |                      |
|--------------------|----------------------|
| História Médica    | Eletrocardiograma    |
| Exame Físico Geral | Exames Laboratoriais |

### Períodos (1, 2)

| Tempo (h) | Atividades       | Outras atividades      |
|-----------|------------------|------------------------|
| 0:00      | Coleta de sangue | PA, pulso, temperatura |
| 1:00      | Coleta de sangue | PA, pulso, temperatura |
| 2:00      | Coleta de sangue | PA, pulso, temperatura |
| 4:00      | Coleta de sangue | PA, pulso, temperatura |
| 6:00      | Coleta de sangue | PA, pulso, temperatura |
| 8:00      | Coleta de sangue | PA, pulso, temperatura |
| 10:00     | Coleta de sangue | PA, pulso, temperatura |
| 12:00     | Coleta de sangue | PA, pulso, temperatura |
| 14:00     | Coleta de sangue | PA, pulso, temperatura |
| 24:00     | Coleta de sangue | PA, pulso, temperatura |
| 48:00     | Coleta de sangue | PA, pulso, temperatura |
| 96:00     | Coleta de sangue | PA, pulso, temperatura |
| 120       | Coleta de sangue | PA, pulso, temperatura |
| 144       | Coleta de sangue | PA, pulso, temperatura |

### Período Pós-Estudo

|                            |                      |
|----------------------------|----------------------|
| Exame Físico Geral FC e PA | Eletrocardiograma    |
|                            | Exames Laboratoriais |

Tabela 2: Esquema experimental

## Procedimentos para manipulação das amostras.

O tempo atual de coleta de sangue será registrada usando um relógio de 24 horas. O sangue será centrifugado, o plasma retirado será armazenado em frasco

adequado a temperatura de (-20 °C) até a sua utilização. Os frascos com plasma serão identificados com o número do voluntário, iniciais, nome do medicamento, período e data do estudo.

### **Amostras de Retenção - Inventário**

Serão mantidas em local próprio, amostras de retenção tanto da formulação teste quanto da formulação referência. Essas amostras serão mantidas até o prazo de validade especificado na embalagem do produto.

Será realizado um inventário dos medicamentos teste e referência em local específico para este fim.

## **Aspectos Éticos**

### **Comitê de Ética em Pesquisa**

O projeto de pesquisa, com o protocolo experimental e o termo de consentimento, serão submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP, credenciado pelo CONEP - Conselho Nacional de Saúde/MS. Qualquer mudança no protocolo, será necessário a aprovação do Comitê.

O Estudo será conduzido de acordo com a Declaração de Helsinki (1965) e as revisões de Tokyo (1975), Venice (1983) e África do Sul (1996), e a Resolução 196/96 e 251/97 do CNS-MS.

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Os voluntários receberão uma explanação da natureza e dos objetivos do estudo. Será enfatizado que o estudo tem a finalidade de pesquisa, e que o voluntário não poderá esperar que haja qualquer efeito terapêutico. O voluntário também entenderá que ele/ela é livre para se retirar a qualquer momento do estudo sem que isto vá causar qualquer prejuízo no seu atendimento junto a Synchrophar.

Será solicitado a cada voluntário que, caso concorde, assine o termo de consentimento para participar no estudo.

### **Confidenciabilidade**

Os resultados do exame médico e testes laboratoriais serão registrados na folha individual do voluntário. Toda a informação obtida durante o estudo referente ao estado de saúde do voluntário estará disponível aos médicos do Hospital Universitário. Uma cópia dos exames laboratoriais realizados no pré e pós estudos poderá ser fornecida aos voluntários.

## **Etapa Analítica e Estatística**

Os critérios para realização desta etapa são determinados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária

### **Validação da Metodologia Analítica**

A determinação da adequabilidade e confiabilidade de um método analítico para a realização de um estudo de bioequivalência, é realizada através da averiguação de sua sensibilidade, especificidade, linearidade, acurácia, precisão e reprodutibilidade, levando-se ainda em conta a estabilidade dos compostos que estão sendo empregados. Para esta certificação utilizam-se os seguintes parâmetros e respectivos limites de aceitação:

*Especificidade:* Busca-se a presença de interferência, utilizando-se o procedimento proposto para a extração de amostras. São utilizados 4 plasmas de diferentes indivíduos colhidos em jejum, 1 plasma hiperlipêmico e 1 plasma hemolizado. A especificidade é comprovada pela determinação de inexistência de interferência significativa, no tempo de retenção da droga, metabólitos ou padrão interno, comparando-se visualmente os cromatogramas obtidos com aquele produzido pela análise de uma solução aquosa do fármaco em análise em concentração próxima ao Limite de Quantificação;

*Sensibilidade:* É avaliada através do Limite de Quantificação (LOQ), de forma a considerar não somente a sensibilidade em si, mas também em função dos critérios de precisão e acurácia do método. O LOQ é aprovado se forem satisfeitos os seguintes critérios: a) Inexistência de interferência ou resposta 5 vezes maior que qualquer interferência existente em brancos nos tempos de retenção em uso; b) Pico do analito identificável, claro, discreto com uma precisão de 20%, calculada através do coeficiente de variabilidade do valor quantificado para 5 aliquotas provenientes de um mesmo controle padrão, bem como da correspondente duplicata da curva de calibração em uso. c) Acurácia de 80% a 120% em relação ao valor nominal da concentração do controle padrão utilizado, bem como da correspondente duplicata da curva de calibração em uso.

*Linearidade:* É avaliada em função da linearidade da curva de calibração empregada. E esta, é aprovada se forem satisfeitos os seguintes critérios: a) Pelo menos 4 de 6 padrões de cada concentração nominal, incluindo o padrão correspondente ao LOQ e o padrão de maior concentração, com desvio menor do que 15% da concentração nominal em pelo menos uma das duplicatas; b) Coeficiente de correlação da curva igual ou maior que 0.98.

*Precisão e Acurácia:* São avaliadas a partir da quantificação de pelo menos 3 concentrações padrão distintas (controles de qualidade QCA, QCB, QCC), determinadas em função da faixa de concentrações esperadas, tomando-se como base 5 alíquotas de cada concentração quantificadas durante uma única corrida analítica (precisão e acurácia intra-lote).

*Reprodutibilidade:* A avaliação se dá a partir da determinação da precisão e acurácia de 3 lotes provenientes de matrizes biológicas distintas (precisão e acurácia inter-lote)

A estabilidade dos compostos é determinada em função do tempo necessário para preparação das amostras e respectiva quantificação, bem como das temperaturas de armazenamento usualmente empregadas. Para sua realização são utilizadas duas concentrações distintas da droga a ser dosada, cujas amostras são submetidas aos seguintes testes: a) Estabilidade no autosampler: Determina a estabilidade da droga e do padrão interno em fase móvel, na temperatura encontrada no autosampler, por período de tempo igual ou superior a uma corrida analítica; b) Congelamento e descongelamento: Determina a estabilidade da droga em plasma após 3 ciclos de congelamento por 24 horas e descongelamento em temperatura ambiente; c) Estabilidade de curto período em temperatura ambiente: Determina a estabilidade da droga em plasma em temperatura ambiente, por período de tempo igual ou superior ao necessário para o preparo de amostras para uma corrida analítica; d) Estabilidade de longo período: Determina a estabilidade da droga em plasma na temperatura de congelamento das amostras, por período de tempo igual ou superior ao primeiro dia de coleta de amostras e o dia da análise da última amostra; e) Estabilidade das soluções de trabalho: Determina a estabilidade da droga e do padrão interno a partir das soluções de

trabalho preparadas, na temperatura em que são armazenadas, e por período de tempo equivalente à sua utilização durante a condução do estudo.

### **Análise Estatística**

De acordo com as Agências Reguladoras, os parâmetros AUC e Cmax deverão ser analisados como as razões dos logaritmos individuais transformados das drogas teste/referência. Tmax será analisados como diferença individual: Teste - Referência. Ambos testes paramétricos e não paramétricos serão aplicados para análise das variáveis.

## **Materiais e Reagentes**

### **Produtos Teste e Referência**

| Nome               | Produto a ser testado                | Produto de referência    |
|--------------------|--------------------------------------|--------------------------|
|                    | Amlodipina                           | Norvasc ®                |
| Ativo Farmacêutico | Besilato de amlodipina               | Besilato de amlodipina   |
| Forma Farmacêutica | Comprimido                           | Comprimido               |
| Número de Lote     | 0427007                              | 004-05026G               |
| Concentração       | 5 mg                                 | 5 mg                     |
| Validade           | 06/2003                              | 09/2003                  |
| Fabricante         | Laboratório Teuto Brasileiro<br>Ltda | Laboratórios Pfizer Ltda |

Tabela 3. Descrição dos produtos teste e referência a serem analisados

## Padrões e Reagentes

| Substância   | Fornecedor  |
|--|---|
| Desipramina – Padrão interno<br>Amlodipina - Análise                               | Sigma – USA   |
| Reagentes  | Fornecedor  |
| Acetonitrila - HPLC  | Nuclear – Brasil  |
| Dietil-éter - análise  | Jand Química Ind. & Com. Ltda. Brasil   |
| Solução de amônia - análise  | Synth - Brasil  |
| Ácido Fórmico - análise  | Mallinckrodt – USA  |
| Carbonato de sódio - análise   | Mallinckrodt - USA  |
| Bicarbonato de sódio - análise   | Mallinckrodt - USA  |
| Ácido acético glacial - análise  | Química Moura - Brasil  |
| nHexano - HPLC   | Quimex - Brasil   |
| Metil - álcool - análise   | J. T. Baker - Brasil  |
| Água purificada – sistemas Mili-Q<br>ou Elga UHQ                                   | High Wycombe – Bucks – UK   |
| Plasma humano – preparação das<br>curvas de calibração e controles de<br>qualidade | Banco de Sangue do Hospital<br>Universitário da Universidade de São<br>Paulo - Brasil |

Tabela 4. Relação dos reagentes a serem utilizados

## Equipamentos

Pipetas ajustáveis – 100,200 e 1000µL

Vórtex mixer – Fisher Vortex Genie 2

Ponteiras de plástico – LabTips- 5 a 200 µL e de 200 a 1000 µL

Coluna analítica 4 mcm – 150 x 4,6 mm de diâmetro interno - Genesis C18

Pré-coluna 4mcm – 10x4 mm de diâmetro interno – Waters X-Terra C8 1.0x4.6 mm diâmetro interno

Tubos de teste de vidro – descartáveis – 120x11 mm

Pipetas “Pasteur”- 5,75” ou capilares – 9”

Tubos “Eppendorf”

Vials de vidro – autosampler- 1,1 CTVG e tampas

Potenciômetro Quims - Q400P

Centrifuga múltiplas velocidades, refrigerada – GPS

Sistema HPLC – LC-10AD e auto injetor – MXY01-01B

Espectrômetro de massa – Quattro Ultima

MassLynx – software de análise versão 3.5

Tabela 5. Relação dos equipamentos empregados.

## Preparo das Soluções Padrão de Amlodipina

| Concentração Final |             | Volume e Concentração da solução fonte |                     | Volume de diluente | Volume total | Fator de correção |
|--------------------|-------------|--|---------------------|--------------------|--------------|-------------------|
| A                  | 100.0 µg/mL | 1.0mL                                  | Da master -1.0mg/mL | 9.0                | 10           | 10                |
| B                  | 10.0 µg/mL  | 1.0 mL                                 | De A -100.0µg/mL    | 9.0                | 10           | 10                |
| C                  | 1.0 µg/mL   | 1.0 mL                                 | De B -10.0µg/mL     | 9.0                | 10           | 10                |
| D                  | 200 ng/mL   | 2.0 mL                                 | De C - 1.0µg/mL     | 8.0                | 10           | 5                 |
| E                  | 150 ng/mL   | 1.67 mL                                | De C - 1.0µg/mL     | 8.33               | 10           | 6.667             |
| F                  | 100 ng/mL   | 1.0 mL                                 | De C - 1.0µg/mL     | 9.0                | 10           | 10                |
| G                  | 50 ng/mL    | 0.5 mL                                 | De C - 1.0µg/mL     | 9.5                | 10           | 20                |
| H                  | 20 ng/mL    | 1.0 mL                                 | De D -200ng/mL      | 9.0                | 10           | 10                |
| I                  | 10 ng/mL    | 1.0 mL                                 | De F- 100 ng/mL     | 9.0                | 10           | 10                |
| J                  | 5 ng/mL     | 1.0 mL                                 | De G - 50 ng/mL     | 9.0                | 10           | 10                |
| K                  | 3 ng/mL     | 3.33 mL                                | De I - 10 ng/mL     | 6.67               | 10           | 3.33              |
| L                  | 2 ng/mL     | 1.0 mL                                 | De C - 10 ng/mL     | 9.0                | 10           | 10                |
| M                  | 1 ng/mL     | 1.0 mL                                 | De C - 10 ng/mL     | 9.0                | 10           | 10                |

Tabela 6. Preparo das soluções padrão de Amlodipina

## Preparo das Soluções Padrão de Desipramina

Pesou-se 50 mg de desipramina para um volume total de 50 mL de solução de metanol/ água (50:50 v/v), obtendo-se concentração de 1.00 mg/mL.

## Preparo da Solução da Fase Móvel : 60% CH<sub>3</sub>CN, 40% H<sub>2</sub>O + 10 mM ácido fórmico

Preparou-se uma solução de ácido fórmico pipetando-se 0.460 mL de ácido fórmico em uma proveta contendo 400 mL de água e acetonitrila (600 mL). Misturou-

se cuidadosamente a solução. O preparo deve ser feito em capela para exaustão de vapores.

### **Preparo da Solução Tampão de Carbonato**

Preparou-se 1 M de solução de carbonato pela dissolução de 106 g de carbonato de sódio em água até 1 L. Preparou-se uma solução de bicarbonato a 1 M pela dissolução de 84 g de bicarbonato de sódio em água até um volume de 1 L. Misturou-se 40.5 mL da solução de bicarbonato com 9.5 mL da solução de carbonato em um frasco volumétrico de 200 mL. Completou-se o volume com água, misturando-se cuidadosamente.

### **Preparo da Solução de Acetonitrila a 20% + 10mM de ácido fórmico**

Pipetou-se 0.460 mL de ácido fórmico em uma proveta de capacidade para 100 mL, contendo 800 mL de água e 200 mL de acetonitrila. A solução foi cuidadosamente homogeneizada em capela para exaustão de vapores

### **Preparo da Solução de Éter dietílico/Hexano (80:20)**

Foram adicionados 20 mL de hexano em 80 mL de éter dietílico em proveta de 100 mL.

### **Preparo das Curvas de Calibração e Controles de Qualidade**

As soluções estoque de amlodipina foram preparadas em duplicata em metanol-água (50:50 v/v) em concentração de 1 mg/mL. Pesou-se 50 mg de amlodipina para um volume total de 50 mL de solução. Essa solução foi diluída em plasma branco humano para se obter as seguintes concentrações: 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, and 20.0 ng/mL.

As amostras para controle de qualidade foram preparadas em plasma branco humano para se obter as seguintes concentrações:

0.3, 2.0 e 15.0 ng/mL (QCA, QCB, e QCC, respectivamente independente das curvas de calibração.

### **Preparo das Amostras Sangüíneas**

Após as 10 horas de jejum coletou-se uma amostra de sangue (8 mL) imediatamente antes da administração de 5mg de uma das preparações de besilato de amlodipina, através de "butterfly" heparinizado introduzido em veia superficial do antebraço do voluntário, e outras coletas, aos seguintes intervalos a partir da administração: Zero; 1h; 2h; 4h; 6h; 8h; 10h; 12h; 14h; 24h; 48h; 96h; 120h e 144 após administração do fármaco.

As amostras foram acondicionadas em tubos de vidro contendo anticoagulante e centrifugadas a 2500 g por 10 minutos em temperatura ambiente. O plasma foi decantado, removido e armazenado a -20 °C até a análise.

### **Análise do Fármaco nas Amostras**

Todo plasma humano congelado foi previamente descongelado em temperatura ambiente e centrifugado a 2000 g por 5 minutos a 4 °C para precipitação dos sólidos. 300 µL da solução do padrão interno – desipramina 5 ng/mL em tampão carbonato pH 9.0 - foi adicionado a 300 µL da alíquota da amostra de plasma.

A mistura foi encaminhada para o "vortex-mix" por aproximadamente 10 segundos, e os compostos de interesse foram extraídos com 4 mL de dietil-éter/hexano (80:20 v/v). A mistura foi novamente levada ao "vortex-mix" durante 40 segundos e a fase orgânica foi evaporada sob fluxo de N<sub>2</sub> a 37 °C. Os resíduos secos foram reconstituídos com 100 µL da fase móvel ( 60% CH<sub>3</sub>CN; 40% H<sub>2</sub>O; + 10 mM ácido fórmico) . A nova solução foi transferida para *vials* que foram fechados e colocados em bandejas do *autosampler* .

## Condições Cromatográficas

A temperatura do injetor automático foi mantida a 40°C e uma alíquota (30 µL) de cada extração do plasma foi injetado no sistema. Os compostos foram eluídos pelo *pumping* da fase móvel com fluxo de 0.4 mL/min. A pressão do sistema esteve entre 35 – 45 bar e o tempo de corrida total foi de 6.5 min.

Um *split* do eluante da coluna de aproximadamente 1:10 foi incluído de forma que apenas 40 µL/min entrasse no espectrômetro de massa. A temperatura do *autosampler* foi mantida entre 22 - 25 °C.

## Condições da Espectrometria de Massa

Para ambas, amlodipina e desipramina, a voltagem do capilar, o tempo de permanência, a energia do cone e a pressão do gás (argônio) foram 3.5 kV, 0.5 s, 10 V e  $7.4 \times 10^{-4}$  mbar, respectivamente.

A energia de colisão foi 10 eV para amlodipina e 15 eV para seu padrão interno.

## Estabilidade

A estabilidade das amostras do plasma do controle de qualidade foram submetidas a testes de estabilidade e as concentrações de amlodipina foram mensuradas e comparadas com as amostras frescas preparadas. A significância dos resultados obtidos foi analisada pelo *Student's t-test* ( $p > 0.05$ ).

## Farmacocinética

A constante de eliminação de primeira ordem ( $K_e$ ) foi estimada pela regressão linear dos pontos da fase de eliminação em gráfico linear-log. A meia vida de eliminação ( $t_{1/2}$ ) foi obtida pela equação  $t_{1/2} = \ln(2)/k_e$ , onde  $\ln$  é o logaritmo neperiano. A concentração plasmática máxima ( $C_{max}$ ) e o respectivo tempo para atingir esta

concentração ( $T_{max}$ ) foram obtidos diretamente das curvas. As áreas sob a curva da concentração plasmática em relação ao tempo, de zero até a última concentração detectada ( $ASC_{0-t}$ ) foram calculadas pela aplicação da regra trapezoidal. Extrapolação dessas áreas para o infinito ( $ASC_{0-inf}$ ) foi feita pela adição do valor de  $C_t/k_e$  às  $ASC_{0-t}$  calculadas, onde  $C_t$  é a última concentração plasmática do fármaco detectada após a administração deste.

## RESULTADOS

O estudo foi realizado com vinte e quatro voluntários sadios de ambos os sexos, sendo 12 homens e 12 mulheres, considerados sadios através de exames médicos e laboratoriais. As amostras de sangue foram colhidas previamente à administração e até 144 horas após, em intervalos pré-determinados. Um total de 672 amostras foram submetidas à quantificação.

### Resultados clínicos:

Ambas formulações foram bem toleradas pelos voluntários na dose administrada. Apenas 7 voluntários, 4 homens e 3 mulheres, queixaram-se de dores de cabeça e uma voluntária queixou-se de dor de estômago. Nenhuma alteração significativa dos parâmetros bioquímicos foi observada.

### Resultados analíticos quanto à espectrometria de massa:

Os espectros de massa totais da amlodipina e desipramina mostraram moléculas precursoras protonadas,  $[M-H]^+$ , de  $m/z$  409 e 267, respectivamente. O íon produto mais abundante no espectro foi  $m/z$  238 para amlodipina e para a desipramina o íon mais abundante resultante da fragmentação foi  $m/z = 72$ . As estruturas propostas para os íons produtos podem ser vistas na figura 13 e os espectros de massa podem ser visualizados através do gráfico 3 A, 3B e 3C.

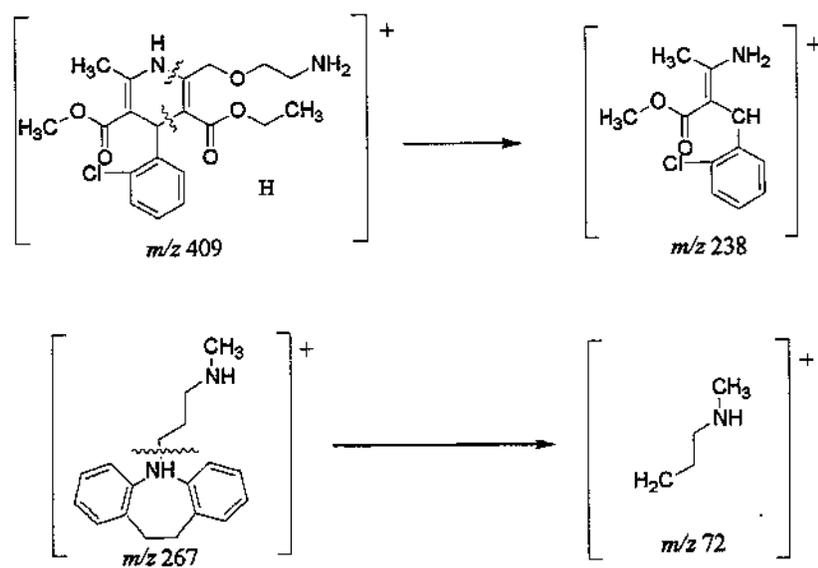


Figura 13. Rota proposta para a dissociação da amlodipina e da desipramina durante o processo de fragmentação induzida por colisão

Nenhum pico foi observado no espectrograma do plasma humano branco sob as condições de LC-MS-MS descritas anteriormente (gráfico 1 e gráfico 2). Os espectrogramas das amostras são mostrados no gráfico 5, onde pode ser observado o tempo de retenção para amlodipina e desipramina de 3.6 e 3.9 min. respectivamente.

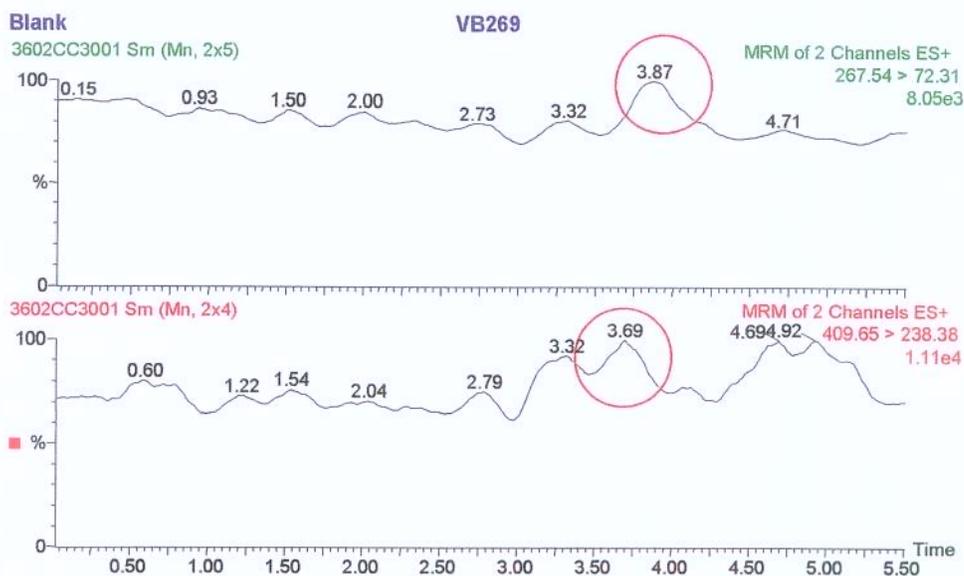


Gráfico 1: Espectrograma MRM branco. Demonstra a especificidade do método uma vez, que não há qualquer sinal significativo de interferente presente próximo ao tempo de retenção do padrão interno e do analito (círculos vermelhos) respectivamente.

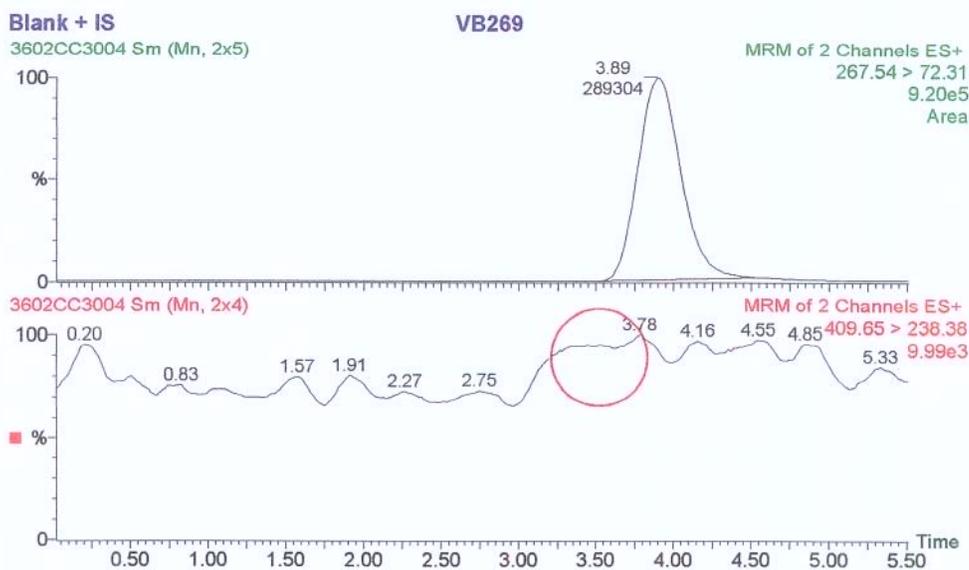


Gráfico 2. Espectrogramas padrões para zero (plasma branco + Desipramina). Mesmo após a adição do padrão interno ao plasma branco não houve qualquer alteração quanto ao espectrograma, ficando o canal do analito inalterado (círculo vermelho) ou seja, o padrão interno não interfere na quantificação da amlodipina nas amostras de plasma.

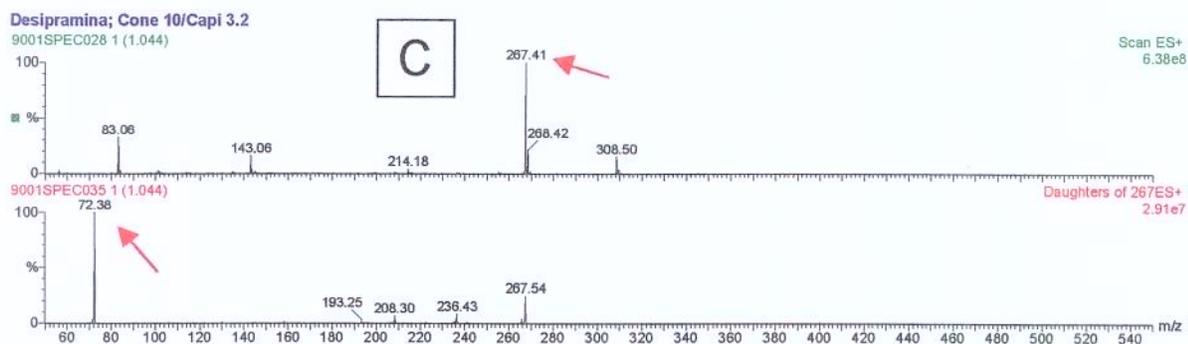
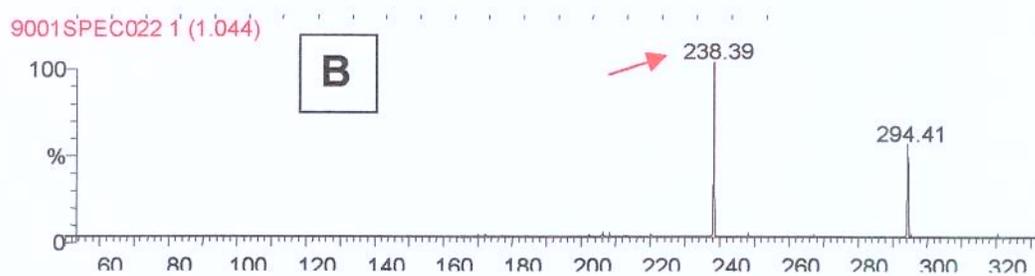
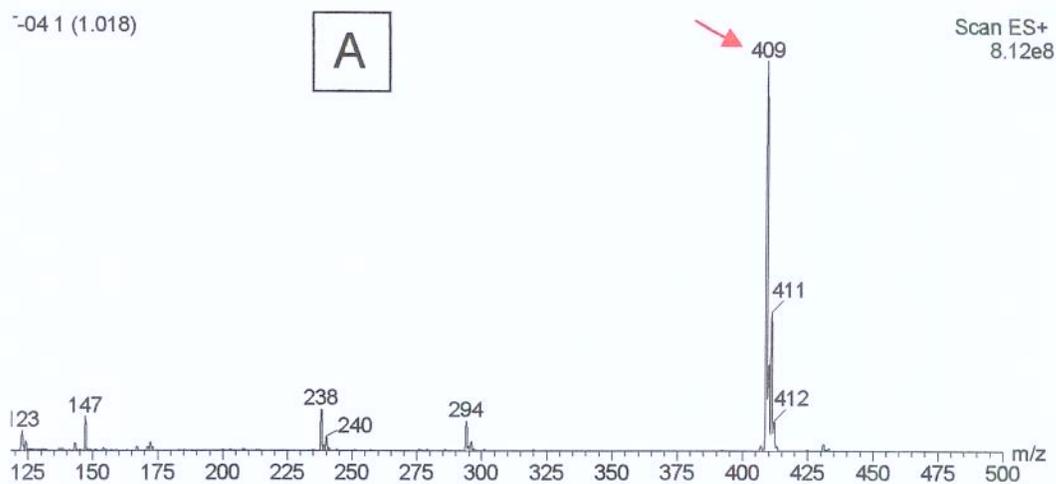


Gráfico 3(A,B,C). Espectros de massa amlodipina: 3 A (ion precursor) e 3B (ion produto) e desipramina: 3C. Os espectros de massa totais da amlodipina e desipramina mostraram moléculas precursoras protonadas,  $[M-H]^+$ , de  $m/z$  409 e 267, respectivamente. O ion produto mais abundante no espectro foi  $m/z$  238 para amlodipina e para a desipramina o ion mais abundante resultante da fragmentação foi  $m/z = 72$  (setas vermelhas)

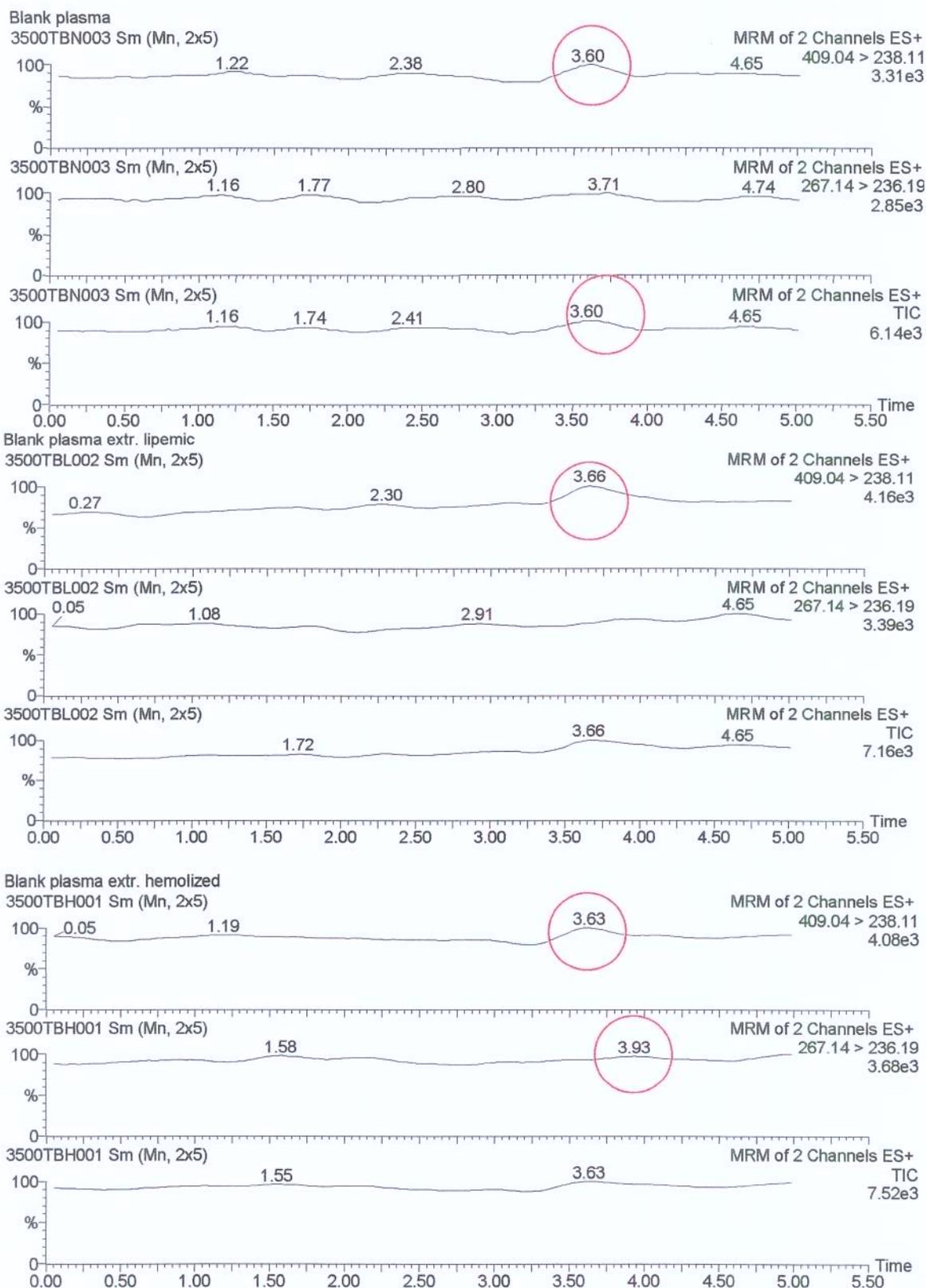
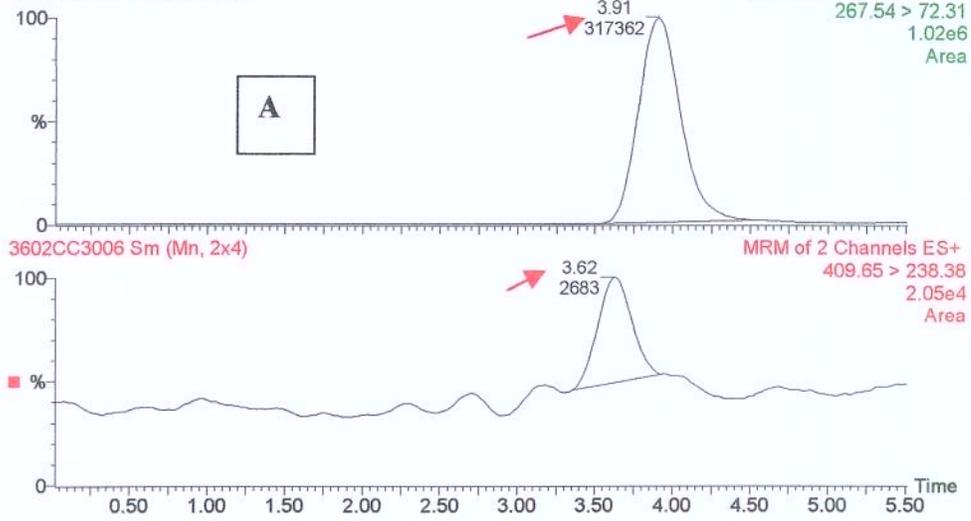


Gráfico 4. Espectrogramas Plasma branco normal, lipêmico e hemolizado. através deste gráfico se percebe a ausência de interferentes em relação ao tempo de retenção do analito e seu padrão interno (círculos vermelhos), nas diversas situações de plasma que podem aparecer durante o estudo.

**Amlodipina 0,1ng/ml in plasma**

**VB269**

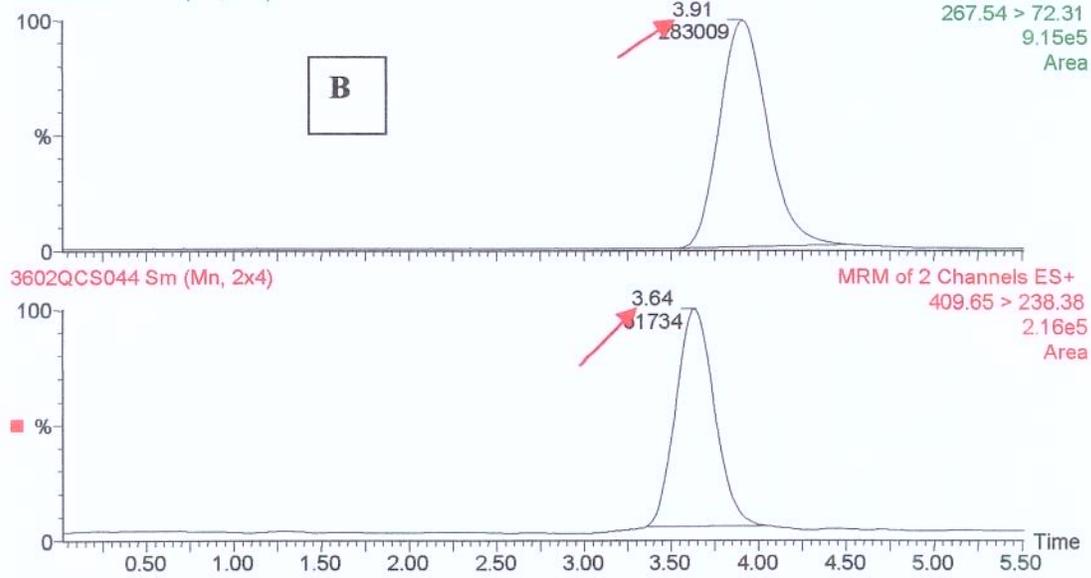
3602CC3006 Sm (Mn, 2x4)



**2.00 ng/ml**

**VB269**

3602QCS044 Sm (Mn, 2x5)



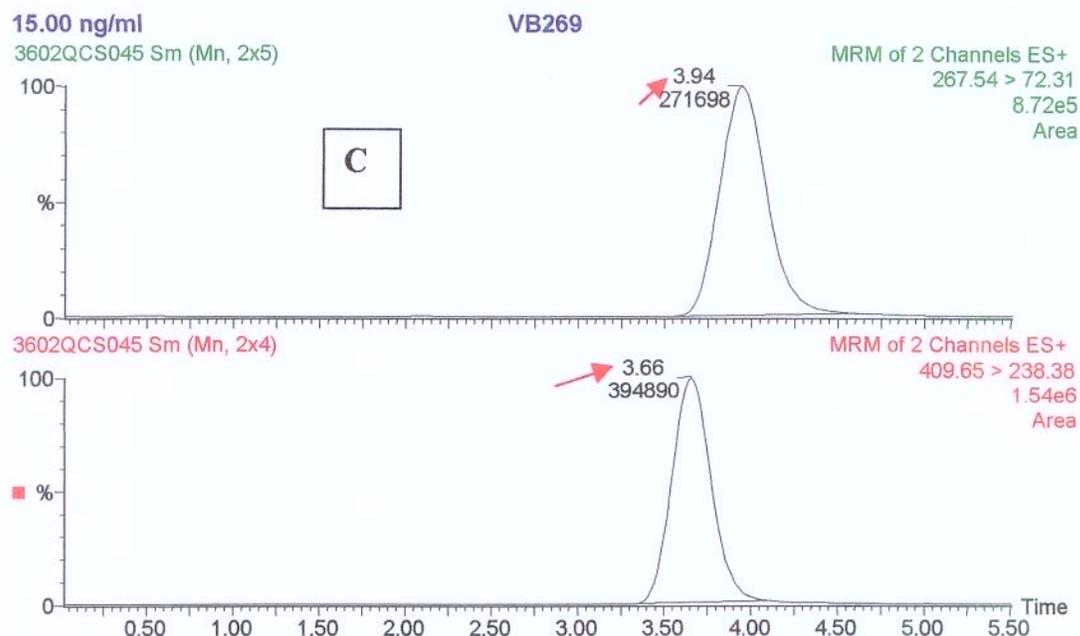


Gráfico 5(A,B,C) : Espectrogramas analito com padrão interno nas concentrações 0,1ng/ml; 2,0ng/ml e 15ng/ml. Variando-se as concentrações do analito, os resultados permanecem inalterados quanto ao tempo de retenção do analito(RT= 3.6) e do seu padrão interno, desipramina (RT= 3.9), caracterizando-se a boa reprodutibilidade do método.

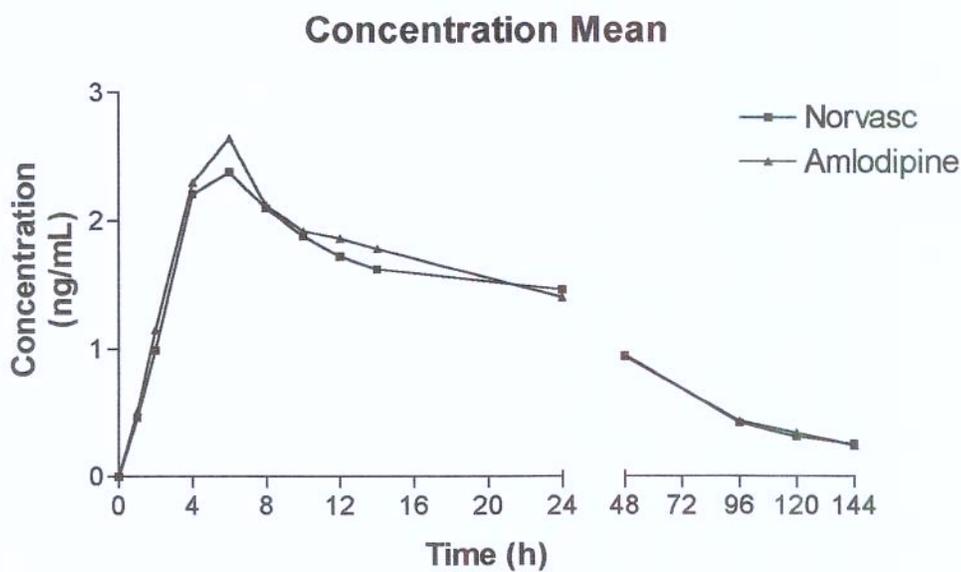


Gráfico 6: Curva Concentração Plasmática vs Tempo.

A curva de calibração mostrou boa linearidade com 0.1 – 20ng/mL de amlodipina, onde o coeficiente de correlação médio ( r ) foi maior que 0.998.

A precisão e a acurácia dos controles de qualidade podem ser observados nas tabelas 7 e 8.

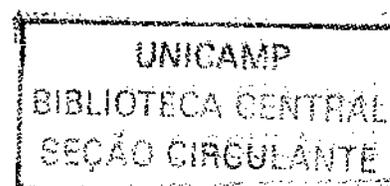
O limite inferior de quantificação (LOQ) foi de 0,1 ng/ml para a amlodipina.

| Amostra                           | QL1   | QL2   | QCA   | QCB   | QCC   |
|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Intra-ensaio                      |       |       |       |       |       |
| Concentração nominal(ng/ml)       | 0,1   | 0,2   | 0,3   | 20    | 15,0  |
| Média                             | 0,103 | 0,174 | 0,302 | 2,04  | 15,4  |
| Desvio padrão                     | 0,008 | 0,018 | 0,018 | 0,062 | 0,062 |
| Coefficiente de variação (CV) (%) | 7,9   | 9,1   | 6,1   | 3,1   | 3,7   |
| Acurácia (%)                      | 103,4 | 86,9  | 100,6 | 102,2 | 102,8 |

Tabela 7. Acurácia e precisão intra lote

| LOQ/CQ | Concentração média (ng/ml) |         |         | Inter-ensaio precisão e acurácia |       |          |               |
|--------|----------------------------|---------|---------|----------------------------------|-------|----------|---------------|
|        | ensaio1                    | ensaio2 | ensaio3 | média                            | CV(%) | acurácia | Desvio padrão |
| QL1    | 0,105                      | 0,113   | 0,108   | 0,109                            | 3,6   | 108,8    | 0,004         |
| QL2    | 0,174                      | 0,191   | 0,183   | 0,183                            | 4,7   | 91,3     | 0,009         |
| QCA    | 0,302                      | 0,295   | 0,299   | 0,299                            | 1,1   | 99,5     | 0,004         |
| QCB    | 2,04                       | 2,02    | 1,76    | 1,940                            | 8,0   | 97,0     | 0,156         |
| QCC    | 15,4                       | 15,2    | 13,3    | 14,600                           | 8,1   | 97,6     | 1,159         |

Tabela 8. Acurácia e precisão inter lote.



A recuperação da amlodipina pode ser verificada através da tabela 9.

|             | Concentração da amostra | Extraída | Não extraída | Recuperação % | CV % |
|-------------|-------------------------|----------|--------------|---------------|------|
|             | ng/ml                   |          |              |               |      |
| Amlodipina  | 0.3                     | 6777     | 7377         | 91.9          | 7.9  |
|             | 2.0                     | 41510    | 44107        | 94.1          | 10.9 |
|             | 15.0                    | 293967   | 353739       | 83.1          | 6.5  |
| Desipramina | 3.0                     | 38361    | 45707        | 83.9          | 7.2  |

Tabela 9. Recuperação da amlodipina .n=5

A análise da estabilidade foi desenvolvida com amostras do controle de qualidade nas concentrações 1,0 ng/ml e 10,0 ng/ml. Não foi observada nenhuma degradação das amostras significante.

A tabela 10 mostra parâmetros farmacocinéticos médios obtidos de 24 voluntários após administração de 5mg de amlodipina em comprimido.

A análise estatística dos parâmetros de bioequivalência e seus intervalos de confiança estão descritos na tabela 11. Enquanto que a curva da concentração plasmática média de amlodipina vs tempo é mostrada no gráfico 6.

|   | Amlodipina |               |                  |               |
|---|------------|---------------|------------------|---------------|
|   | Norvasc®   |               | Amlodipina teste |               |
|   | Média      | Desvio padrão | Média            | Desvio padrão |
| AUC <sub>last</sub> ([ng*h)/mL)           | 114.0      | 34.7          | 113.9            | 34.8          |
| AUC <sub>inf</sub>                        | 133.2      | 55.8          | 131.7            | 46.6          |
| AUC <sub>all</sub> (0-144h) ([ng * h)/mL) | 116.7      | 34.7          | 116.5            | 35.0          |
| C <sub>max</sub> (ng/mL)                  | 2.6        | 0.6           | 2.8              | 0.9           |
| T <sub>1/2</sub> (h)                      | 46.6       | 12.0          | 46.7             | 11.9          |
| T <sub>max</sub> (h) – média              | 6.0        | (4.0 - 24.0)  | 6.0              | (4.0 - 12.0)  |

Tabela 10. Parâmetros Farmacocinéticos

| Amlodipina /<br>Norvasc®            | Parâmetros Geométricos |        |       | Parâmetros Não Geométricos |        |       |
|-------------------------------------|------------------------|--------|-------|----------------------------|--------|-------|
|                                     | Média                  | 90% IC |       | Média                      | 90% IC |       |
| AUC <sub>last</sub> % razão         | 99.5                   | 93.6   | 105.7 | 99.8                       | 92.7   | 106.7 |
| AUC <sub>inf</sub> % razão          | 99.2                   | 92.6   | 106.3 | 100.0                      | 92.9   | 106.0 |
| AUC <sub>all</sub> (0-144h) % razão | 99.5                   | 93.5   | 105.8 | 100.6                      | 92.6   | 107.3 |
| C <sub>max</sub> % razão            | 106.8                  | 100.0  | 114.0 | 105.8                      | 100.2  | 111.8 |

Tabela 11. Parâmetros Estatísticos

## DISCUSSÃO

Ao compararmos todos os métodos descritos anteriormente para a determinação de amlodipina em fluidos biológicos, pode-se notar que o método analítico escolhido no corrente estudo, foi adequado uma vez ter apresentado bons resultados em relação à especificidade, acurácia e tempo de retenção. YASUDA et al. (1996) concluiu que a cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa torna-se o método que apresenta maior vantagem em relação a outros, como o que utiliza o sistema amperométrico para a detecção, uma vez que neste último é difícil se manter toda a instrumentação eletricamente estável, ou ainda no caso da cromatografia gasosa com detecção por eletro-captura onde há problemas com estabilidade térmica e derivação das amostras. Percebe-se ainda que, os métodos utilizando detecção amperométrica, eletroforese, ultra-violeta ou mesmo cromatografia gasosa obtiveram tempos de retenção muito longos, variando de 8,5 min. a 40 min., tornando assim a análise muito longa, principalmente se pensarmos na utilização de uma bateria de aproximadamente 600 amostras a serem analisadas, que foi o caso deste estudo.

Quanto aos espectros de massa totais da amlodipina e desipramina, estes coincidem com os resultados obtidos por YASUDA et al.(1996) sendo que o íon produto mais abundante no espectro para a amlodipina, conforme pode ser visto no gráfico 3B, foi obtido por um mecanismo pouco comum de fragmentação. Para a desipramina, foi observado o íon produto mais abundante  $m/z = 72$ , como demonstrado através do gráfico 3C. CARVALHO et al.(2001) descreveu uma outra rota para a mesma fragmentação da desipramina, onde o íon mais abundante apresentou  $m/z = 236$ .

O gráfico 5 demonstra a boa reprodutibilidade do método, pois mesmo se variando as concentrações do analito, os resultados permanecem inalterados quanto a caracterização do tempo de retenção do analito e do seu padrão interno, desipramina.

A relação concentração plasmática vs tempo, traduzida através do gráfico 6, mostra as  $C_{max}$  Teste e Referência como sendo equivalentes (após cálculo do IC).

Quanto aos parâmetros que definem a bioequivalência entre dois medicamentos,  $C_{max}$  e  $T_{max}$ , os valores foram similares àqueles relatados por YASUDA et al (1996) e CARVALHO et al (2001).

Em relação à tolerância da amlodipina, sabe-se que a relação dos sintomas apresentados pelos voluntários com o fármaco é desconhecida. Geralmente, esses sintomas relatados estão mais associados ao período de jejum que os voluntários são submetidos.

## CONCLUSÃO

Considerando-se os resultados obtidos e os critérios que asseguram a bioequivalência entre dois medicamentos, pode-se concluir que a formulação teste de amlodipina é bioequivalente à formulação referência quanto a taxa e extensão da absorção.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERNETHY, D. R. et al. Effects of amlodipine a long acting dihydropyridine calcium antagonist in ageing hypertension: pharmacodynamics in relation to disposition. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, 48: 76-86, 1990.

ARROW, J.E. et al. Long-acting dihydropyridine calcium antagonists. 1,2-Alkoxyethyl derivatives incorporating basic substituents. **J Med Chem**, 29:1696-1702, 1986.

ASMS. American Society for Mass Spectrometry. Disponível em <http://www.asms.org> . Acesso em 15 de março de 2004.

BAEZ, M.A., WEIDLER, J.D. Antihypertensive effect of amlodipine in hypertensive patients. **J Hypertens**, 4:S458, 1986.

BLOOD, Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration. Effects of ACE inhibitors, calcium antagonists, and other blood-pressure-lowering drugs: results of prospectively designed overviews of randomised trials. **Lancet**, 355: 1955-64, 2000.

BURGES, R.A. et al. Amlodipine, a new dihydropyridine calcium channel blocker with slow onset and long duration of action. **Br J Pharmacol**, 85:281P, 1985.

BURGES, R.A. et al. Calcium channel blocking properties of amlodipine in vascular smooth muscle and cardiac muscle in vitro: evidence of voltage modulation of vascular dihydropyridine receptors. **J Cardiovasc Pharmacol**, 9:110-119, 1987.

CARVALHO, M. et al. Amlodipine bioequivalence study: quantification by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Biopharm Drug Dispos**, 22:383-390, 2001.

CATTERALL, W. A. Structure and function of voltage sensitive ion channels. **Science**, 242: 50-61, 1988. [[Medline](#)]

CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA DO ESTADO DE SÃO PAULO /  
CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA DO ESTADO DE SÃO PAULO.  
**Medicamentos Genéricos. Informações para Médicos, Farmacêuticos e Profissionais de Saúde.** São Paulo, 2001.

DEGANI, A . L. G. et al. **Cromatografia: Um breve ensaio.** Química Nova na Escola: 1997. P.21-25. v . 7

ELLIOTT, H. L. et al. A comparison of the disposition of single oral doses of amlodipine in young and elderly subjects. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, 12 : S64-S66,1988.

FAULKNER, J.K. et al. The pharmacokinetics of amlodipine in healthy volunteers after single intravenous and oral dose and after 14 repeated oral doses given once daily. **Br J Clin pharmacol**, 22:21-25,1986.

FIECKENSTEIN, A. **Calcium antagonism in heart and smooth muscle.** New York: John Wiley & Sons, 1983.

GODFRAIND, T.; MILLER, R.; WIBO, M. Calcium antagonism and calcium entry blockade. **Pharmacol Rev**, 38: 321-416, 1986.

GOODMAN et al.. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** Tradução de Ed. Guanabara Koogan S. A . Rio de janeiro: Guanabara, 1991. P.509-511. Título original: Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 1990.

HOFFMANN, E. De.; CHARETTE, J. ; STROOBAN, V. **Mass Spectrometry, Principles and Applications.** New York: John Wiley and Sons,1996. p.3-50.

JOSEFSSON, M. et al. Sensitive high-performance liquid chromatography analysis of amlodipine in human plasma with amperometric detection and a single-step solid-phase sample preparation. **J Chromatogr B**, 672:310-313, 1995.

KATZUNG, BERTRAM, G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 5ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p.124-129.

KENERETH, L. et al. **Mass Spectrometry/Mass Spectrometry: Techniques and Applications of Tandem Mass Spectrometry**. New York: VCH Publishers, 1988.

LAHER, M. S. et al. Pharmacokinetics of amlodipine in renal impairment. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, 12 :S60-S63, 1988.

LESLIE, J. Analytical Aspects of Bioequivalency testing. In: JACKSON, A. J. **Generics and bioequivalence**. Salem: CRC Press, 1994. P. 69-86.

LOUGH, W.J.; WAINER, I. W. **High performance Liquid Chromatography, Fundamental Principles and Practice**. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1995. P.1-276.

LUKSA, J. et al. Pharmacokinetic behaviour of R-(+)- and S-(-)-amlodipine after single enantiomer administration. **J Chromatogr B**, 672:185-193, 1997a.

LUKSA, J. et al. Semi-preparative chromatographic purification of the enantiomers R-(+)- and S-(-)-amlodipine. **J Chromatogr B**, 693:367-375, 1997b.

MARTINDALE, W. **The Extra Pharmacopoeia**. 30ª Ed. London: The Pharmaceutical Press, 1993. p.342.

MARZO, et al. Amlodipine bioequivalence achieved with a very sensitive liquid chromatography tandem mass spectrometric bioassay. **Arzneim-Forsch/Drug Res**, 50:688-694, 2000.

MASON, R. P. et al. Comparison of location and binding for the positively charged 1,4 dihydropyridine calcium channel antagonist amlodipine with uncharged drugs of this class in cardiac membranes. **Molecular Pharmacology**, 36: 634- 640, 1989.

MICROMASS, U.K. LIMITED. Back to Basics Manual, 2000. Disponível em <http://www.micromass.co.uk> Acesso em 23 de março de 2003.

MILLER, R. J. Multiple calcium channels and neuronal function. **Science**, 235: 46-52, 1987.

MONKMAN, S.C. et al. Automated gas chromatographic assay for amlodipine in plasma and gingival crevicular fluid. **J Chromatogr B**, 678:360-364, 1995.

OSTERLOH, I. The safety of amlodipine. **Am. Heart Journal**, 118 (5Pt2): 1114-1120, 1989.

PAHOR, M.; PSATY, B. M.; AIDERMAN, M. H., et al. Health outcomes associated with calcium antagonists compared with other first-line antihypertensive therapies: a meta-analysis of randomised controlled trials. **Lancet**, 356: 1949-54, 2000.

PANDYA, K.K. et al. Detection and determination of total amlodipine by high-performance thin-layer chromatography: a useful technique for pharmacokinetic studies. **J Chromatogr B**, 667:315-320, 1995.

PFIZER CENTER RESEARCH, U.K.. Data on file.

REID, L.J. et al. Pharmacokinetics of calcium antagonists. **J Cardiovasc Pharmacol**, 12:22-26, 1988.

ROSSI, E. G.; CUNHA W. B. **Interações medicamentosas em Cardiologia**. RSCESP, 1998. Disponível em : <http://www.manuaisdecardiologia.med.br/has/pag.4html> .Acesso em: 10 de junho de 2004.

SCHWERTZ, A .; MCKENNA, E.; VAGHY, P. L. Receptors for calcium antagonists. **Am J Cardiol**, 62: 3G-6G, 1988.

SOCIEDADE DE CARDIOLOGIA DO ESTADO DE SÃO PAULO – SOCESP. **Atualização e Reciclagem** . São Paulo: Atheneu, 1994. Cap. 20 e 21. Disponível em: <http://www.manuaisdecardiologia.med.br/has/pag.4html> .Acesso em: 10 de junho de 2004.

STAESSEN, J. A.; WANG, J.G.; THIJS, L. Cardiovascular protection and blood pressure reduction: a meta-analysis. **Lancet**, 358: 1305-15, 2001.

STEFFEN, H. M. Use of Calcium Channel Antagonists for the Treatment of Hypertension in the Elderly. **Drugs & Aging**, 21(9): 565-581, 2004.

STORPIRTIS, S. **Biofarmacotécnica. Fundamentos de Biodisponibilidade, Bioequivalência, Dissolução e Intercambialidade de Medicamentos Genéricos**. São Paulo, 1999.

THOMSON, J. J. **Rays of positive Electricity and their Application to Chemical Analysis**. London: Longmans Green, 1913.

TSIEN, R. W.; LIPSCOMBE, D.; MADISON, D. V.; BLEY, K. R.; FOX, A .P. Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. **Trends Neurosci**, 11: 431-438, 1988.

UNITED STATES. National Archives and Records Service. Office of the Federal Register. Code of Federal Regulations. Title 21: Food and Drug Administration. Part 320. **Bioavailability and bioequivalence requirements**, 1998.

UNITED STATES. Drug and Food Administration. **Guidance for Industry:bioanalytical methods validation for human studies**. U.S: DHHS-CDER, 2001.

VARADI, G.; STROBECK, M.; KOCH, S.; CAGLIOTI, L.; ZUCCHI, C. E PALYI, G. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, 34: 181–214, 1999.[[Abstract/Free Full Text](#)]

WIEN, W. Verhanal. **Phys Ges**, 17,1898.

WILLIAMS, D. M. et al. Amlodipine pharmacokinetics in healthy volunteers. **Journal of Clinical Pharmacology** ,28: 990-994, 1988.

YASUDA, T. et al. Quantitative determination of Amlodipine in serum by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. **J Mass Spectrom**, 31:879-884,1996. . . .

**ANEXO 1.**  
**Randomização**  
**Estudo de Bioequivalência de Duas Formulações de Besilato de Amlodipina (comprimido) em Voluntários Sadios de Ambos os Sexos**

| <b>Sequência de Administrações</b> |  |                        |                        |
|------------------------------------|--|------------------------|------------------------|
| <b>Voluntários</b>                 |  | <b>Período I</b>       | <b>Período II</b>      |
| <b>01</b>                          |  | Besilato de Amlodipina | <b>Norvasc®</b>        |
| <b>02</b>                          |  | <b>Norvasc®</b>        | Besilato de Amlodipina |
| <b>03</b>                          |  | Besilato de Amlodipina | <b>Norvasc®</b>        |
| <b>04</b>                          |  | <b>Norvasc®</b>        | Besilato de Amlodipina |
| <b>05</b>                          |  | Besilato de Amlodipina | <b>Norvasc®</b>        |
| <b>06</b>                          |  | <b>Norvasc®</b>        | Besilato de Amlodipina |
| <b>07</b>                          |  | <b>Norvasc®</b>        | Besilato de Amlodipina |
| <b>08</b>                          |  | Besilato de Amlodipina | <b>Norvasc®</b>        |
| <b>09</b>                          |  | <b>Norvasc®</b>        | Besilato de Amlodipina |
| <b>10</b>                          |  | Besilato de Amlodipina | <b>Norvasc®</b>        |
| <b>11</b>                          |  | Besilato de Amlodipina | <b>Norvasc®</b>        |
| <b>12</b>                          |  | <b>Norvasc®</b>        | Besilato de Amlodipina |
| <b>13</b>                          |  | <b>Norvasc®</b>        | Besilato de Amlodipina |
| <b>14</b>                          |  | Besilato de Amlodipina | <b>Norvasc®</b>        |
| <b>15</b>                          |  | <b>Norvasc®</b>        | Besilato de Amlodipina |
| <b>16</b>                          |  | Besilato de Amlodipina | <b>Norvasc®</b>        |
| <b>17</b>                          |  | <b>Norvasc®</b>        | Besilato de Amlodipina |
| <b>18</b>                          |  | <b>Norvasc®</b>        | Besilato de Amlodipina |
| <b>19</b>                          |  | Besilato de Amlodipina | <b>Norvasc®</b>        |
| <b>20</b>                          |  | Besilato de Amlodipina | <b>Norvasc®</b>        |
| <b>21</b>                          |  | <b>Norvasc®</b>        | Besilato de Amlodipina |
| <b>22</b>                          |  | Besilato de Amlodipina | <b>Norvasc®</b>        |
| <b>23</b>                          |  | <b>Norvasc®</b>        | Besilato de Amlodipina |
| <b>24</b>                          |  | Besilato de Amlodipina | <b>Norvasc®</b>        |

**ANEXO 2.**  
**Concentrações Plasmáticas Individuais**  
**Tabela 1**

| Voluntário | 1        |            | 2        |            | 3        |            | 4        |            |
|------------|----------|------------|----------|------------|----------|------------|----------|------------|
| Hora       | Norvasc® | Amlodipina | Norvasc® | Amlodipina | Norvasc® | Amlodipina | Norvasc® | Amlodipina |
| 0.0        | 0.000    | 0.000      | 0.000    | 0.000      | 0.000    | 0.000      | 0.000    | 0.000      |
| 1.0        | 0.360    | 0.257      | 0.141    | 0.286      | 0.469    | 0.499      | 0.729    | 0.816      |
| 2.0        | 0.947    | 0.675      | 0.599    | 0.630      | 0.580    | 0.811      | 1.49     | 2.02       |
| 4.0        | 1.99     | 1.85       | 2.08     | 1.60       | 1.70     | 1.47       | 3.66     | 3.96       |
| 6.0        | 2.00     | 1.40       | 2.62     | 4.71       | 2.76     | 2.56       | 3.13     | 4.13       |
| 8.0        | 1.66     | 1.26       | 1.82     | 2.34       | 2.70     | 2.08       | 2.98     | 3.55       |
| 10.0       | 1.64     | 1.25       | 1.68     | 2.35       | 2.07     | 1.90       | 2.30     | 2.58       |
| 12.0       | 1.58     | 1.23       | 1.66     | 1.51       | 1.97     | 1.84       | 2.16     | 2.81       |
| 14.0       | 1.79     | 1.29       | 1.63     | 1.52       | 2.01     | 1.99       | 1.79     | 2.58       |
| 24.0       | 1.18     | 0.967      | 1.25     | 1.20       | 1.50     | 1.20       | 1.84     | 2.05       |
| 48.0       | 0.775    | 0.582      | 0.717    | 0.727      | 0.937    | 0.780      | 1.07     | 1.58       |
| 96.0       | 0.306    | 0.260      | 0.238    | 0.231      | 0.339    | 0.353      | 0.507    | 0.666      |
| 120.0      | 0.192    | 0.159      | 0.187    | 0.169      | 0.270    | 0.260      | 0.387    | 0.517      |
| 144.0      | 0.169    | n.a.       | 0.102    | n.a.       | 0.207    | 0.201      | 0.220    | 0.410      |
|            | 5        |            | 6        |            | 7        |            | 8        |            |
| 0.0        | 0.000    | 0.000      | 0.000    | 0.000      | 0.000    | 0.000      | 0.000    | 0.000      |
| 1.0        | 0.506    | 0.578      | 0.242    | 0.149      | 0.140    | 0.361      | 0.270    | 0.797      |
| 2.0        | 1.21     | 0.903      | 0.450    | 0.524      | 0.220    | 0.746      | 0.845    | 1.92       |
| 4.0        | 2.20     | 2.04       | 1.40     | 1.71       | 0.75     | 1.70       | 2.35     | 3.10       |
| 6.0        | 1.95     | 1.91       | 1.87     | 1.64       | 2.53     | 3.33       | 2.11     | 2.57       |
| 8.0        | 1.83     | 1.32       | 1.58     | 1.57       | 1.85     | 1.75       | 1.96     | 2.17       |
| 10.0       | 1.45     | 1.29       | 1.18     | 1.11       | 2.09     | 1.86       | 1.97     | 1.75       |
| 12.0       | 1.42     | 1.09       | 0.97     | 1.09       | 2.39     | 1.70       | 1.77     | 1.71       |
| 14.0       | 1.38     | 1.37       | 1.16     | 1.34       | 1.36     | 1.70       | 1.60     | 1.84       |
| 24.0       | 1.37     | 1.08       | 0.719    | 0.980      | 1.32     | 1.33       | 1.42     | 1.44       |
| 48.0       | 1.09     | 0.641      | 0.510    | 0.605      | 0.706    | 0.913      | 1.03     | 0.986      |
| 96.0       | 0.362    | 0.280      | 0.262    | 0.294      | 0.366    | 0.358      | 0.318    | 0.362      |
| 120.0      | 0.240    | 0.230      | 0.178    | 0.208      | 0.286    | 0.259      | 0.392    | 0.314      |
| 144.0      | 0.235    | 0.125      | 0.257    | 0.167      | 0.166    | 0.178      | 0.187    | 0.199      |

**ANEXO 2.**  
**Concentrações Plasmáticas Individuais**  
**Tabela 2**

| Voluntário | 9        |            | 10       |            | 11       |            | 12       |            |
|------------|----------|------------|----------|------------|----------|------------|----------|------------|
| Hora       | Norvasc® | Amlodipina | Norvasc® | Amlodipina | Norvasc® | Amlodipina | Norvasc® | Amlodipina |
| 0.0        | 0.000    | 0.000      | 0.000    | 0.000      | 0.000    | 0.000      | 0.000    | 0.000      |
| 1.0        | 0.241    | 0.295      | 0.233    | 0.133      | 0.468    | 0.408      | 0.552    | 0.392      |
| 2.0        | 0.606    | 0.676      | 0.562    | 0.598      | 1.25     | 1.21       | 1.40     | 1.08       |
| 4.0        | 1.29     | 1.29       | 1.87     | 1.67       | 2.56     | 1.97       | 2.65     | 2.07       |
| 6.0        | 1.45     | 1.66       | 1.57     | 1.52       | 2.75     | 3.68       | 2.60     | 1.90       |
| 8.0        | 1.35     | 1.28       | 1.36     | 1.72       | 2.14     | 1.92       | 1.78     | 1.70       |
| 10.0       | 1.10     | 1.15       | 1.38     | 1.58       | 2.61     | 1.68       | 1.59     | 1.52       |
| 12.0       | 1.04     | 1.13       | 1.05     | 2.00       | 1.61     | 1.45       | 1.40     | 1.55       |
| 14.0       | 0.27     | 1.26       | 1.29     | 1.98       | 2.06     | 1.64       | 1.44     | 1.58       |
| 24.0       | 0.771    | 0.987      | 1.07     | 0.900      | 1.38     | 1.59       | 1.49     | 1.02       |
| 48.0       | 0.601    | 0.633      | 0.721    | 0.701      | 0.874    | 1.09       | 0.828    | 0.698      |
| 96.0       | 0.247    | 0.314      | 0.326    | 0.324      | 0.441    | 0.631      | 0.310    | 0.262      |
| 120.0      | 0.170    | 0.201      | 0.203    | 0.243      | 0.304    | 0.417      | 0.236    | 0.204      |
| 144.0      | 0.118    | 0.123      | 0.179    | 0.168      | 0.183    | 0.356      | 0.237    | 0.137      |
|            | 13       |            | 14       |            | 15       |            | 16       |            |
| 0.0        | 0.000    | 0.000      | 0.000    | 0.000      | 0.000    | 0.000      | 0.000    | 0.000      |
| 1.0        | 0.243    | 0.000      | 1.05     | 1.30       | 0.375    | 0.459      | 0.216    | 0.328      |
| 2.0        | 0.663    | 0.533      | 2.30     | 2.82       | 0.632    | 0.750      | 0.545    | 0.992      |
| 4.0        | 2.63     | 1.96       | 3.52     | 4.38       | 1.97     | 2.09       | 1.89     | 2.26       |
| 6.0        | 2.04     | 2.37       | 2.73     | 2.89       | 2.03     | 2.15       | 2.73     | 3.13       |
| 8.0        | 1.75     | 1.95       | 2.44     | 2.22       | 1.44     | 1.48       | 2.39     | 2.48       |
| 10.0       | 1.48     | 1.66       | 1.81     | 1.90       | 1.42     | 1.60       | 2.21     | 2.29       |
| 12.0       | 1.80     | 1.86       | 1.22     | 2.37       | 1.58     | 1.54       | 1.82     | 1.84       |
| 14.0       | 1.27     | 1.21       | 1.46     | 1.70       | 1.29     | 1.51       | 2.12     | 2.04       |
| 24.0       | 2.70     | 1.33       | 1.38     | 1.56       | 1.17     | 1.43       | 1.91     | 1.62       |
| 48.0       | 0.661    | 0.662      | 0.941    | 0.930      | 0.860    | 1.26       | 1.25     | 1.20       |
| 96.0       | 0.267    | 0.262      | 0.325    | 0.318      | 0.409    | 0.685      | 0.777    | 0.668      |
| 120.0      | 0.238    | n.a.       | 0.206    | 0.411      | 0.364    | 0.701      | 0.476    | 0.479      |
| 144.0      | 0.141    | 0.200      | 0.148    | 0.165      | 0.360    | 0.367      | 0.470    | 0.371      |

**ANEXO 2.**  
**Concentrações Plasmáticas Individuais**  
**Tabela 3**

| Voluntário | 17       |            | 18       |            | 19       |            | 20       |            |
|------------|----------|------------|----------|------------|----------|------------|----------|------------|
| Hora       | Norvasc® | Amlodipina | Norvasc® | Amlodipina | Norvasc® | Amlodipina | Norvasc® | Amlodipina |
| 0.0        | 0.000    | 0.000      | 0.000    | 0.000      | 0.000    | 0.000      | 0.000    | 0.000      |
| 1.0        | 0.342    | 0.492      | 0.506    | 0.788      | 0.299    | 0.268      | 0.553    | 0.401      |
| 2.0        | 1.07     | 1.31       | 1.06     | 1.47       | 0.613    | 0.469      | 0.859    | 0.692      |
| 4.0        | 2.43     | 2.55       | 2.08     | 2.43       | 1.95     | 2.03       | 2.37     | 2.42       |
| 6.0        | 1.71     | 2.22       | 2.17     | 2.10       | 2.49     | 2.48       | 2.25     | 2.28       |
| 8.0        | 1.71     | 2.00       | 1.82     | 1.81       | 2.22     | 2.37       | 2.17     | 2.13       |
| 10.0       | 1.38     | 1.41       | 2.05     | 1.64       | 2.18     | 2.21       | 2.02     | 2.01       |
| 12.0       | 1.57     | 1.41       | 1.51     | 1.31       | 2.05     | 2.11       | 1.85     | 2.10       |
| 14.0       | 1.41     | 1.25       | 1.56     | 1.39       | 1.91     | 1.95       | 2.06     | 2.01       |
| 24.0       | 1.09     | 1.11       | 1.29     | 1.24       | 1.39     | 1.44       | 1.50     | 1.50       |
| 48.0       | 0.685    | 0.624      | 0.937    | 0.646      | 1.01     | 0.939      | 1.06     | 0.995      |
| 96.0       | 0.303    | 0.330      | 0.381    | 0.238      | 0.440    | 0.546      | 0.473    | 0.556      |
| 120.0      | 0.195    | 0.181      | 0.189    | 0.190      | 0.311    | 0.297      | 0.348    | 0.388      |
| 144.0      | 0.147    | 0.108      | 0.137    | 0.000      | 0.207    | 0.221      | 0.242    | 0.317      |
|            | 21       |            | 22       |            | 23       |            | 24       |            |
| 0.0        | 0.000    | 0.000      | 0.000    | 0.000      | 0.000    | 0.000      | 0.000    | 0.000      |
| 1.0        | 0.638    | 0.452      | 0.640    | 0.665      | 1.18     | 0.693      | 0.637    | 1.13       |
| 2.0        | 0.930    | 0.757      | 1.08     | 1.01       | 1.55     | 3.03       | 2.34     | 1.56       |
| 4.0        | 1.66     | 2.18       | 2.58     | 1.61       | 2.90     | 3.68       | 2.51     | 2.81       |
| 6.0        | 2.68     | 2.16       | 3.11     | 2.95       | 3.11     | 3.59       | 2.67     | 2.77       |
| 8.0        | 1.65     | 1.92       | 3.00     | 2.24       | 3.91     | 4.31       | 3.02     | 2.45       |
| 10.0       | 1.60     | 1.56       | 2.55     | 2.21       | 2.74     | 4.41       | 2.62     | 2.58       |
| 12.0       | 1.62     | 1.88       | 2.34     | 1.95       | 2.33     | 3.30       | 2.47     | 3.24       |
| 14.0       | 1.56     | 1.57       | 2.20     | 2.23       | 2.21     | 3.02       | 1.97     | 2.37       |
| 24.0       | 1.26     | 1.48       | 2.16     | 1.83       | 1.76     | 1.84       | 2.18     | 2.11       |
| 48.0       | 0.862    | 0.721      | 2.03     | 1.37       | 1.42     | 1.42       | 1.11     | 1.42       |
| 96.0       | 0.314    | 0.308      | 1.17     | 0.826      | 0.668    | 0.459      | 0.567    | 0.730      |
| 120.0      | 0.242    | 0.171      | 0.890    | 0.767      | 0.450    | 0.312      | 0.532    | 0.513      |
| 144.0      | 0.118    | 0.137      | 0.976    | 0.589      | 0.358    | 0.216      | 0.325    | 0.434      |

\* Para a análise estatística, todos os pontos não disponíveis foram interpolados. Zeros são zeros reais ou não quantificáveis

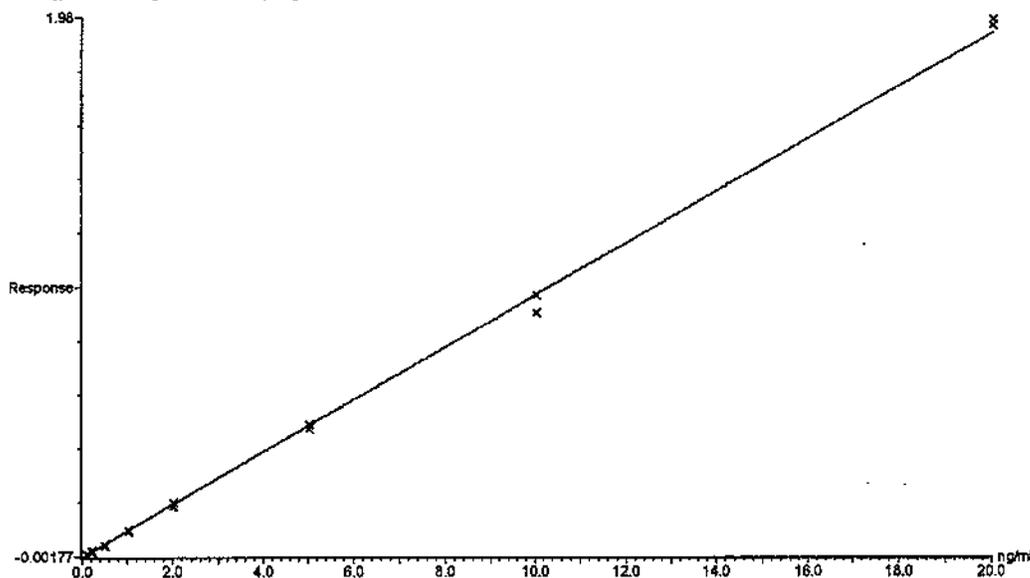
\*\* Concentração: ng/mL

### ANEXO 3.

## Dados da Validação Analítica

### Linearidade da Curva de Calibração

Compound 1 name: Amlodipina Method File: 3602L03  
 Coefficient of Determination: 0.998765  
 Calibration curve:  $0.0965451 * x + -0.00177191$   
 Response type: Internal Std ( Ref 2 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



#### Validação da Curva de Calibração

| Concentração nominal (ng/mL) | Concentração Quantificada (ng/mL) | Acurácia % | Analito aprovado ? | Concentração Aprovada ? |
|------------------------------|-----------------------------------|------------|--------------------|-------------------------|
| 0.100                        | 0.108                             | 92.6       | Yes                | Yes                     |
|                              | 0.108                             | 92.6       | Yes                |                         |
| 0.200                        | 0.199                             | 100.5      | Yes                | Yes                     |
|                              | 0.183                             | 109.3      | Yes                |                         |
| 0.500                        | 0.48                              | 104.2      | Yes                | Yes                     |
|                              | 0.492                             | 101.6      | Yes                |                         |
| 1.00                         | 0.954                             | 104.8      | Yes                | Yes                     |
|                              | 1.02                              | 97.9       | Yes                |                         |
| 2.00                         | 2.05                              | 97.4       | Yes                | Yes                     |
|                              | 2.04                              | 97.9       | Yes                |                         |
| 5.00                         | 4.81                              | 104.0      | Yes                | Yes                     |
|                              | 4.99                              | 100.3      | Yes                |                         |
| 10.0                         | 9.83                              | 101.7      | Yes                | Yes                     |
|                              | 10.1                              | 99.4       | Yes                |                         |
| 20.0                         | 19.8                              | 101.3      | Yes                | Yes                     |
|                              | 20.5                              | 97.5       | Yes                |                         |
| Coeficiente de correlação:   |                                   |            | 0.998246           |                         |

## ANEXO 4. Dados da Validação Analítica

### Definição das Amostras do Controle de Qualidade

| <b>Tipo CQ</b>   | <b>Código CQ</b> | <b>Definição da série</b>   | <b>Valor Definido</b> |
|------------------|------------------|---|-----------------------|
| Amostra CQ LOQ   | QL1              | Mesma concentração do LOQ   | 0.1 ng/mL             |
| Amostra CQ LOQ   | QL2              | Mesma concentração do LOQ   | 0.2 ng/mL             |
| Amostra CQ baixa | QCA              | ≈ 3 x LOQ   | 0.3 ng/mL             |
| Amostra CQ média | QCB              | Média entre o CQ mais alto e o mais baixo   | 2.0 ng/mL             |
| Amostra CQ alta  | QCC              | 75% - 90% do mais alto padrão de calibração ou o mais alto valor da concentração antecipada | 15.0 ng/mL            |

### Validação do LOQ

| Lista de validação ID | V01                   |                         |
|-----------------------|-----------------------|-------------------------|
| Código amostra        | QL1 = 0.1 ng/mL       |                         |
|                       | Medida [c]<br>(ng/mL) | Precisão individual (%) |
| 21                    | 0.103                 | 103.0                   |
| 22                    | 0.091                 | 91.0                    |
| 23                    | 0.103                 | 103.0                   |
| 24                    | 0.117                 | 117.0                   |
| 25                    | 0.114                 | 114.0                   |
| 26                    | 0.094                 | 94.0                    |
| 27                    | 0.108                 | 108.0                   |
| 28                    | 0.111                 | 111.0                   |
| Média (ng/mL)         | 0.105                 |                         |
| Precisão (CV%)        | 8.8                   |                         |
| Acurácia (%)          | 95.1                  |                         |

## **ANEXO 5.**

### **Parâmetros Estatísticos**

#### **C<sub>max</sub> parametric analysis of ln-transformed data**

ANOVA for differences between treatments after ln-transformation:

P = 0.1

Power = 1.0

Geometric Means Ratio = 106.8% of Norvasc® mean.

90% Confidence interval for mean treatment ratio: 100.0-114.0%.

Two one side T-test for ln-transformed values:

P[0.80<r<1.25] = 1.0

P[r<=0.80] = 0.0

P[r>=1.25] = 0.0

Geometric Means Ratio = 99.9% of Period 1

90% Confidence interval for mean period ratio: 93.6-106.7%

#### **C<sub>max</sub> non-parametric analysis of ln-transformed data**

Point Estimate = 105.8% of Norvasc® mean.

90% Confidence interval for mean treatment ratio = 100.2-111.8%

#### **AUC<sub>last</sub> parametric analysis of ln-transformed data**

ANOVA for differences between treatments after ln-transformation:

P > 0.30

Power = 1.0

Geometric Means Ratio = 99.5% of Norvasc® mean.

90% Confidence interval for mean treatment ratio: 93.6-105.7%.

Two one side T-test for ln-transformed values:

$P[0.80 < r < 1.25] = 1.0$

$P[r \leq 0.80] = 0.0$

$P[r \geq 1.25] = 0.0$

Geometric Means Ratio = 103.6% of Period 1  
90% Confidence interval for mean period ratio: 97.5-110.1%

**AUC<sub>last</sub> non-parametric analysis of ln-transformed data**

Point Estimate = 99.8% of Norvasc<sup>®</sup> mean.

90% Confidence interval for mean treatment ratio = 92.7-106.7%

**AUC<sub>0-144h</sub> parametric analysis of ln-transformed data**

ANOVA for differences between treatments after ln-transformation:  
P > 0.30

Power = 1.0

Geometric Means Ratio = 99.5% of Norvasc<sup>®</sup> mean.  
90% Confidence interval for mean treatment ratio: 93.5-105.8%.

Two one side T-test for ln-transformed values:

$P[0.80 < r < 1.25] = 1.0$

$P[r \leq 0.80] = 0.0$

$P[r \geq 1.25] = 0.0$

Geometric Means Ratio = 103.8% of Period 1  
90% Confidence interval for mean period ratio: 97.6-110.3%

**AUC<sub>0-144h</sub> non-parametric analysis of ln-transformed data**

Point Estimate = 100.6% of Norvasc<sup>®</sup> mean.

90% Confidence interval for mean treatment ratio = 92.6-107.3%

### **AUC<sub>inf</sub> parametric analysis of ln-transformed data**

ANOVA for differences between treatments after ln-transformation:

P > 0.30

Power = 1.0

Geometric Means Ratio = 99.2% of Norvasc<sup>®</sup> mean.

90% Confidence interval for mean treatment ratio: 92.6-106.3%.

Two one side T-test for ln-transformed values:

P[0.80 < r < 1.25] = 1.0

P[r ≤ 0.80] = 0.0

P[r > 1.25] = 0.0

Geometric Means Ratio = 103.4% of Period 1

90% Confidence interval for mean period ratio: 96.5-110.9%

### **AUC<sub>inf</sub> non-parametric analysis of ln-transformed data**

Point Estimate = 100.0% of Norvasc<sup>®</sup> mean.

90% Confidence interval for mean treatment ratio = 92.9-106.0%

## ANEXO 6 .

### Ajuste Instrumental

#### Acquisition Experiment Report

File:d:\projects\gdn3602.pro\data\3602qcs045.raw

#### Header

Acquired File Name: D:\Projects\GDN3602.PRO\Data\3602QCS045

Acquired Date: 23-Feb-2002

Acquired Time: 17:18:20

Job code: GDN36/02

Task code: ER/DR

User Name:

Laboratory Name:

Instrument: QUATTROULTIMA

Conditions: RB

Submitter: PG

SampleID:

Bottle Number: Tray01:53

Description: QCC-15.00 ng/ml

#### Instrument Calibration

##### Parameters

MS1 Static: None

MS1 Scanning: None

MS1 Scan Speed: None

MS2 Static: None

MS2 Scanning: None

MS2 Scan Speed: None

Calibration Time: 09:25

Calibration Date: 08/03/99

##### Coefficients

MS1 Static: None

MS2 Static: None

Function 1: None

#### Parameters for D:\Projects\GDN3602.PRO\ACQUDB\3602.EXP

##### Prescan Statistics:

Initial Average Intensity 51.0981

Initial Average Std Dev 14.5454

Bunch Zero Level 0.8623

Bunch Std Dev 0.4008

Bunch Threshold 3.2067

Spike Removal Std Dev 9.7487

#### Instrument Parameters - Function 1:

Polarity ES+

Calibration Static 2

Capillary (kV) 3.20 3.15

Cone (V) 20 13

Hex 1 (V) 1.0

Aperture (V) 1.0

Hex 2 (V) 1.0

Source Temperature (°C) 150 149  
 Desolvation Temperature (°C) 350 349  
 Cone Gas Flow (L/Hr) 46  
 Desolvation Gas Flow (L/Hr) 652  
 LM 1 Resolution 10.0  
 HM 1 Resolution 10.0  
 Ion Energy 1 2.0  
 Entrance 50 -65  
 Collision 0 -16  
 Exit 120 -136  
 LM 2 Resolution 10.0  
 HM 2 Resolution 10.0  
 Ion Energy 2 2.0  
 Multiplier (V) 950 -766

ACE Experimental Record

----- Run method parameters -----

Method:default

//Duplication of PAL local LC-Inj cycle

syringe:100ul

LC-Inj

Air Volume (µl) 0  
 Pre Clean with Solvent 1 0  
 Pre Clean with Solvent 2 0  
 Pre Clean with Sample 0  
 Filling Speed (µl/s) 5  
 Filling Strokes 1  
 Inject to LC Vlv1  
 Injection Speed (µl/s) 100  
 Pre Inject Delay (ms) 500  
 Post Inject Delay (ms) 500  
 Post Clean with Solvent 1 2  
 Post Clean with Solvent 2 2  
 Valve Clean with Solvent 1 2  
 Valve Clean with Solvent 2 2

----- oOo -----

End of experimental record.

Function 1

Scans in function: 309  
 Cycle time (secs): 0.530  
 Inter Channel delay (secs):0.03  
 Retention window (mins): 0.000 to 5.500  
 Ionization mode: ES+  
 Data type: SIR or MRM data  
 Function type: MRM of 2 channels  
 Chan Reaction Dwell(secs) Cone Volt. Col.Energy  
 1 : 267.54 > 72.31 0.50 10.0 15.0  
 2 : 409.65 > 238.38 0.50 10.0 10.0

## **ANEXO 7.**

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

#### **Para o Estudo de bioequivalência de duas formulações de Besilato de Amlodipina (comprimido) em voluntários sadios**

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.

Responsáveis: Drs Eduardo Abib Júnior, Moisés Luis Pirasol Vanunci e Ronilson Agnaldo Moreno.

O abaixo-assinado, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ anos, RG nº \_\_\_\_\_ declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, de responsabilidade dos médicos/pesquisadores: Eduardo Abib júnior, Moisés Luis Pirasol Vanunci e Ronilson Agnaldo Moreno, da Synchronphar Assessoria e Desenvolvimento de Projetos Clínicos. O abaixo-assinado está ciente que:

#### **NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO**

1. O objetivo da pesquisa é verificar se 5mg de besilato de amlodipina comprimido (Laboratório Teuto Brasileiro Ltda) atinge níveis plasmáticos equivalentes a 5mg de besilato de amlodipina comprimido (Norvasc® - Pfiser).

#### **PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS E RESPONSABILIDADES**

2. Antes de sua participação no estudo e após a sua participação você será convidado a ir à Synchronphar para verificação da sua condição de saúde. Você será examinado por um médico que lhe fará um exame completo, medindo o seu pulso, sua temperatura, sua pressão arterial. Também será feito um exame eletrocardiográfico (exame do coração). O

médico lhe perguntará se você teve ou tem alguma doença e se você faz uso de algum medicamento. Durante a visita serão coletadas amostras de sangue, urina e fezes para exames laboratoriais. Os exames laboratoriais incluem hemograma completo (hemoglobina, hematócrito, contagem diferencial de glóbulos brancos, contagem de glóbulos vermelhos e plaquetas); bioquímica sanguínea (glicose no sangue, proteínas totais, albumina, transaminases oxalacética e pirúvica, gamaglutamil transferase, creatinina, uréia, ácido úrico, colesterol e triglicérides); exame sumário de urina (Urina I). Exames para a hepatite B e C e para AIDS (HIV 1 e HIV2), no sangue, exame de fezes, serão feitos somente no pré estudo.

3. Durante o estudo, serão internados duas vezes por 26 horas cada período, com intervalo mínimo de 21 dias. Em cada internamento: a) será administrado 5 mg de besilato de amlodipina na forma de comprimidos acompanhado de 200mL de água sem gás; b) serão coletadas 14 amostras de sangue de 6 mL, cada, através de agulha introduzida em veia superficial para a dosagem do medicamento e mais uma amostra de 25 mL antes da administração da medicação para o controle de qualidade do método analítico (método que dosa a medicação no sangue); c) em intervalos regulares, será verificada sua pressão, pulso e temperatura; d) serão também servidas refeições padronizadas (almoço, lanche da tarde e jantar, no dia de administração do medicamento) ou bebidas em horários preestabelecidos. A duração total de sua participação na pesquisa está estimada em 30 dias, a contar da primeira internação, após o processo de seleção.

## **RESPONSABILIDADES**

4. É condição indispensável, para participação no ensaio clínico, que esteja em boa saúde e, portanto, não esteja no momento sob tratamento médico ou fazendo uso de quaisquer drogas ou medicações. Algumas regras deverão ser seguidas para sua participação no estudo: a) não pode ser dependente de drogas ou álcool e caso o investigador tenha alguma suspeita, poderá solicitar exame de urina para detecção do uso de drogas; b) não pode ter doado sangue ou plasma dentro dos três meses que antecedem o estudo ou ter doado 1500 mL (um litro e meio) no período de um ano antecedendo o estudo; c) não pode tomar

bebidas contendo cafeína e xantinas (chocolate, café, chá, coca-cola, etc) nas 48 horas que antecedem as internações até a última coleta.

5. É ainda de responsabilidade do voluntário em relação a sua participação no ensaio clínico: a) comparecer às internações nas datas e horários informados; b) permanecer em jejum pelo tempo previsto (pelo menos 10 horas) em cada internação; c) tomar toda a medicação prevista; d) Ingerir toda a alimentação e líquidos que tenham sido previstos; d) retornar à Unidade na data, horário e local combinado para realização da consulta e exames de alta, independentemente de haver sido interrompida sua participação no estudo ou de sua desistência.

### **POSSÍVEIS RISCOS E DESCONFORTOS**

6. A administração oral de besilato de amlodipina de maneira continuada pode causar efeitos colaterais como cefaléia (dor de cabeça), edema (inchaço), náuseas (ânsia), tonturas, rubor e cansaço físico. Entretanto o aparecimento de efeitos indesejáveis após administração de dose única de besilato de amlodipina tem menor probabilidade de aparecer. Além dos efeitos citados, a administração de qualquer medicamento pode causar reações imprevisíveis.

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

### **BENEFÍCIOS OU COMPENSAÇÕES**

7. A participação neste estudo, que é de caráter experimental, não tem objetivo de submetê-lo a um tratamento terapêutico, conseqüentemente, não se espera que a participação no estudo traga qualquer benefício em função do tratamento. Tampouco estão previstos quaisquer procedimentos ou tratamentos alternativos, a não ser seu atendimento e tratamento em função de alguma possível intercorrência relacionada ao estudo.

### **INTERCORRÊNCIAS**

8. Se você sofrer algum malefício em decorrência direta de sua participação no estudo, você receberá tratamento, sem qualquer custo. Não haverá no entanto qualquer

compensação de ordem financeira em função do ocorrido, a não ser que a condição faça jus da indenização prevista no Seguro de Vida em Grupo mencionado abaixo. Contudo, ao assinar este termo, você não está renunciando qualquer direito legal que você possui.

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

## **RESSARCIMENTO**

10. De acordo com valores previamente estabelecidos R\$ 380.00 (trezentos e oitenta reais), os voluntários serão ressarcidos das despesas e tempo despendido na realização do supracitado estudo clínico após a consulta de alta. Caso desista ou seja dispensado antes do estudo ser finalizado o voluntário receberá proporcionalmente ao tempo despendido, no final do estudo. Entende também que a desistência ou dispensa antes do comparecimento para a primeira internação não dá direito a ressarcimento.

Estima-se que durante o período de sua participação no Estudo os voluntários terão como despesa apenas os gastos de deslocamento da residência ou trabalho até a Hospital para internação, coletas dos exames e consultas, perfazendo um total estimado de 08 visitas. Ainda deve ser previsto eventuais visitas posteriores para acompanhamento dos eventos adversos. O ressarcimento destas despesas já está incluído no valor estabelecido no item a (parag 13).

## **PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA**

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

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

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

13. A Synchrophar manter-lo-á 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.

### **DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES QUANTO A PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO**

14. Os registros que possam identificar-lo serão mantidos em sigilo, a não ser que haja obrigação legal de divulgação. A Synchrophar não identificará o voluntário por ocasião da publicação dos resultados obtidos.

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

### **CONTATOS E PERGUNTAS**

15. Caso surja alguma intercorrência, deverá procurar a Synchrophar Ass. e Desenv. de Proj. Clínicos pelo telefone 3233 7300 e solicitar que a mesma constate os médicos responsáveis pelo ensaio clínico ou então entrar em contato diretamente com os mesmos nos telefones indicados no final deste *Termo de Consentimento*.

16. Poderá contatar o Dr. Eduardo Abib Júnior para receber informações adicionais, relacionadas à pesquisa ou quanto aos seus direitos como voluntário.

17. Poderá contatar a Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisas da UNICAMP fone 3788-8936 para apresentar recursos ou reclamações em relação ao ensaio clínico.

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

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

Ao assinar este Termo de Consentimento estou autorizando o acesso às minhas informações de saúde aos membros da equipe e a monitores, auditores, membros do Comitê de Ética em Pesquisa e membros de órgãos regulamentares envolvidos, nas condições estabelecidas no item XV, acima

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

Campinas, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Assinatura do Voluntário

| Número do Voluntário                                   | Nome do Voluntário | Data              |
|--|--------------------|-------------------|
| <i>Telefone</i>  | <i>Assinatura</i>  | <i>..... Data</i> |
| Dr. Eduardo Abib Júnior (19) 9792 2913; (19) 3253 6164 |                    |                   |
| Dr. Moisés Luis Pirasol Vanunci (19) 3295 7699         |                    |                   |
| Dr. Ronilson A Moreno (19) 3272-0026; (19) 9773 8489   |                    |                   |

## ANEXO 8.

### Registro de Eventos Adversos

Voluntário nº: \_\_\_\_\_ Iniciais do Voluntário: \_\_\_\_\_

#### Eventos Adversos

---

Efeitos adversos durante o estudo? ( ) Sim ( ) Não

| Descrição | Data de início | Severidade |      |      | Atribuída a droga? |     |     |     | Ação adotada |
|-----------|----------------|------------|------|------|--------------------|-----|-----|-----|--------------|
|           |                | Leve       | Mod. | Sev. | Sim                | Pos | Nao | Des |              |
| 1.        |                | ( )        | ( )  | ( )  | ( )                | ( ) | ( ) | ( ) |              |
| 2.        |                | ( )        | ( )  | ( )  | ( )                | ( ) | ( ) | ( ) |              |
| 3.        |                | ( )        | ( )  | ( )  | ( )                | ( ) | ( ) | ( ) |              |

Mod. = Moderada Sev. = Severa Pos. = Possível Des = desconhecida

Comentários

---

---

#### MEDICAÇÃO PARA TRATAMENTO DE EVENTOS ADVERSOS

Voluntário nº: \_\_\_\_\_ Iniciais do Voluntário: \_\_\_\_\_

#### Medicação

Se o voluntário teve qualquer efeito adverso que necessitou uso de drogas para tratamento, abaixo encontra-se todas as informações correspondentes

| Nº do efeito adverso | Droga administrada (nome generico ou comercial) | Via (oral, IV., IM.) | Dosagem (mg/dose, nº doses/dia) | Total dose administrada (mg) |
|----------------------|---|----------------------|---------------------------------|------------------------------|
| 1                    |   |                      |                                 |                              |
| 2                    |   |                      |                                 |                              |
| 3                    |   |                      |                                 |                              |

Comentários

---

---

---

**ANEXO 9.**  
**Definições de experiências adversas**  
**(EVENTO)**

**Intensidade**

|          |  |
|----------|--|
| Leve     | Experiência adversa facilmente tolerada  |
| Moderada | Experiência adversa desagradável o bastante para interferir na atividade cotidiana |
| Severa   | Experiência adversa que impossibilita a realização da atividade cotidiana normal   |

**Relacionamento Suposto com A Droga Experimental**

|              |   |
|--------------|---|
| Não          | A experiência adversa definitivamente não está relacionada à droga em teste.  |
| Desconhecida | Há outras causas mais prováveis e não há suspeitas de que a droga seja a causa.   |
| Possível     | Não foi demonstrado um relacionamento de causa e efeito direto entre a droga e a experiência adversa, porém, há uma possibilidade razoável de que a droga esteja envolvida. |
| Sim          | Há um relacionamento direto de causa e efeito entre a experiência e a droga em estudo.  |

**EVENTO ADVERSO SÉRIO**

É qualquer experiência :

a qual é fatal

a qual põe a vida em risco

a qual debilita/incapacita

a qual resulta em hospitalização

a qual o pesquisador interpreta como séria ou que sugere um risco, contra-indicação, efeito colateral ou precaução significativa(o) que possa estar associada(o) ao uso da droga e que deve ser relatada como séria.

Quaisquer experiências (evento) adversas sérias que ocorram a qualquer tempo durante o estudo clínico dentro de cinco meia-vidas, desde a última dose da medicação em estudo, estejam ou não relacionadas com a medicação em estudo, devem ser relatadas pelo investigador clínico. Caso ocorra uma experiência adversa séria, entre em contato com o coordenador e/ou monitor do estudo imediatamente (em até 24 horas).

## **ANEXO 10.**

### **Manuscript Submission**

**De:** Brazilian Journal of Medical and Biological Research

**Para:** Synchrophar

**Data:** 05/08/2004 09:21

**Assunto:** Re: Manuscript Submission

Prezado Dr. Ronilson Moreno,,

Recebemos e agradecemos seu e-mail encaminhando o manuscrito "Determination of amlodipine in human plasma by High-Performance Liquid Chromatography coupled to tandem mass spectrometry in a bioequivalence study"

Brevemente encaminharemos informações sobre o registro do trabalho.

Atenciosamente,

Ricardo Wesley Martins  
Brazilian Journal of Medical and Biological Research  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP  
Av. Bandeirantes 3900  
14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brasil  
fax: 55+16+633-3825  
e-mail: [bjournal@fmrp.usp.br](mailto:bjournal@fmrp.usp.br)  
Versão On Line - <http://www.scielo.br/bjmr>