

RENATO MEDEIROS SILVA

**BIODISPONIBILIDADE COMPARATIVA DE DUAS FORMULAÇÕES DE
LOSARTAN EM VOLUNTÁRIOS HUMANOS SADIOS APÓS ADMINISTRAÇÃO
DE DOSE ÚNICA.**

Campinas

2009

RENATO MEDEIROS SILVA

**BIODISPONIBILIDADE COMPARATIVA DE DUAS FORMULAÇÕES DE
LOSARTAN EM VOLUNTÁRIOS HUMANOS SADIOS APÓS ADMINISTRAÇÃO
DE DOSE ÚNICA.**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

ORIENTADOR: PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI

Campinas

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

OL4q Silva, Renato Medeiros
 Biodisponibilidade comparativa de duas formulações de
 losartan em voluntários humanos sadios após administração de
 dose única / Renato Medeiros Silva. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

 Orientador : Gilberto de Nucci
 Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Ciências Médicas.

 1. Espectrometria de massas. 2. Bioequivalência, 3.
 Valsartan. 4. LC-MS-MS. I. Nucci, Gilberto de . II.
 Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
 III. Título.

Título em ingles: Comparative bioavailability of two losartan formulations in healthy human volunteers after a single dose administration.

Keywords: • Mass spectrometry

- Bioequivalence
- Valsartan
- LC-MS-MS

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora: Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Prof. Dr. Marcelo Niculas Muscará (USP – São Paulo)

Prof. Dr. Eros Antônio de Almeida (Clínica Médica/Unicamp)

Data da defesa: 18 - 11 - 2009

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Renato Medeiros Silva

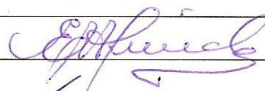
Orientadora(a): Prof(a). Dr(a). Gilberto de Nucci

Membros:

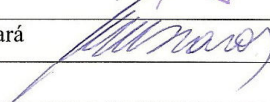
Professor(a) Doutor(a) Gilberto de Nucci



Professor(a) Doutor(a) Eros Antonio de Almeida



Professor(a) Doutor(a) Marcelo Nicolas Muscará



Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 18/11/2009

DEDICATÓRIA



À minha esposa, Rosemeire

Ao meu filho Matheus

Aos meus pais, Wilson (in memorian) e Odília

Aos meus sogros, Vitório e Terezinha



AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha esposa, Rosemeire, pelo incansável apoio e ajuda para que esta etapa de nossas vidas fosse concretizada.

Aos meus pais, Odília e Wilson (in memoriam), pelo contínuo apoio e exemplo que sempre serão para min.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Gilberto De Nucci, pela paciência e apoio durante toda esta trajetória de trabalho que compartilhamos.

Ao Dr. Gustavo Duarte Mendes pelo apoio e colaborações no presente trabalho.

A todos os amigos que integraram ou integram o “Grupo Galeno”, os quais colaboraram para que este e outros trabalhos acadêmicos fossem viabilizados.

A todos que de forma direta e indireta contribuíram para a realização deste trabalho,

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xix
RESUMO	xxiii
ABSTRACT	xxvii
1. INTRODUÇÃO GERAL	31
2. REVISÃO DE LITERATURA	35
2.1. DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS	37
2.2. BIOEQUIVALÊNCIA	41
2.2.1. ETAPA CLÍNICA	42
2.2.2. ETAPA ANALÍTICA	44
2.2.3. ETAPA ESTATÍSTICA	50
2.3. LOSARTAN.....	52
3. OBJETIVO.....	53
4. ARTIGO PUBLICADO	57
5. DISCUSSÃO.....	69
6. CONCLUSÃO GERAL	73
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
8. ANEXOS.....	81
ANEXO 1 – Tamanho de Partícula.....	83
ANEXO 2 – Perfil de Dissolução	84
ANEXO 3 – Lista de Randomização	85
ANEXO 4 – Termo de Recrutamento	86
ANEXO 5 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	88
ANEXO 6 – Validação do Método Analítico	93

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

APCI	ionização química à pressão atmosférica
API	ionização à pressão atmosférica
CE	energia de colisão
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-EM/EM	cromatografia líquida de alta eficiência associada à espectrometria de massas em tandem
LC-MS-MS	cromatografia líquida de alta eficiência associada à espectrometria de massas em tandem
$C_{\text{máx}}$	concentração máxima
EM	espectrometria de massas
MS	espectrometria de massas
ES	eletronebulização (electrospray)
ESI	ionização por eletronebulização
MRM	monitoração de reações múltiplas (multiple reaction monitoring)
ECG	Eletrocardiograma
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
γ -GT	γ -Glutamyltransferase
TGO	Aspartato aminotransferase - AST
TGP	Alanina aminotransferase - ALT
β -HCG	Human Chorionic Gonadotrofin (Gonadotrofina Coniônica Humana)
AUC	Área sob a curva (Area under curve)
FDA	Food and Drug Administration
US	United State
HIV	Human Immunodeficiency Virus
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
HLB	Hydrophilic Lipophilic Balance
SPE	Solid Phase Extraction
CV	Coefficiente de Variabilidade
QCA, QCB, QCC	Controles de Qualidades

LOQ	Limite de quantificação
$T_{1/2}$	Tempo de meia vida
$T_{\max}$	Tempo da máxima concentração
TLC	Thin Layer Chromatography
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial

RESUMO

Esta dissertação irá focar na avaliação da bioequivalência de duas formulações do Losartan Potássico (50mg) comprimidos de liberação imediata (Losartan do Laboratório Cristália Ltda, Brasil, como formulação teste e Cozaar[®] da Merck Sharp & Dohme Farmacêutica Brasil como formulação referência).

A bioequivalência foi conduzida usando um estudo aberto, randomizado, cruzado de duas fases com um intervalo de washout de 1 semana. Foram utilizados 25 voluntários de ambos os sexos. As amostras de plasma foram obtidas sobre um período de 24 horas. As concentrações plasmáticas do Losartan e seu metabolito ativo Losartan Ácido foram determinadas por cromatografia líquida de fase reversa acoplada à espectrometria de massa (LC-MS-MS), com modo de ionização electrospray negativo usando o monitoramento de múltiplas reações (MRM). Das curvas de concentração plasmática versus o tempo para Losartan e Losartan Ácido, os seguintes parâmetros farmacocinéticos foram obtidos: AUC_{last} , AUC_{0-inf} e C_{max} .

Resultados: A média geométrica e o respectivo intervalo de confiança de 90% Losartan / Cozaar[®] para o Losartan foram: 92,9% (82,2 - 105,0%) para C_{max} , 99,0% (92,5 - 105,9%) para AUC_{last} , e 99,1% (92,7 - 105,8%) para AUC_{0-inf} . Além disso, a média geométrica e o respectivo intervalo de confiança de 90% Losartan / Cozaar[®] para o Losartan Ácido foram: 98,5% (91,5 - 106,0%) para C_{max} , 97,9% (93,3 - 102,7%) para AUC_{last} , e 98,1% (93,5 - 102,9%) para AUC_{0-inf} .

Utilizando um IC de 90% para AUC_{last} , AUC_{0-inf} e C_{max} dentro do intervalo de 80–125% proposto pelo FDA (USA). As duas formulações foram bioequivalentes para a taxa e velocidade de absorção, para o medicamento Losartan 50 mg comprimidos de liberação imediata. Além disso, não foi apresentada nenhuma diferença significativa entre a determinação de bioequivalência entre o Losartan e o Losartan Ácido, portanto, futuras bioequivalências, deste medicamento, poderão ser realizadas apenas para o Losartan, sendo assim mais discriminatório.

ABSTRACT

Silva, Renato Medeiros – Comparative bioavailability of two losartan formulations in healthy human volunteers after a single dose administration – Faculty of Medical Sciences, 2007 – Master Thesis.

This dissertation focus in the evaluation of the bioavailability of two formulations of potassium losartan immediate release tablet 50mg (Losartan from Laboratórios Cristália Ltd., Brazil, as a test formulation and Cozaar® from Merck Sharp & Dohme Farmacêutica Ltd., Brazil as a reference formulation).

The bioequivalence study was conducted using an open, randomized, in a two-period crossover design and a one week washout period. Plasma samples were obtained over a 24-hour interval. The concentrations of losartan and its active metabolite losartan acid were analyzed by combined reversed phase liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) with negative ion electrospray ionization using a selected ion monitoring method. From the losartan and losartan acid plasma concentrations vs. time curves the following pharmacokinetic parameters were obtained: AUC_{last} , AUC_{0-inf} and C_{max} .

Results: the geometric mean and respective 90% confidence interval (CI) of Losartan / Cozaar® losartan percent ratios were 92.9% (82.2 – 105.0%) for C_{max} , 99.0 (92.5 – 105.9%) for AUC_{last} , and 99.1% (92.7 – 105.8%) for AUC_{0-inf} . Furthermore, the geometric mean and respective 90% confidence interval (CI) of Losartan / Cozaar® losartan acid percent ratios were 98.5% (91.5 – 106.0%) for C_{max} , 97.9 (93.3 – 102.7%) for AUC_{last} , and 98.1% (93.6 – 102.9%) for AUC_{0-inf} .

Since the 90% CI for C_{max} , AUC_{last} and AUC_{0-inf} were within the 80-125% interval proposed by the US-Food and Drug Administration. It was concluded that the potassium losartan immediate release 50 mg tablet was bioequivalent to the Cozaar® immediate release 50 mg tablet, according to both the rate and extent of absorption. Since there were no significant differences in the bioequivalence assessed by either losartan or losartan acid, future bioequivalence studies on losartan may be performed by quantifying losartan alone as the parent compound is more discriminative.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO GERAL

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

Hoje, este processo na indústria farmacêutica vai muito além, principalmente para os fármacos administrados por via oral na forma farmacêutica de comprimidos ou cápsulas. Estes, após administrados, são solubilizados e em seguida absorvidos para atingir o sítio de ação no seu estado ativo e exercer uma resposta farmacológica. Para esta resposta ser adequada, todas as etapas para a concepção de um medicamento genérico devem ser controladas. A fase embrionária de um medicamento genérico está na avaliação das propriedades físico-químicas da substância ativa, na formulação e na tecnologia de preparação. A bioequivalência, que será detalhado no decorrer deste trabalho, é a prova que todas as etapas foram bem conduzidas, desde o desenvolvimento do medicamento até a etapa estatística da bioequivalência.

O diferencial deste trabalho está no fato de apresentar não apenas um estudo de bioequivalência que em si já apresenta avanços na fase analítica, mas dar um panorama que compreende o desenvolvimento do medicamento até todas as etapas da bioequivalência.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS

As resoluções sobre os Medicamentos Genéricos criada no Brasil em 1999 (ANVISA, 1999) e, mais recentemente, a Resolução sobre medicamentos similares (ANVISA, 2003a) vêm ocasionando um aumento da demanda de realizações de estudos clínicos para avaliação de biodisponibilidade ou bioequivalência de medicamentos. Muitos destes estudos clínicos não são conclusivos, isto é, não são bioequivalentes. A razão disso está na má avaliação do processo inicial que é o desenvolvimento do fármaco. Um desenvolvimento inadequado, na maior parte, ocasiona em uma solubilização não adequada, de forma que também acaba interferindo na absorção. Os principais itens que devem ser verificados no processo de desenvolvimento do fármaco são:

- Polimorfismo;
- Tamanho da partícula;
- Componentes da formula (qualitativamente e quantitativamente);
- Processo de Produção;
- Perfil de dissolução;
- Equivalência Farmacêutica;
- Estabilidade;

- Polimorfismo

É a propriedade de materiais sólidos poderem existir sob mais de uma forma cristalina. Pode ser encontrado em qualquer ativo na forma cristalina. Esta propriedade afeta a solubilidade, biodisponibilidade e as propriedades físico-química da molécula. Uma de muitas técnicas utilizadas para avaliar o polimorfismo é a análise por DSC, que em português quer dizer Calorimetria Exploratória Diferencial. É uma técnica onde se mede a diferença de energia fornecida a substância e um material de referência termicamente inerte, em função da temperatura enquanto a substância e o material inerte são submetidos a uma programação de temperatura controlada, ou seja, uma variação controlada de aquecimento. É uma técnica onde se analisa a diferença de temperatura e o fluxo de calor entre uma amostra e uma referência aquecidas simultaneamente num mesmo forno. Quando uma amostra de um determinado material sofre uma transformação química ou uma mudança de estado físico,

uma quantidade característica de calor é absorvida ou liberada, o que resulta em efeitos endotérmicos ou exotérmicos, respectivamente. Como exemplos podemos citar a fusão onde se observa um efeito exotérmico, já uma transição cristalina pode apresentar tanto um efeito endo quanto exotérmico. O polimorfismo é um fenômeno relativamente comum em fármacos. A estimativa é cerca de 40%.

- Tamanho da partícula;

Quando diminuimos o tamanho da partícula de um princípio ativo, aumentamos a área superficial, promovendo uma solubilização mais rápida, lembrando que a classificação biofarmacêutica baseia-se na solubilidade e na permeabilidade. Quanto menor o tamanho de partícula melhor será a solubilidade que conseqüentemente melhora a biodisponibilidade. Mas, quando o tamanho de partícula é muito reduzido, o processo de fabricação fica prejudicado, principalmente no processo de compressão, na qual, as partículas muito pequenas prejudicam a fluidez nas punções da máquina de compressão. Outra característica importante é a distribuição. Uma distribuição mais estreita minimiza problemas de segregação (ter uma heterogeneidade na mistura) durante o processo de mistura, rendendo uma distribuição mais homogênea dos componentes no produto final. Um exemplo de análise de tamanho de partícula está indicado no Anexo 1.

- Componentes da formula (qualitativamente e quantitativamente);

A fase da formulação é uma das mais importantes para se ter uma bioequivalência. Quando se inicia o desenvolvimento de um medicamento genérico, a única informação existente é a fórmula qualitativa que está presente, por exemplo, na bula do medicamento referência. Enquanto que, a fórmula quantitativa, por motivos de sigilo, não é divulgada. Portanto, a ferramenta utilizada para se ter uma formula bioequivalente é produzir diversos lotes pilotos e testar estes lotes contra um medicamento referência. O principal teste realizado é o perfil de dissolução, auxiliados também pelos testes de desintegração, dureza e friabilidade.

- Processo de Produção;

Aliado a formulação o processo de produção é muito importante. Basicamente, na fabricação de comprimidos, os dois processos mais utilizados são compressão via úmida e compressão via seca. O processo via úmida utiliza um solvente na mistura dos componentes da formula para formar uma pasta, então esta pasta é seca e posteriormente é realizada a

compressão. O processo via seca é mais simples, na mistura de componentes não se utiliza um solvente, esta mistura de componentes, depois de homogeneizado, é comprimida para formar o comprimido. Estrategicamente, para a indústria farmacêutica, o melhor processo é por via seca, pelo fato de ser um processo mais rápido, com menos etapas, com a utilização de menos equipamentos, que a via úmida e, principalmente, um processo mais barato.

- Perfil de dissolução;

Diferente da dissolução em tempo fechado, que é realizado para fins de controle de qualidade, o perfil de dissolução é um método discriminativo. Como o objetivo é a bioequivalência, este teste deve ser realizado em um meio biorelevante. Isto é, tem que ter a capacidade de avaliar qual seria o impacto de alguma modificação na formula para a bioequivalência. Nesta fase do desenvolvimento, os testes de perfil de dissolução são realizados entre lotes com modificações nos componentes da formula e no processo de produção contra um lote referência (preferencialmente mesmo lote a ser utilizado na bioequivalência). No perfil de dissolução avaliam-se dois itens:

F1 – é a porcentagem da diferença entre duas curvas em cada ponto de coleta. Mede o erro relativo entre duas curvas. Observação: Esta diferença tem que estar em modulo;

F2 – mede a semelhança na porcentagem de dissolução entre duas curvas;

Formulas:

$$F_1 = \frac{\sum_{t=1}^n (R_t - T_t)}{\sum_{t=1}^n R_t} \times 100$$

$$F_2 = 50 \times \log \{ [1 + (1/n) \times \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2]^{-0,5} \times 100 \}$$

Onde:

- n = número de tempos de coleta;
- R_t = valor de porcentagem dissolvida no tempo t, obtido com o medicamento de referência ou com a formulação original (antes da alteração);
- T_t = valor de porcentagem dissolvida do produto teste ou da formulação alterada, no tempo t;

O critério de aceitação é:

F₁ entre 0 a 15

F₂ entre 50 a 100

No Anexo 2 está indicado um perfil de dissolução realizado entre o medicamento teste Losartan Potássico (50mg) comprimidos de liberação imediata e medicamento referência Cozaar[®] da Merck Sharp & Dohme Farmacêutica.

- Equivalência Farmacêutica;

Equivalentes Farmacêuticos: São medicamentos que contêm o mesmo fármaco, isto é, mesmo sal ou éster da mesma molécula terapeuticamente ativa, na mesma quantidade e forma farmacêutica, podendo ou não conter excipientes idênticos. Devem cumprir com as mesmas especificações atualizadas da Farmacopéia Brasileira e, na ausência destas, com as de outros códigos autorizados pela legislação vigente ou, ainda, com outros padrões aplicáveis de qualidade, relacionados à identidade, dosagem, pureza, potência, uniformidade de conteúdo, tempo de desintegração e velocidade de dissolução, quando for o caso. (Anvisa, 2004)

- Estabilidade;

A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem. (Anvisa, 2005)

O estudo de estabilidade contempla o princípio ativo e o medicamento. O estudo de estabilidade no ativo é realizado em condições diversas como em meio ácido, em meio básico, com temperatura e com luz (foto sensível). Neste estudo, além de avaliar a estabilidade é possível avaliar possíveis degradantes. No medicamento existem basicamente três tipos básicos de estudos de estabilidade:

- Estudo de Estabilidade Acelerado: estudo projetado para acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento. Os dados assim obtidos, juntamente com aqueles derivados dos estudos de longa duração, podem ser usados para avaliar efeitos químicos e físicos prolongados em condições não aceleradas e para avaliar o impacto de curtas exposições a condições fora daquelas estabelecidas no rótulo do produto, que podem ocorrer durante o transporte.

- Estudo de Estabilidade de Longa Duração: estudo projetado para verificação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico

durante e, opcionalmente, depois do prazo de validade esperado. Os resultados são usados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento.

- Estudo de Estabilidade de Acompanhamento: estudo realizado para verificar que o produto farmacêutico mantém suas características físicas, químicas, biológicas, e microbiológicas conforme os resultados obtidos nos estudos de estabilidade de longa duração.

Para efeitos de bioequivalência, o estudo realizado no ativo tem grande importância, pelo fato de avaliar a estabilidade e possível degradação. O estudo de estabilidade no medicamento também tem importância pelo fato de avaliar se existe alguma possível interação entre ativo e excipientes da fórmula.

2.2. BIOEQUIVALÊNCIA

Finalizado a fase de desenvolvimento do medicamento e a realização de todos os testes, inicia-se o planejamento para o estágio clínico, ou seja, a criação do protocolo clínico. Este protocolo clínico deve ser submetido a um comitê de ética para a autorização da realização da etapa clínica. Inclusive, alguns comitês exigem uma cópia do relatório de equivalência farmacêutica e do perfil de dissolução. Após aprovação do comitê de ética, pode-se iniciar a bioequivalência, que se subdivide em três fases: clínica, analítica e estatística.

De acordo com a resolução RDC nº 135 de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), dois medicamentos são ditos bioequivalentes quando são administrados na mesma dose molar, nas mesmas condições experimentais e não apresentam diferenças estatisticamente significativas em relação a biodisponibilidade. Um medicamento bioequivalente deve ser considerado equivalente farmacêutico, ou seja, conter o mesmo fármaco, isto é, sal ou éster da mesma molécula ativa, na mesma quantidade e forma farmacêutica, podendo ou não conter excipientes idênticos (Anvisa, 2003b).

Doses únicas dos medicamentos teste e referência são administradas em períodos diferentes, com o segundo produto somente administrado depois de um intervalo adequado para garantir que não haja um efeito residual do primeiro fármaco, que aumentaria artificialmente os resultados do segundo. As amostras sanguíneas são coletadas para

posterior quantificação antes e após a administração de cada formulação e em intervalos pré-estabelecidos para obtenção dos perfis farmacocinéticos necessários para se determinar a bioequivalência.

2.2.1. ETAPA CLÍNICA

Esta fase inicia-se com o recrutamento de voluntários (Anexo 4). O número de voluntários recrutados deverão sempre assegurar poder estatístico suficiente para garantir a confiabilidade dos resultados do estudo de bioequivalência. O número de voluntários pode ser calculado por meio do coeficiente de variação e poder do teste, porém a Anvisa não permite a utilização de número inferior a 12 voluntários. Na falta de dados relativos ao coeficiente de variação do fármaco, o pesquisador responsável pelo estudo pode optar por utilizar um número mínimo de 24 voluntários. O protocolo do estudo deve estabelecer número suficiente de voluntários prevendo possíveis "dropouts" (Anvisa, 2006).

De acordo com o medicamento, os estudos poderão ser conduzidos em voluntários com idade superior a 18 anos e capazes de fornecer seu consentimento livre e esclarecido, do sexo masculino, feminino ou ambos, sendo que neste último caso, recomenda-se que o número de homens e de mulheres seja distribuído igualmente entre as seqüências. Se o medicamento for indicado para pacientes com características específicas de idade e sexo, o estudo deverá ser integralmente realizado em voluntários com essas características.

O peso dos voluntários deverá estar em um limite de $\pm 15\%$ do peso considerado ideal para homens e mulheres, levando-se em consideração altura e estrutura física.

O protocolo clínico do estudo e o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 5) devem ser submetidos e aprovados por um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) credenciado no Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Conselho Nacional de Saúde/MS.

A Inclusão dos voluntários no estudo deve ser determinada pelo estado de higiene dos mesmos, comprovado através de história clínica, exame físico e laboratorial realizados pela equipe de médicos e enfermeiros. A razão dessa triagem é aumentar a segurança para o

voluntário e evitar a presença de processos patológicos que interferem na farmacocinética dos fármacos e que poderiam gerar resultados incorretos.

Os voluntários selecionados não devem apresentar doenças cardíacas, hepáticas, renais, pulmonares, neurológicas, gastrointestinais e hematológicas, avaliadas no exame médico, ECG e exames laboratoriais: glicose sangüínea, uréia, creatinina, TGO (Aspartato aminotransferase - AST), TGP (Alanina aminotransferase - ALT), fosfatase alcalina, γ -GT (γ -Glutamiltransferase), bilirrubina total, albumina, proteína total, triglicerídeos, colesterol total, hemoglobina, hematócrito, contagem total e diferencial de células brancas, velocidade de hemossedimentação e exame de urina. Os voluntários devem apresentar exame negativos para HIV, hepatite B, C e β -HCG para mulheres. Todos os exames passaram por repetição ao final do estudo.

Devem ser excluídos voluntários que antes do estudo: Fizeram uso regular de qualquer medicação por até duas semanas (para evitar interações medicamentosas); Administraram qualquer fármaco experimental por até três meses; Doaram ou perderam 450mL de sangue ou mais nos três meses que antecederam ao ensaio; Apresentaram história de abuso de álcool ou drogas; Tiveram internação hospitalar recente; Apresentaram qualquer outro motivo, no qual, no julgamento do investigador possa por em risco a integridade física do voluntário ou que interfira na interpretação final dos resultados do estudo.

O estudo convencional é do tipo aberto, aleatório (randomizado, ver Anexo 3), cruzado. Os voluntários recebem os medicamentos teste e referência em ocasiões separadas (períodos), em esquema de dose simples ou múltipla. Os medicamentos devem ser administrados aos voluntários com volume de líquido padronizado (geralmente 200 mL de água).

O cronograma de coleta das amostras deverá garantir a adequada caracterização do perfil plasmático do fármaco ou metabólito (concentração versus tempo), contemplando um tempo igual ou superior a 3-5 vezes a meia-vida de eliminação dos mesmos, para garantir que não haja um efeito residual do primeiro fármaco administrado, que inflaria artificialmente os resultados do segundo período. A existência de voluntários de ambos os grupos de tratamento distribuído nos dois períodos de internação evita que possíveis

intercorrências possam influenciar na bioequivalência dos fármacos administrados, já que as variações iriam acontecer para os dois grupos testados.

A cada coleta sangüínea é necessário verificar as pressões arteriais sistólicas e diastólicas (medidas de forma não invasiva através de um esfigmomanômetro) e a frequência cardíaca.

2.2.2. ETAPA ANALÍTICA

a) Considerações Gerais

A Etapa Analítica devem ser realizadas de acordo com as normas internacionais de Boas Práticas de Laboratório (BPL) e conforme o GUIA PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E BIOANALÍTICOS, conforme Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

Devem ser realizados estudos de estabilidade do analito (fármaco ou metabólito) nos líquidos biológicos. Todas as determinações com valores menores do que o Limite Quantificação (LOQ) deverão ser consideradas iguais a zero, para os cálculos estatísticos;

Os principais tópicos abordados em uma etapa analítica de uma bioequivalência são basicamente: extração, técnica cromatográfica, detecção e a validação do método.

b) Extração

As técnicas de separação, tais como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a cromatografia gasosa (GC) e a eletroforese capilar (CE), são perfeitamente adequadas para a análise de amostras contendo inúmeros componentes. No entanto, a determinação de analitos presentes em matrizes complexas, tais como plasma, soro, sangue total, homogenatos de tecidos, saliva ou urina, geralmente requer processos prévios de preparação das amostras bem elaborados. Vários motivos justificam estes procedimentos, destacando-se a necessidade de eliminação prévia de parte dos componentes devido à complexidade das matrizes biológicas, a existência de proteínas que podem adsorver nas colunas cromatográficas ou nos capilares, além da necessidade de uma etapa de

concentração das substâncias a serem analisadas, geralmente presentes em nível de traços (Gilar, M, 2001; Queiroz, S. C. N., 2001).

As técnicas mais comumente utilizadas para extração e/ou pré-concentração de compostos presentes em fluidos biológicos são a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (Kataoka, H.,2003).

c) Técnica Cromatográfica

Por possibilitar a detecção de quantidades mínimas de compostos em matrizes de natureza complexa, a cromatografia líquida de alta eficiência associada à espectrometria de massas (CLAE-EM/EM) tem sido a técnica mais empregada nos últimos anos para a quantificação de fármacos em estudos farmacocinéticos (kauppila, 2004).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) permite a separação do(s) composto(s) de interesse dos demais compostos eventualmente presentes na matriz biológica, como é o caso do plasma humano, evitando que um número elevado de interferentes prejudique a detecção do fármaco, auxiliando, assim, na seletividade do método de quantificação.

Já a espectrometria de massas (EM) permite que sejam atingidos padrões elevados de especificidade, necessários à adequada identificação das estruturas moleculares dos fármacos, em meio a outros componentes da matriz biológica ou metabólitos da droga que não foram afastados através da CLAE.

A associação destas duas técnicas é particularmente interessante no sentido de que seu uso permite que o tempo investido em cromatografia seja menor que o usualmente necessário quando a separação cromatográfica esta acoplada a outros métodos de detecção, como por exemplo, por ultravioleta. Assim, estas associações proporcionam maior velocidade na análise de amostras, essencial em estudos de biodisponibilidade, que via de regra, envolvem centenas de quantificações.

Além da rapidez, o desenvolvimento de métodos analíticos para avaliação do perfil farmacocinéticos de fármacos implica atingir alta sensibilidade, quer para fase de

eliminação, quer em função das baixas concentrações não raro encontradas, devido às características do fármaco e posologia empregadas.

A escolha do método empregado implica, em última análise, otimizar a sensibilidade e a especificidade, atendendo aos demais quesitos de validação da metodologia envolvida, sobretudo no que se refere à exatidão, precisão e recuperação do método, definidas para quantificação de amostras em matrizes biológicas.

Considerando-se que a espectrometria de massas é uma técnica baseada na identificação da razão massa-carga de íons, para a sua utilização, é fundamental a possibilidade de ionização dos compostos de interesse, sem o que não é possível discriminá-los de outros elementos e, tampouco, detectá-los através da mensuração do fluxo de íons que atinge o detector.

Outro aspecto fundamental é o de que a discriminação e a detecção se dão em fase gasosa, o que implica a utilização de um mecanismo que possibilite a transição dos compostos contidos no eluente proveniente da cromatografia líquida de alta eficiência para a fase gasosa.

Assim, para que ocorra a associação da cromatografia líquida de alta eficiência à espectrometria de massas, é necessário o emprego de uma interface que permita efetuar esta mudança de fase, bem como a ionização dos compostos de interesse.

De sua vez, o desenvolvimento de técnicas de ionização à pressão atmosférica (API) foi de fundamental importância para que a referida associação se transformasse em um método rotineiro, possibilitando o desenvolvimento de métodos quantitativos com elevado desempenho e alta sensibilidade e especificidade (Pereira et al., 2005^a). Nesse sentido, as técnicas mais largamente empregadas são a ionização por eletronebulização (ESI) e a ionização química em pressão atmosférica (APCI).

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

Ao deixar o capilar, o líquido é vaporizado, formando minúsculas gotículas carregadas eletricamente que, por sua vez, são submetidas a um fluxo de Nitrogênio, destinado à evaporação do solvente.

Conforme descrito por Watson (1997), na medida em que as gotículas vão reduzindo de tamanho, devido à evaporação do solvente, ocorre o aumento da força de repulsão entre os íons de mesma carga, até ponto que a força coulombica é suficientemente forte para romper a tensão superficial dessas gotículas, implicando a dissorção dos íons para a fase gasosa.

De outro lado, conforme relatado por Kauppila (2004), este fenômeno também pode ser explicado pelo fato de que o aumento da carga, em função da diminuição da área de superfície das gotículas acaba por produzir uma fissão coulombica quando o limite de instabilidade de Rayleigh é atingido, resultado em gotículas cada vez menores, até se alcançar um estado em que as moléculas encontrar-se-iam em suspensão (fase gasosa).

Já em fase gasosa, ocorrem reações químicas, resultando na ionização dos compostos de interesse. Os íons formados são tipicamente íons quasimoleculares, ou seja, moléculas protonadas ($[M+H]^+$) ou aductos ($[M+NH_4]^+$, $[M+Na]^+$), no caso de ionização em modo positivo, ou moléculas desprotonadas ($[M-H]^-$), no caso de ionização em modo negativo, e que portanto mantém intactas as estruturas moleculares originais. São mais favorecidas por este tipo de processo as substâncias iônicas ou polares, uma vez que o campo elétrico no capilar propicia a dissociação e a formação de íons já em solução.

A eletronebulização é considerada uma técnica de ionização branda, eficiente na ionização de moléculas polares, lábeis, bem como as de peso molecular elevado, situação comum a um número considerável de drogas e metabólitos.

O desenvolvimento de métodos, utilizando esta técnica, além de propiciar o melhor conhecimento da mesma, é de fundamental importância para sua consolidação. Inserido nesse contexto, o presente trabalho é uma contribuição no sentido de auxiliar na elucidação dos mecanismos envolvidos e propiciar a aplicação desta “ferramenta” na rotina de estudos farmacocinéticos conduzidos no País.

Cabe ainda salientar que a pesquisa de desenvolvimento de novas medicações é uma das atividades que mais se intensificam na indústria farmacêutica. Conseqüentemente, considerando o grande número de novos compostos sintetizados e avaliados através de programas de pesquisa, torna-se imprescindível o desenvolvimento de métodos e a disponibilidade de ferramentas capazes de avaliar estes fármacos em potencial. Estas avaliações incluem não somente a atividade biológica, mas também aquelas relativas à biodisponibilidade, propriedades farmacocinéticas, estabilidade, entre outras, de forma a garantir que somente as entidades químicas efetivamente mais promissoras cheguem à fase de avaliação por intermédio de estudos clínicos, recursos cada vez mais escassos e caros.

d) Validação do Método Analítico

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 estejam sendo empregados. Para tanto, são utilizados os seguintes parâmetros e respectivos limites de aceitação:

- Especificidade – Realiza-se a investigação quanto a presença de interferência, utilizando-se o procedimento proposto para a extração de amostras. São utilizadas amostras de plasma de 6 diferentes indivíduos, das quais 4 colhidas em jejum; 1, hiperlipêmica e 1 com hemólise. 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 destas, numa concentração próxima ao *Limite de Quantificação (LOQ)*;
- Sensibilidade – Utiliza-se para a avaliação da sensibilidade o Limite de Quantificação (LOQ), de forma a considerar não somente a capacidade de detecção do método, mas também em função dos critérios de precisão e acurácia do mesmo. O LOQ é aprovado se forem satisfeitos os seguintes critérios: Inexistência de interferência ou resposta 5 vezes maior que qualquer interferência existente nos cromatogramas de *plasmas brancos* nos tempos de retenção em uso; Pico da droga (*analyte*) identificável, claro, discreto com uma precisão de 20%, calculada através do coeficiente de variabilidade do valor quantificado para

8 alíquotas provenientes de um mesmo controle padrão, bem como da correspondente duplicata da curva de calibração em uso; 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. A curva de calibração, cujos pontos são quantificados em duplicata, é aprovada se forem satisfeitos os seguintes critérios: Pelo menos 4 de 6 padrões das diferentes concentrações, incluindo o padrão correspondente ao LOQ e o padrão de maior concentração, com desvio menor do que 15% da respectiva concentração nominal (menor que 20% para o LOQ) em pelo menos uma das duplicatas; Coeficiente de correlação da curva igual ou maior que 0.97.

- Precisão e Acurácia – É avaliada 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). Seguem-se os critérios utilizados para aprovação destes quesitos: Precisão: para cada concentração, o coeficiente de variabilidade (CV%); calculado com 5 alíquotas, não pode exceder 15%. Acurácia: para cada concentração, a média da concentração calculada a partir de 5 alíquotas deve situar-se entre 85% e 115% do valor nominal da concentração padrão em questão.

- Reprodutibilidade – É avaliada a partir da determinação da precisão e acurácia de 3 lotes provenientes de matrizes biológicas distintas (precisão e acurácia inter-lote) através da quantificação, para cada um dos lotes, 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. Seguem-se os critérios utilizados para aprovação destes quesitos: Precisão: para cada concentração, o coeficiente de variabilidade (CV%); calculado sobre a concentração média obtida em cada lote, não pode exceder 15%; Acurácia: para cada concentração, a média calculada considerando em conjunto todos os valores de concentração obtidos, deve situar-se entre 85% e 115% do valor nominal da concentração padrão em questão.

A estabilidade dos compostos é determinada em função do tempo necessário para preparação de 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:

- 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;
- Congelamento e descongelamento – Determina a estabilidade da droga em plasma após 3 ciclos de congelamento por 24 horas e descongelamento em temperatura ambiente;
- 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;
- 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;
- 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;

2.2.3. ETAPA ESTATÍSTICA

Para a avaliação da biodisponibilidade e bioequivalência de dois medicamentos são determinados os parâmetros farmacocinéticos que melhor se correlacionam com os efeitos terapêuticos no organismo. Estes parâmetros relacionam-se com a quantidade de fármaco absorvida e à velocidade do processo de absorção.

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

Os seguintes parâmetros farmacocinéticos foram determinados:

- Área sob a Curva da Concentração Plasmática versus Tempo (AUC) - relaciona-se com a quantidade ou a extensão de absorção do fármaco e pode ser calculada pelo método trapezoidal e expresso em unidades de concentração vezes tempo.
- Área sob a Curva do Tempo Zero ao Tempo T (AUC_{0-t}) - relaciona-se com a quantidade do fármaco absorvida do tempo zero ao tempo t, onde t é a última coleta determinada experimentalmente.
- Área sob a Curva da Concentração Plasmática versus Tempo, de Zero ao Infinito ($AUC_{0-\infty}$) - relaciona-se com a quantidade ou a extensão de absorção da fármaco. A quantidade da absorção sistêmica do fármaco é diretamente relacionada com AUC que é geralmente calculado pelo método trapezoidal e expresso em unidades de concentração vezes tempo. A área sob a curva de concentração sanguínea versus tempo, calculada do tempo zero ao tempo infinito (ASC_{0-inf}), onde $ASC_{0-inf} = ASC_{0-t} + C_t/k$, onde C_t é a última concentração do fármaco determinada experimentalmente (acima do limite de quantificação) e k é a constante de eliminação da fase terminal.
- Concentração Máxima Atingida no Plasma (C_{max}) - concentração mais elevada do fármaco atingida na circulação sanguínea após sua administração. O C_{max} ideal deve estar dentro da janela terapêutica.
- Meia Vida de Eliminação do Fármaco ($t_{1/2}$) - representa o tempo em que a concentração do fármaco no plasma é reduzida à metade. Calcula-se através do logaritmo neperiano (ln) de 2 ($\ln 2 = 0,693$) dividido pela constante de eliminação. $t_{1/2} = \ln 2/K$.
- Tempo correspondente à Concentração Máxima Atingida no Plasma (T_{max}) - tempo correspondente para que o fármaco atinja a concentração máxima (C_{max}).

2.3. LOSARTAN

O Losartan, 2-butil-4-cloro-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)[1,1'-bifenil]-4-il]metil]-1H-imidazol-5-metanol, é um ácido cuja fórmula molecular é $C_{22}H_{23}ClN_6O$. Atua como antagonista potente não-peptídico do receptor da angiotensina II, tendo alta afinidade e seletividade pelo receptor AT-1, sem apresentar atividade agonistas nem efeitos de abstinência após a suspensão da terapêutica em pacientes hipertensos. Ele inibe a ligação da angiotensina II a este receptor, acarretando aumento na atividade de renina plasmática e consequentes aumentos na concentração da angiotensina II plasmática. É melhor tolerado que vários outros agentes anti-hipertensivos. O metabolito ativo, losartan ácido é de 10 a 40 vezes mais potente que losartan. O pico na concentração plasmática do losartan e do seu metabolito ativo são respectivamente 1 hora e 3-4 horas. [Burnier 2001; Sifton 2001].

A vantagem do Losartan, comparado com os demais medicamentos anti-hipertensivos existentes, reside no fato dele não apresentar atividades conseqüentes do seu antagonismo nem efeitos de abstinência após a suspensão da terapêutica. Losartan é mais bem tolerado quando comparado a vários outros agentes anti-hipertensivos.

O Losartan, administrado por via oral com ou sem diuréticos, é bem absorvido do trato gastrointestinal. A biodisponibilidade é de 33%, sofre substancial eliminação pré-sistêmica pelo sistema citocromo P450. A ligação às proteínas é muito alta: do Losartan: 98,7% e do Losartan Ácido: 99,8%. A ação, em dose simples, dura 24 horas ou mais. A meia-vida de eliminação do losartan é cerca de duas horas e do metabolito losartan ácido é de 6 a 9 horas.

3. OBJETIVO

3. OBJETIVO

Avaliar a bioequivalência de duas formulações de Losartan Potássico (50mg) comprimidos de liberação imediata (Losartan do Laboratório Cristália Ltda, Brasil, como formulação teste e Cozaar[®] da Merck Sharp & Dohme Farmacêutica Brasil como formulação referência) em vinte e cinco voluntários de ambos os sexos.

Medicamento Teste

Losartan Potássico 50 mg comprimidos de liberação imediata.

Fabricante: Laboratório Cristália Ltda, Brasil.

Lote: 048/03

Validade: Março / 2005

Medicamento Referência

Cozaar[®] 50 mg comprimidos de liberação imediata.

Fabricante: Merck Sharp Dohme Farmacêutica Ltda, Brasil.

Lote: 382KA

Validade: Junho / 2004

4. ARTIGO PUBLICADO

4. ARTIGO PUBLICADO

C.H. Oliveira, R. Medeiros Silva, V. Santagada, G. Caliendo, E. Perissutti, M. Prado Galuppo, V marcondes Rezende, R.E. Barrientos-Astigarraga, G. Duarte Mendes, and G. De Nucci. Comparative bioavailability of two losartan formulations in healthy human volunteers after a single dose administration. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, Vol. 44 – N° 3/2006 (pg 142-148).

Dear Doctor Medeiros Silva,

You can use the article for your thesis. No charges apply.

Regards,

Joerg Feistle
Dustri-Verlag, Inc.
P.O. Box 561205
Rockledge, FL 32956-1205
Phone (321)594-4340
Fax (321)414-0219
Email Joerg.Feistle@dustri.com
<http://www.dustri.com>, <http://www.clinnephrol.com>, <http://www.clinpharmacol.com>

Von: Renato Silva - P&D-MP [mailto:renato.medeiros@ems.com.br]

Gesendet: Donnerstag, 5. November 2009 17:23

An: Joerg.Feistle@dustri.com

Cc: gugamendes@terra.com.br

Betreff: ENC: Paper Losartan

Dear Dr. Joerg Feistle

I am finishing my work in a defense of master's thesis in my university (UNICAMP - Campinas (SP) - Brazil. And this thesis is related to a job that I was co-author: "Comparative bioavailability of two losartan formulations in healthy human volunteers after a single dose administration, the International Journal of Clinical and Therapeutics, Vol 44 - No. 3 / 2006 (142 -148)".

I need a permit (copy right) to promote this work.

Regards

Thanks

Renato Medeiros Silva (R. Medeiros Silva)



Comparative bioavailability of two losartan formulations in healthy human volunteers after a single dose administration

C.H. Oliveira¹, R. Medeiros Silva¹, V. Santagada³, G. Caliendo³, E. Perissutti³, M. Prado Galuppo¹, V. Marcondes Rezende¹, R.E. Barrientos-Astigarraga¹, G. Duarte Mendes^{1,2} and G. De Nucci^{1,2}

¹Cartesius Development of Clinical Research, Caminas, ²Department of Internal Medicine, State University of Campinas, Campinas/SP, Brazil, and

³Dipartimento di Chimica Farmaceutica e Tossicologica, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli, Italy

Key words
mass spectrometry –
bioequivalence –
valsartan – LC-MS-MS

Abstract. Objective: To compare the bioavailability of two potassic losartan immediate release tablet (50 mg) formulations (Losartan from Laboratórios Cristália Ltd., Brazil, as a test formulation and Cozaar[®] from Merck Sharp & Dohme Farmacêutica Ltd., Brazil, as a reference formulation) in 25 volunteers of both sexes. **Material and methods:** The study was conducted in an open, randomized, 2-period crossover design and a 1-week washout period. Plasma samples were obtained over a 24-hour interval. The concentrations of losartan and its active metabolite losartan acid were analyzed by combined reversed phase liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) with negative ion electrospray ionization using a selected ion monitoring method. From the losartan and losartan acid plasma concentrations vs. time curves the following pharmacokinetic parameters were obtained: AUC_{last}, AUC_{0-inf} and C_{max}. **Results:** The geometric mean and respective 90% confidence interval (CI) of Losartan/Cozaar[®] losartan percent ratios were 92.9% (82.2 – 105.0%) for C_{max}, 99.0% (92.5 – 105.9%) for AUC_{last}, and 99.1% (92.7 – 105.8%) for AUC_{0-inf}. Furthermore, the geometric mean and respective 90% CI of Losartan/Cozaar[®] losartan acid percent ratios were 98.5% (91.5 – 106.0%) for C_{max}, 97.9% (93.3 – 102.7%) for AUC_{last}, and 98.1% (93.6 – 102.9%) for AUC_{0-inf}. **Conclusion:** Since the 90% CI for C_{max}, AUC_{last} and AUC_{0-inf} were within the 80 – 125% interval proposed by the US Food and Drug Administration, it was concluded that the potassic losartan immediate release 50 mg tablet was bioequivalent to the Cozaar[®] immediate release 50 mg tablet, according to both the rate and extent of absorption. While there were no significant differences in the bioequivalence assessed by either losartan or losartan acid, future bioequivalence studies

on losartan may be performed by quantifying losartan alone as the parent compounds are more discriminative.

Introduction

Losartan, 2-butyl-4-chloro-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-yl)][1,1'-biphenyl]-4-yl]methyl]-1H-imidazole-5-methanol, C₂₂H₂₃ClN₆O, is a non-peptide angiotensin II receptor antagonist used as an antihypertensive agent. Losartan and its principal active metabolite block the vasoconstrictor and aldosterone-secreting effects of angiotensin II by type AT₁ receptor blockage. The active metabolite, losartan acid, is 10 – 40 times more potent by weight than losartan. Mean peak plasma concentration of losartan and its active metabolite are reached in 1 hour and 3 – 4 hours, respectively [Burnier 2001, Sifton 2001].

The objective of this study was to evaluate, in healthy volunteers, the bioequivalence of a test formulation of 50 mg (immediate release tablet) of potassic losartan, elaborated by Laboratórios Cristália Ltd., Brazil (Losartan) and a commercial formulation of 50 mg (immediate release tablet) of losartan (Cozaar[®]) made by Merck Sharp & Dohme Farmacêutica Ltd., Brazil, employed as a reference formulation.

Methods

Bioequivalence study

26 healthy volunteers of both sexes between 21 and 45 years of age and within 15%

Received
August 13, 2004;
accepted
December 6, 2005

Correspondence to
G. De Nucci, MD, PhD
415 Jesuino Marcondes
Machado Ave,
13092-320, Campinas –
SP, Brazil
denucci@dglnet.com.br

of the ideal body weight were selected for the study. The male group was composed of 13 volunteers (29.0 ± 4.6 years, mean $\pm$ s.d.m; range 23 – 39 years), height between 158 and 181 cm (170.9 ± 7.1 cm), weighing between 60.3 and 81.6 kg (71.5 ± 6.9 kg). The female group was also composed of 13 volunteers (28.1 ± 6.8 years; range: 21 – 44 years), height between 153 and 169 cm (161.5 ± 5.1 cm), weighing between 51.9 and 72.5 kg (63.7 ± 6.7 kg).

All subjects gave written informed consent and the State University of Sao Paulo ethics committee approved the clinical protocol. All volunteers were healthy as assessed by physical examination, electrocardiogram, and the following laboratory tests: blood glucose, urea, uric acid, creatinine, alkaline phosphatase, aspartase and alanine aminotransferases, γ -glutamyltransferase, total bilirubin, albumin and total protein, triglyceride, total cholesterol, hemoglobin, hematocrit, erythrocyte sedimentation rate, total and differential white cell and platelet counts, and routine urinalysis. All female volunteers were negative on a pregnancy test. All subjects were negative for human deficiency, hepatitis B (except for serological scar) and hepatitis C virus.

The study was conducted in an open, randomized, 2-period crossover balanced design with a 1-week washout period between doses. During each period, the volunteers were hospitalized at 6:00 p.m. having a normal evening meal, and after an overnight fast starting at 10:00 p.m., they received at 7:00 a.m. a single 50-mg potassic losartan immediate release tablet from either laboratory. Water (200 ml) was given immediately after drug administration. All volunteers then fasted for 2 hours following the drug administration, after which a standard breakfast was consumed. A standard lunch and an evening meal were provided 4 hours and 10 hours after dosing, respectively. No other food was permitted during the in-house period. Liquid consumption was permitted ad libitum after lunch but xanthine-containing drinks including tea, coffee, and cola were prohibited. All subjects were requested to stay in the clinical unit for a 24-hour period after drug administration.

Systolic and diastolic arterial pressure (measured non-invasively with a sphygmomanometer), heart rate and temperature were

recorded just before and at each full-hour sampling collection.

Formulations

The following potassic losartan formulations were employed: losartan immediate release 50 mg tablets (test formulation from Laboratórios Cristália Ltd., Brazil; lot N° 048/03, expiration date Mar/2005) and Cozaar® 50 mg immediate release tablets (standard reference formulation from Merck Sharp & Dohme Farmacêutica Ltd.; Brazil; lot N° 382KA, expiration date Jun/2004).

Pharmacokinetics and statistical analysis

The bioequivalence between the two formulations was assessed according to US-FDA methodology [FDA 1998]. Briefly, the first-order terminal elimination rate constant (k_e) was estimated by linear regression from the points describing the elimination phase on a log-linear plot. Half-life ($t_{1/2}$) was derived from this rate constant ($t_{1/2} = \ln(2)/k_e$). The maximum observed plasma concentration (C_{max}) and the time taken to achieve this concentration (t_{max}) were obtained directly from the curves. The areas under the losartan and losartan acid plasma concentration vs. time curves from 0 – 24 hours (AUC_{all}) and from zero to the last detectable concentration (AUC_{last}) were calculated by applying the linear trapezoid rule. Extrapolation of these areas to infinity (AUC_{0-inf}) was done by adding the value C_{last}/k_e to the calculated AUC_{last} (where C_{last} = the last detectable concentration).

Synthesis of the metabolite

The synthetic procedure, summarized in Table 1, was performed according to that reported in the literature and using a microwave oven (ETHOS 1600, Milestone) especially designed for organic synthesis. The experimental conditions used in our work were similar, with the same concentration of starting material and volume of solvent, to those used by conventional heating.

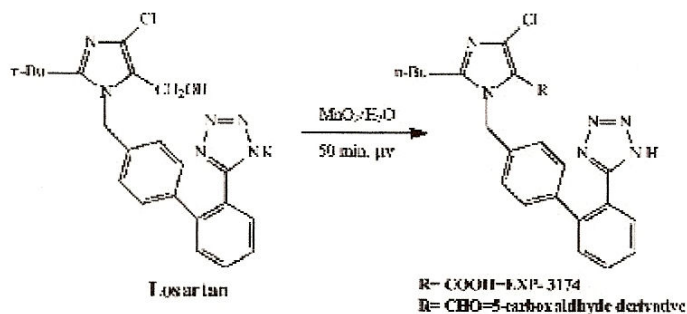


Table 1. Synthetic procedure for the synthesis of losartan acid.

Compound	Conventional heating ^b			Yield ^c (%)	Microwave irradiation		
	Yield ^c (%)	Time (h)	Temp. (°C)		Time (min)	Power (watt)	Temp. (°C)
EXP 3174	9	100	reflux	64	2	200	80
					3	250	120
					5	300	160
					40	350	180
Imidazole-5-carboxaldehyde derivative	30	100	reflux	60	1	200	80
					2	250	120
					3	300	160
					9	350	180

^aall the reactions were performed 3 times and the reaction time and yields given are the average values; ^boil-bath; ^cwith respect to the starting amount of losartan.

All reactions were performed in standard Pyrex glassware with a reflux condenser fitted through the roof of the microwave cavity and were performed by microwave program which was composed by appropriate ramping and holding steps. Identification of the optimum profile power/time and temperature for the synthesis was reported in Table 1. The temperature of the stirred reaction mixture was monitored directly by a microwave-transparent fluoroptic probe inserted into the solution.

The general procedure reported in Table 1 is as follows: EXP-3174 was prepared from potassic losartan (1.47 g, 3.5 mmol; acquired from Biosintetica Ltd.) by oxidation with activated manganese dioxide in 20 ml of H₂O by application of microwave energy for 50 min. The desired parameters (microwave power, temperature and time) were set as reported in Table 1. The reaction was monitored by TLC. After irradiation, the solution was treated as follows. The excess of MnO₂ was filtered, the solvent was removed and the crude residue was purified by RP-HPLC preparative ob-

taining 1.0 g (2.28 mmol, yield = 64%) of EXP-3174 and 0.11 g (0.253 mmol, yield = 7%) of the corresponding aldehyde. The remaining 29% percentage was untransformed potassic losartan and impurities. EXP-3174 and the corresponding 5-carboxaldehyde derivative were characterized by ¹H NMR and by MS and the data were consistent with the considered structures.

The main advantage to this synthetic route is that a short time of irradiation of the mixture reaction provided the imidazole-5-carboxaldehyde as the major product. In fact a time of irradiation of 15 min furnished a 8 : 2 ratio of the imidazole-5-carboxaldehyde derivative. In contrast, a prolonged irradiation (50 min) furnished a 9 : 1 ratio of EXP-3174. If the application of microwave energy was performed for longer time (> 50 min), the losartan was not completely transformed in the corresponding acid derivative.

Drug analysis

Losartan, losartan acid and the internal standard (valsartan) were extracted from plasma samples by solid-phase extraction using HLB Oasis[®] SPE cartridges. The compounds were eluted with 1 ml of a solution containing 35 mM of ammonia in methanol, and then, the solvent was dried and the residues were reconstituted in 0.2 ml of mobile phase. An aliquot of that was analyzed by combined reversed phase liquid chromatography with tandem mass spectrometry in negative ion electrospray ionization using multiple reaction monitoring (MRM).

Briefly, 500 μl of human plasma sample was added to a glass tube followed by internal standard (50 μl of valsartan 1.0 μg/ml). After vortex-mixing for 10 sec, 500 μl of washing solution (aqueous phosphoric acid 7M solution) was added to each sample. Each tube was vortex-mixed for 40 sec. HLB Oasis SPE cartridges were pre-conditioned with 2 ml of hydrochloric acid solution (10 mM), 2 ml of methanol followed by 2 ml of hydrochloric acid solution (10 mM). The full quantity of each sample solution was applied to individual unused cartridges. The cartridges were then washed 4 times with 1 ml of hydrochloric acid solution (10 mM), and then placed into 15 × 120 mm glass tubes and eluted with

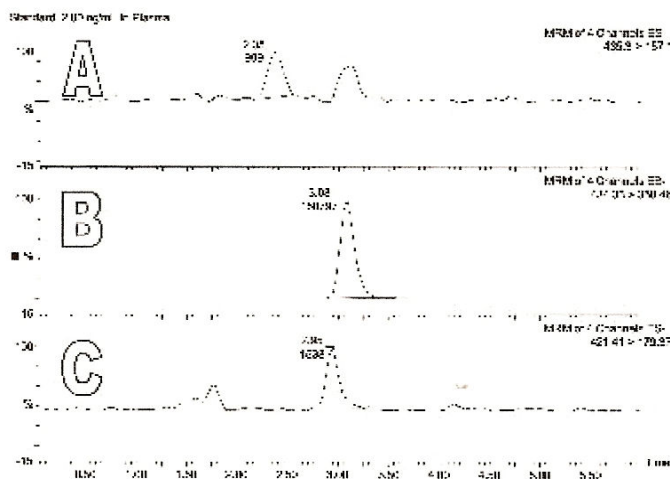


Figure 1. MRM chromatograms of the LOQ sample (2.0 ng/ml): (A) losartan acid, (B) valsartan, and (C) losartan.

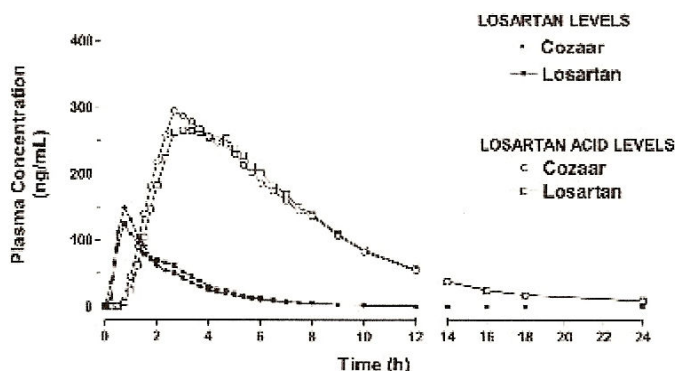


Figure 2. Mean losartan and losartan acid plasma concentrations vs. time curve for two losartan immediate release tablet formulations ($n = 25$).

1 ml of elution solution (35 mM of ammonia in methanol). The solvent was gently evaporated at 40 °C under a nitrogen flow, and the residue was then reconstituted with 0.2 ml of acetonitrile/ water (60 : 40; v/v) + 10 mM ammonium acetate + 11.2 mM formic acid solution. The reconstituted solution was then vortex-mixed for 15 sec and transferred to individual vials that were capped and finally placed into the auto-injector racks.

Chromatographic conditions

An aliquot (30 μ l) of each plasma extract was injected into an Alltech Prevail C₁₈ 5 μ m analytical column (150 mm $\times$ 4.6 mm i.d.) op-

erating at room temperature. The compounds were eluted by pumping the mobile phase (acetonitrile and water (60/40; v/v) containing 12 mM formic acid) at a flow rate of 0.8 ml/min diluted approximately 1 : 10. Under these conditions, typical standard retention times were 3.0 min for losartan and its active metabolite, and 3.5 min for valsartan, and back-pressure values of approximately 60 – 70 bar were observed. The temperature of the auto-sampler was kept at 5 °C and the run-time was 5.0 min.

Mass-spectrometric conditions

The mass spectrometer (Micromass model Quattro Ultima) was equipped with an electrospray ion source running in negative mode (ES⁻), and set up in multiple reaction monitoring (MRM), monitoring the transitions 421.41 > 179.37 and 435.30 > 157.10 for losartan and losartan acid, and 434.33 > 350.46 for valsartan, respectively.

In order to optimize all the MS parameters, working solutions (10 μ g/ml) of the analytes and IS were infused (at 30 μ l/min) into mass spectrometer. For each losartan, losartan acid, and the internal standard, the following optimized parameters were obtained: the dwell time and the collision gas pressure (argon) were 0.2 sec and 1.5×10^{-3} mBar, respectively. The cone voltage and the collision energy were 40 V and 20 eV for losartan, 30 V and 15 eV for losartan acid, and 20 V and 20 eV for valsartan. Data acquisition and analysis were performed using the software Mass Lynx (v 3.5) running under Windows NT (v 4.0) on Pentium PC.

The analysis was conducted and the method was fully validated in accordance with the study protocol and FDA Guidelines for Analytical Methods Validation, including parameters such as sensitivity, specificity, linearity, accuracy, precision and reproducibility. The intra- and inter-batch accuracy and precision were analyzed in four levels of concentrations: LOQ (limit of quantification quality control), QCA (low concentration quality control), QCB (medium concentration quality control) and QCC (high concentration quality control).

The stability of the analytes and internal standard were evaluated in the biological ma-

Table 2. Mean (arithmetic) pharmacokinetic parameters of losartan obtained from 25 volunteers after administration of each 50-mg losartan immediate release tablet formulation.

Parameter	Losartan 50 mg	Cozaar® 50 mg
AUC_{last} ([ng × h]/ml)		
Mean	326.5	323.2
SD	121.6	119.4
AUC_{0-inf} ([ng × h]/ml)		
Mean	333.6	330.2
SD	121.7	119.9
AUC_{all} (0–24h) ([ng × h]/ml)		
Mean	341.2	327.2
SD	136.6	120.7
C_{max} (ng/ml)		
Mean	182.0	195.3
SD	96.6	134.4
$t_{1/2}$ (h)		
Mean	1.88	1.88
SD	0.74	0.67
t_{max} (h)		
Median	0.75	0.75
Range	0.50 – 2.66	0.50 – 1.50

Table 3. Mean (arithmetic) pharmacokinetic parameters of losartan acid obtained from 25 volunteers after administration of each 50-mg losartan immediate release tablet formulation.

Parameter	Losartan 50 mg	Cozaar® 50 mg
AUC_{last} ([ng × h]/ml)		
Mean	2,058.4	2,082.2
SD	605.5	521.8
AUC_{0-inf} ([ng × h]/ml)		
Mean	2,125.6	2,145.3
SD	614.4	532.5
AUC_{all} (0–24h) ([ng × h]/ml)		
Mean	2,067.9	2,092.5
SD	607.8	525.2
C_{max} (ng/ml)		
Mean	311.7	316.1
SD	127.4	133.2
$t_{1/2}$ (h)		
Mean	4.79	4.78
SD	1.51	0.97
t_{max} (h)		
Median	3.00	3.00
Range	2.33 – 6.00	1.50 – 5.33

trix (human plasma) under distinct timing and temperature conditions in three concentrations (low, medium and high): 278 days long term at -20°C , 6 hours short term at room temperature, 3 freeze and thaw cycles and 64 hours post processing at 5°C . The stability of the compounds in master solutions was also evaluated. The assessment showed that compounds were stable during the time and conditions of analysis.

Results

Each losartan formulation was well tolerated at the administered doses and no significant reactions were observed or reported. None of the biochemical parameters presented any clinically relevant alterations. Three volunteers dropped out of the study on the decision of the clinical investigator before the first confinement (one was a smoker, another took medication not permitted in the protocol) or during the study due to temporarily high levels of AST and ALT liver enzymes, possibly related to the drug. A further volunteer dropped out before the first confinement for personal reasons. All these volunteers were replaced by new volunteers, however one of these dropped out on the decision of the clinical investigator before the first confinement. A total of 25 volunteers finished the study.

The chromatogram of the standard LOQ sample is shown in Figure 1, in which the retention times for losartan and losartan acid were 3.0 min and 3.5 min for the IS. The calibration curves (for losartan and losartan acid) showed good linearity ($r^2 > 0.9998$) within the range 2.0 – 1,000 ng/ml for both analytes. The recoveries observed (value $\pm$ CV (%), $n = 5$) were 100.5 ± 11.6 , 102.7 ± 3.9 and $97.7 \pm 10.4\%$ for losartan, and 74.6 ± 21.9 , 77.6 ± 10.5 and $83.1 \pm 8.6\%$ for valsartan (3.0, 40.0 and 400 ng/ml, respectively). Furthermore, the recoveries observed were 93.7 ± 15.3 , 100.7 ± 14.3 and $87.6 \pm 15.9\%$ for losartan acid at the same concentrations, respectively. The lower limit of quantification (LOQ), defined as the lowest concentration at which both precision and accuracy were less than or equal to 20%, was 2.0 ng/ml for both losartan

and losartan acid. The intra- and inter-batch are presented in Table 6.

Mean pharmacokinetic parameters of losartan and losartan acid obtained from 25 volunteers after administration of each 50 mg

Table 4. Losartan geometric mean of the individual AUC_{last} , AUC_{0-inf} , and C_{max} ratios (test/reference formulation) and the respective 90% confidence intervals (CI).

Losartan/Cozaar® – 50 mg	Statistical analysis		
	Geom. mean	90% CI	ANOVA CV
AUC_{last} % ratio	99.0	92.5 – 105.9	13.89
AUC_{0-inf} % ratio	99.1	92.7 – 105.8	13.65
C_{max} % ratio	92.9	82.2 – 105.0	25.20

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

Losartan/Cozaar® – 50 mg	Statistical analysis		
	Geom. mean	90% CI	ANOVA CV
AUC_{last} % ratio	97.9	93.3 – 102.7	9.83
AUC_{0-inf} % ratio	98.1	93.6 – 102.9	9.72
C_{max} % ratio	98.5	91.5 – 106.0	15.16

losartan immediate release tablet formulation are presented in Figure 2.

The geometric mean and respective 90% CI of Losartan/Cozaar® losartan percent ratios were 92.9% (82.2 – 105.0%) for C_{max} , 99.0% (92.5 – 105.9%) for AUC_{last} , and 99.1% (92.7 – 105.8%) for AUC_{0-inf} . Furthermore, the geometric mean and respective 90% CI of Losartan/Cozaar® losartan acid percent ratios were 98.5% (91.5 – 106.0%) for C_{max} , 97.9% (93.3 – 102.7%) for AUC_{last} , and 98.1% (93.6 – 102.9%) for AUC_{0-inf} (Tables 3 and 4).

Discussion

The angiotensin II receptor antagonist losartan and its principal active metabolite block vasoconstrictor and aldosterone-secreting effects. Oral administration of the drug is considered safe since the overall incidence of adverse effects is similar to the placebo [Sifton 2001]. In the present study, only transitory high serum levels of AST/ALT liver enzymes were observed in one volunteer after oral intake of potassic losartan immediate release tablets.

After oral administration of the immediate-release tablet, the observed concentra-

Table 6. Intra- and inter-batch precision and accuracy.

Intra-batch precision and accuracy (n = 8)

	Losartan				Losartan acid		
	Back conc. (ng/ml)	Mean conc. (ng/ml)	Mean CV (%)	Mean accuracy (%)	Mean conc. (ng/ml)	Mean CV (%)	Mean accuracy (%)
LOQ	2.00	1.85	14.2	92.3	2.01	7.9	100.3
QCA	6.00	5.97	6.9	99.5	6.14	4.1	102.3
QCB	80.0	80.8	3.6	100.9	79.5	2.9	99.3
QCC	800	834	2.5	104.2	808	2.0	101.0

Inter-batch precision and accuracy (n = 24)

	Losartan				Losartan acid		
	Back conc. (ng/ml)	Mean conc. (ng/ml)	Mean CV (%)	Mean accuracy (%)	Mean conc. (ng/ml)	Mean CV (%)	Mean accuracy (%)
LOQ	2.00	1.82	13.7	90.8	1.85	10.3	92.7
QCA	6.00	6.12	9.0	102.0	5.99	5.2	99.9
QCB	80.0	81.2	3.9	101.5	79.6	3.5	99.5
QCC	800	811	3.3	101.3	792	2.9	99.0

tions of losartan and losartan acid peak plasma and the $t_{\max}$ of both oral formulations were similar to those reported in the literature [Polinko et al. 2003, Sifton 2001].

Losartan and its active metabolite losartan acid have already been quantified in human plasma by HPLC using ultraviolet detection [Farthing et al. 1997, Soldner et al. 1998, Yeung et al. 2000]. The total run time of these methods were longer than 20 min and the LOQ ranged between 5 and 10 ng/ml. Solid extraction was frequently applied, but the method described by Farthing and colleagues [1997] used liquid extraction with a gradient mobile phase. Drug recoveries were also quite variable and ranged between 81.5 and 99% for losartan, and 70.2 and 77.6% for losartan acid.

Other studies reported the detection of losartan and losartan acid in human plasma by LC-MS-MS [Iwasa et al. 1999, Polinko et al. 2003]. The method previously described by Iwasa and colleagues [1999] also used a solid-phase extraction, run-in negative electrospray mode. Despite showing a lower LOQ and requiring lower plasma volume (0.4 ml), the total run time (6 min) and retention time of the internal standard (4.3 min) was longer than our method. Furthermore, the recovery for losartan and its active metabolite were lower than in our study. Polinko and colleagues [2003] have recently reported a LC-MS-MS method for detection of losartan and losartan acid in human plasma using a liquid-liquid extraction. The method has similar total run time and used a lower plasma volume (0.1 ml). Despite a similar recovery of losartan acid, the losartan recovery was also lower than the recovery observed in our study. Thus, the LC-MS-MS method described here for drug quantification is consistent with the concepts of high sensitivity, specificity and high sample throughput required for pharmacokinetic studies.

Since the calculated 90% CI for mean $C_{\max}$, AUC_{last} and $AUC_{0-\text{inf}}$ Losartan/Cozaar® individual ratios for losartan and losartan acid were within the 80 – 125% interval defined by the US Food and Drug Administration, it can be concluded that the tested potassic losartan formulation elaborated by Laboratórios Cristália Ltd., Brazil (50 mg immediate release tablet) is bioequivalent to Cozaar® 50 mg, in regard to both extent and rate of

absorption [FDA 1998]. The ANOVA CV for both $C_{\max}$ and AUC ratios were lower for the active metabolite, as expected in bioequivalent studies. The parent compounds are more discriminative for this particular drug [Moraes et al. 1999].

References

- Burnier M. Angiotensin II type 1 receptor blockers. *Circulation*. 2001; 103: 904-912.
- Farthing D, Sica D, Fakhry I, Pedro A, Gehr TW. Simple high-performance liquid chromatographic method for determination of losartan and E-3174 metabolite in human plasma, urine and dialysate. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1997; 704: 374-378.
- Food and Drug Administration. Bioavailability and bioequivalence requirements; abbreviated applications; proposed revisions – FDA. Proposed rule. *Fed Regist*. 1998; 63: 64222-64228.
- Iwasa T, Takano T, Hara K, Kamei T. Method for the simultaneous determination of losartan and its major metabolite, EXP-3174, in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1999; 734: 325-330.
- Moraes MO, Lerner FE, Corso G, Bezerra FA, Moraes ME, De Nucci G. Fluoxetine bioequivalence study: quantification of fluoxetine and norfluoxetine by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *J Clin Pharmacol*. 1999; 39: 1053-1061.
- Polinko M, Riffel K, Song H, Lo MW. Simultaneous determination of losartan and EXP 3174 in human plasma and urine utilizing liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*. 2003; 33: 73-84.
- Sifton DW (ed). Physicians' Desk Reference Medical Economics. 55th edition. Stamford, CT: Thomson Healthcare; 2001. pp. 1668-1670.
- Soldner A, Spahn-Langguth H, Mutschler E. HPLC assays to simultaneously determine the angiotensin-AT₁ antagonist losartan as well as its main and active metabolite EXP 3174 in biological material of humans and rats. *J Pharm Biomed Anal*. 1998; 16: 863-873.
- Yeung PK, Jamieson A, Smith GJ, Fice D, Pollak PT. Determination of plasma concentrations of losartan in patients by HPLC using solid phase extraction and UV detection. *Int J Pharm*. 2000; 204: 17-22.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Este trabalho apresentou dois grandes diferenciais. Um é referente à abordagem, relatando as técnicas e cuidados, desde o desenvolvimento do medicamento até a bioequivalência. Ou seja, se for seguido cuidadosamente todas as etapas do desenvolvimento do medicamento e também for elaborado um protocolo clínico adequado as chances de êxito na bioequivalência aumentam consideravelmente.

O outro diferencial foi referente ao método empregado no estudo analítico desta bioequivalência. O método, comparado com a metodologia das outras literaturas (ver artigo publicado), demonstrou ser mais rápido (5 minutos), mais seletivo (LSMS), com menor limite de quantificação (2ng/mL). A validação de método analítico (Anexo 06) apresentou excelentes resultados em todas as figuras de mérito, em especial na recuperação do analito (Losartan) e seu metabólito (Losartan Ácido).

Além disso, pelo fato deste estudo de bioequivalência não apresentar nenhuma diferença significativa entre a determinação do Losartan e do Losartan Ácido. Futuras bioequivalências, deste medicamento, poderão ser realizadas apenas para o Losartan, sendo mais discriminatório por apresentar um valor de ANOVA CV maior.

6. CONCLUSÃO GERAL

6. CONCLUSÃO GERAL

As duas formulações foram bioequivalentes para a taxa e velocidade de absorção, para o medicamento Losartan 50 mg comprimidos de liberação imediata.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 391 de 09 de Agosto de 1999. Disponível em < www.anvisa.gov.br/e-legis>. Acesso em 12/02/07.

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 1170 de 19 de Abril de 2006. Disponível em < www.anvisa.gov.br/e-legis>. Acesso em 12/02/07.

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 133 de 29 de Maio de 2003a. Disponível em < www.anvisa.gov.br/e-legis>. Acesso em 12/02/07.

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 310 de 01 de Setembro de 2004. Disponível em < www.anvisa.gov.br/e-legis>. Acesso em 12/02/07.

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 1 de 29 de Julho de 2005. Disponível em < www.anvisa.gov.br/e-legis>. Acesso em 12/02/07.

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 135 de 29 de Maio de 2003b. Disponível em < www.anvisa.gov.br/e-legis>. Acesso em 12/02/07.

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Disponível em < www.anvisa.gov.br/e-legis>. Acesso em 12/02/07.

Kauppila T. – Atmospheric Pressure Photoionization – Mass Spectrometry [Academic Dissertation]. Helsinki (Finland); University of Helsinki; 2004.

Pereira AS, Bicalho B, Lilla S, Nucci GD. Desafios da Química Analítica frente às necessidades da indústria farmacêutica. Quim Nova, 2005; 28 (Suplemento):S107-11.

Watson, J.T Introduction to Mass Spectrometry. Philadelphia. Lippincott – Raven, 1997, 496p.

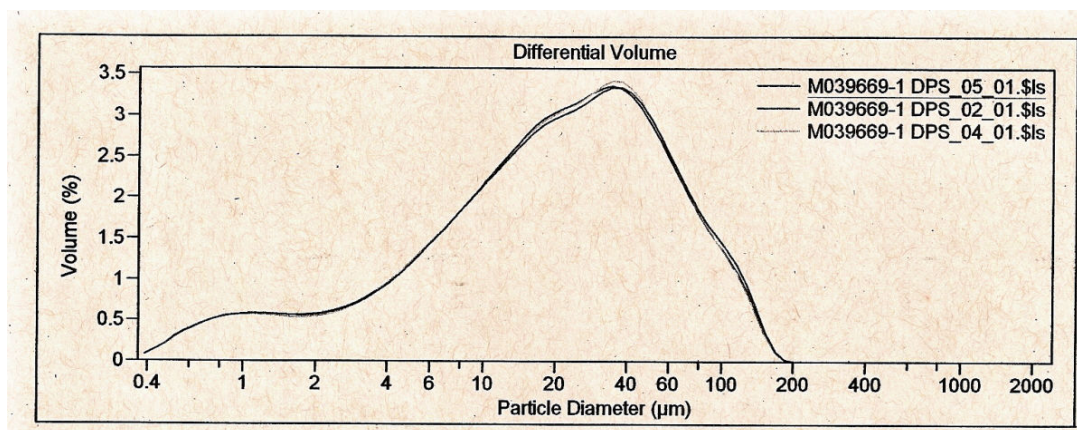
Gilar, M.; Bouvier, E. S. P.; Compton, B. J.; *J. Chromatogr., A* 2001, 909, 111.

Queiroz, S. C. N.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; *Quim. Nova* 2001, 24, 68.
Kataoka, H.; *Trends Anal. Chem.* 2003, 22, 232.

8. ANEXOS

8. ANEXOS

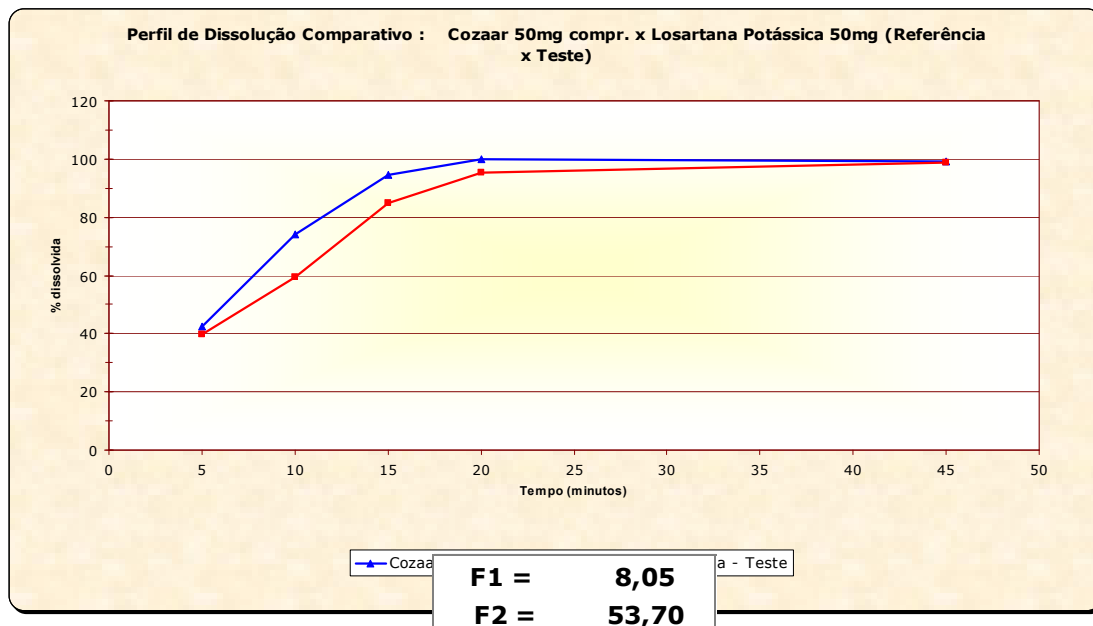
ANEXO 1 – Tamanho de Partícula



Análise do tamanho de partícula do ativo Losartan Potássico.

Na figura a distribuição do tamanho de partícula perfaz de 0,4 µm a 200 µm. Esta distribuição, conforme os testes de pré-formulação se mostrou satisfatória.

ANEXO 2 – Perfil de Dissolução



Avaliação do perfil de dissolução do Losartan Potássico 50mg comprimidos de liberação imediata (medicamento teste) e do Cozaar[®] (medicamento referência).

ANEXO 3 – Lista de Randomização

Tabela: Lista de randomização do protocolo clínico.

Voluntários		Período I	Período II
01	2	Losartan	Cozaa [®]
02	1	Cozaa [®]	Losartan
03	2	Losartan	Cozaa [®]
04	1	Cozaa [®]	Losartan
05	2	Losartan	Cozaa [®]
06	1	Cozaa [®]	Losartan
07	1	Cozaa [®]	Losartan
08	2	Losartan	Cozaa [®]
09	1	Cozaa [®]	Losartan
10	2	Losartan	Cozaa [®]
11	2	Losartan	Cozaa [®]
12	1	Cozaa [®]	Losartan
13	1	Cozaa [®]	Losartan
14	2	Losartan	Cozaa [®]
15	1	Cozaa [®]	Losartan
16	2	Losartan	Cozaa [®]
17	1	Cozaa [®]	Losartan
18	1	Cozaa [®]	Losartan
19	2	Losartan	Cozaa [®]
20	2	Losartan	Cozaa [®]
21	1	Cozaa [®]	Losartan
22	2	Losartan	Cozaa [®]
23	1	Cozaa [®]	Losartan
24	2	Losartan	Cozaa [®]
25	2	Losartan	Cozaa [®]
26	1	Cozaa [®]	Losartan

ANEXO 4 – Termo de Recrutamento

Você está sendo convidado a participar de um processo de recrutamento de voluntários para um projeto de pesquisa clínica. 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 deste processo sejam esclarecidos.

Responsável: Prof Dr. Gilberto De Nucci

O abaixo-assinado, _____, _____ anos, RG _____ declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário de um processo de recrutamento para um projeto de pesquisa clínica sob responsabilidade Prof. Dr. Gilberto de Nucci da Unidade Analítica Cartesius - Departamento de Farmacologia ICB USP. O abaixo-assinado está ciente que:

I - A sua participação neste processo de recrutamento tem como objetivo avaliar suas condições de saúde para possível participação em um projeto de pesquisa clínica.

II - Será submetido aos seguintes exames laboratoriais hemograma completo; bioquímica sanguínea (glicose no sangue, proteínas totais, albumina, transaminases oxalacética e pirúvica, gamaglutamil transferase, creatinina, uréia, ácido úrico, colesterol e triglicerídeos). Exames para a hepatite B e C e para AIDS (HIV 1 e HIV2) no sangue e protoparasitológico (nas fezes) serão feitos somente antes do estudo (pré estudo). Será submetido também a exame do coração (eletrocardiograma).

III - Obteve todas as informações necessárias para decidir conscientemente sobre a participação no referido processo.

IV - Tem a liberdade de desistir ou interromper a participação no processo no momento que desejar, sem necessidade de qualquer explicação e que esta desistência não implicará em qualquer penalidade .

V- Os resultados obtidos durante o processo serão mantidos em sigilo, e a Unidade Analítica Cartesius não identificará o voluntário por ocasião da exposição e/ou publicação dos mesmos.

VI - A Unidade Analítica Cartesius fornecerá informação ao voluntário e prestará qualquer tipo de esclarecimento em relação ao processo, quando solicitado pelo mesmo.

VII – Caso seja selecionado para um ensaio de pesquisa clínica, poderá entrar em contato com a Secretaria do Comitê em Pesquisas com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP pelo telefone 3091 7438 ou 3091-7392 para apresentar recursos ou reclamações em relação ao ensaio clínico.

VIII- É condição indispensável, para participação no processo, que o voluntário esteja em boa saúde e, portanto, caso durante o processo de recrutamento, a avaliação clínica e/ou os exames laboratoriais não estiverem dentro dos limites de normalidade, você será dispensado com os devidos esclarecimentos e orientação médica.

IX - Caso esteja sob tratamento médico no momento, ou esteja fazendo uso de quaisquer drogas ou medicações, ou tenha participado de qualquer outro ensaio clínico no período de 90 dias antes da assinatura deste termo de seleção prévia você não poderá ser recrutado.

X - Caso seja selecionado para participar do estudo, você fará uma nova entrevista antes da internação e nesta serão fornecidos os dados do estudo em questão. Neste caso, você deverá assinar um outro termo denominado termo de consentimento livre e esclarecido antes da administração da medicação.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do voluntário

Assinatura da enfermagem

ANEXO 5 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Estudo de Biodisponibilidade de uma Formulação de Losartan comprimido de 50 mg dos Laboratórios Cristália Ltda versus uma Formulação de Losartan comprimido de 50 mg do Produto de Referência da Merck Sharp & Dohme Farmacêutica Ltda (Cozaar®) em Voluntários Sadios de Ambos os Sexos

GDN 105/02

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

Responsável: Prof Dr. Gilberto De Nucci

O abaixo-assinado, _____, _____ anos, RG nº _____ declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, de responsabilidade do Prof Dr Gilberto De Nucci da Unidade Analítica Cartesius- ICB-USP. O abaixo-assinado está ciente que:

NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO

- O objetivo da pesquisa é verificar se 1 comprimido revestido de Losartan (50 mg) produzido por Laboratórios Cristália Ltda - *Formulação Teste* - atinge níveis no sangue equivalentes ao Cozaar® produzido por Merck Sharp & Dohme Farmacêutica Ltda - *Formulação Referência*. Você receberá um comprimido das duas medicações, cada uma em uma ocasião diferente. A ordem que você tomará cada medicação obedecerá um sorteio.

PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS E RESPONSABILIDADES

- Antes de sua participação no estudo e após a sua participação você será convidado a ir ao Hospital para avaliar a sua condição de saúde. Você será examinado por um médico que lhe fará um exame completo, medindo o seu pulso, sua temperatura, sua pressão arterial. Também será feito um exame do coração (eletrocardiograma). O médico lhe perguntará se você teve ou tem alguma doença e se você faz uso de algum medicamento. Durante a visita serão coletadas amostras de sangue, urina e fezes para exames laboratoriais. Os exames laboratoriais incluem exame de sangue completo como hemograma completo ; bioquímica sanguínea (glicose no sangue, proteínas totais, albumina, transaminases oxalacética e pirúvica, gamaglutamil transferase, creatinina, uréia, ácido úrico, colesterol e triglicerídeos); exame sumário de urina (Urina I). Exames para a hepatite B e C e para AIDS (HIV 1 e HIV2), no sangue, e exame de fezes (protoparasitológico), serão feitos somente no pré estudo.
- Durante o estudo, você será internado duas vezes por aproximadamente 38 horas cada período, com intervalo mínimo de 7 dias. Em cada internamento, a) será colhida uma amostra de sangue para dosagem de creatinina, hemoglobina, hematócrito, transaminases e, para os voluntários do sexo feminino, β -HCG; b) será administrado

um comprimido de Losartan, acompanhado de 200 mL de água sem gás; c) serão coletadas 32 amostras de sangue de 5 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 do método. d) em intervalos regulares, será verificada sua pressão, pulso e temperatura; e) serão também servidas refeições padronizadas (jantar, ceia, na noite da internação; almoço, lanche da tarde, jantar e ceia no dia de administração do medicamento) ou bebidas em horários preestabelecidos. Após a coleta de 24 horas você receberá alta do hospital. Um total de 370 mL de sangue será colhido durante todo o estudo.

- A duração total de sua participação na pesquisa está estimada em 30 dias, a contar da primeira internação, após o processo de seleção.

RESPONSABILIDADES

• É condição indispensável, para participação no ensaio clínico, que você 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 (café, chá, coca-cola, etc) nas 12 horas que antecedem as internações até a última coleta, **d)** não pode ter participado de qualquer outro estudo clínico, tais como estudos com medicamentos, cosméticos, shampoos, etc..., nos 3 meses anteriores ou durante sua participação neste estudo.

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

POSSÍVEIS RISCOS E DESCONFORTOS

A administração por boca de Losartan de maneira continuada pode causar reações como: tontura e queda da pressão, inchaço no rosto e lábios, diarreia, prurido e urticária. Entretanto o aparecimento de efeitos indesejáveis após administração de dose única de Losartan 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

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

INTERCORRÊNCIAS (efeitos indesejáveis)

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

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

RESSARCIMENTO

De acordo com valores previamente estabelecidos (R\$ 400.00), os voluntários serão ressarcidos das despesas e tempo despendidos 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 vocês terão como despesa apenas os gastos de deslocamento da residência ou trabalho até o Hospital para internação ou realização dos exames e consultas. Ainda deve ser previsto eventuais visitas posteriores para acompanhamento dos eventos adversos. O ressarcimento destas despesas já está incluído no valor estabelecido no item acima.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

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

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.

A Unidade Analítica Cartesius o manterá informado, em tempo oportuno, sempre que houver alguma informação adicional que possa influenciar seu desejo de continuar participando no

estudo e prestará qualquer tipo de esclarecimento em relação ao progresso da pesquisa, conforme sua solicitação.

A interrupção não causará prejuízo ao seu atendimento, cuidado e tratamento pela equipe da Unidade Analítica Cartesius

DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES QUANTO A PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

- Os registros que possam identificar sua identidade serão mantidos em sigilo, a não ser que haja obrigação legal de divulgação. A Unidade Analítica Cartesius não identificará o voluntário por ocasião da publicação dos resultados obtidos.
- Contudo, o(s) monitor(es) do Estudo, auditor(es), membros do Comitê de Ética e Pesquisa Clínica, ou autoridades do(s) órgão(s) governamentais envolvido(s) na fiscalização e acompanhamento do estudo terão direito de ter acesso aos registros originais de dados clínicos de sua pessoa, coletados durante a pesquisa, na extensão em que for permitido pela Lei e regulamentações aplicáveis, com o propósito de verificar os procedimentos e dados do ensaio, sem no entanto violar a condição de que tais informações são confidenciais. Ao assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, você está também autorizando tal acesso, mesmo se você se retirar do Estudo.

CONTATOS E PERGUNTAS

- Caso surja alguma intercorrência, deverá procurar a Unidade Analítica Cartesius (Fone 3091-7493) e solicitar que a mesma contate os médicos responsáveis pelo ensaio clínico ou então entrar em contato diretamente com os mesmos nos telefones indicados no final deste *Termo de Consentimento*.
- Poderá contatar o Dr. Gilberto de Nucci para receber informações adicionais, relacionadas à pesquisa ou quanto aos seus direitos como voluntário.
- Poderá contatar a Secretaria do Comitê de Ética do ICB-USP fone 3091 7438 para apresentar recursos ou reclamações em relação ao ensaio clínico.

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

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

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

Ao assinar este Termo de Consentimento estou autorizando o acesso às minhas informações, conforme explicitado anteriormente.

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

São Paulo, ____/____/____

Tabela 9: Campo de assinaturas do termo de consentimento livre e esclarecido

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

CONTROLE INTERNO N° do Estudo: ____/____ N° do Voluntário: _____

TELEFONES PARA CONTATO

UNIDADE ANALÍTICA CARTESIUS (11) 3091-7493

Dr. GILBERTO DE NUCCI **(19) 3251-6928, (19) 9792-4032,**
(11) 3091-7493

Dr. CELSO H. DE OLIVEIRA **(19) 9112 8820**
(11) 3091-7493

ANEXO 6 – Validação do Método Analítico

Method Validation Protocol & Results

Validation of the Procedures for the determination of Losartan and its active metabolite Losartan acid in Human Plasma by LC-MS/MS using Valsartan as Internal Standard

The specific laboratory investigation used to demonstrate that the analytical method defined on the present *Standard of Procedures* is suitable and reliable for the intended analytical application is presented in this chapter. The results obtained during these tests are also documented.

The applied protocol is geared to access the following points:

- Pre-study validation *per se*, including parameters such as sensitivity, specificity, linearity, accuracy, precision and reproducibility;
- Definition of study parameters, such as limit of quantification, concentration of curve standards and quality controls;
- Determination of the Losartan, Losartan acid and the internal standard, Valsartan, stability.

These three points are described in the following sections.

PRE-STUDY VALIDATION

In order to conduct the tests, the quality of reference standards used to prepare solutions was assessed. As authenticated reference standards were used, the source and lot number of the standards. A copy of the Certificate of Analysis, for analytes and internal standard is provided in Appendix IV.

Standard	Purpose	Supplier	Lot #	Exp date	Source
Losartan potassium	Analyte	Merck, Brazil			
Losartan acid	Analyte	Custom synthesized	01	Oct/05	3
Valsartan	Internal Standard	Novartis, Brazil	31513	31/Jan/04	4

1- Certified Reference Standards, 2 – Commercially supplied Reference Standards, 3 – Custom-Synthesized by an analytical laboratory, 4 – Provided by the pharmaceutical industry

Table 10 – Reference standards authentication information

Specificity

To test the specificity, blank samples of human plasma were obtained from six individuals under the following conditions:

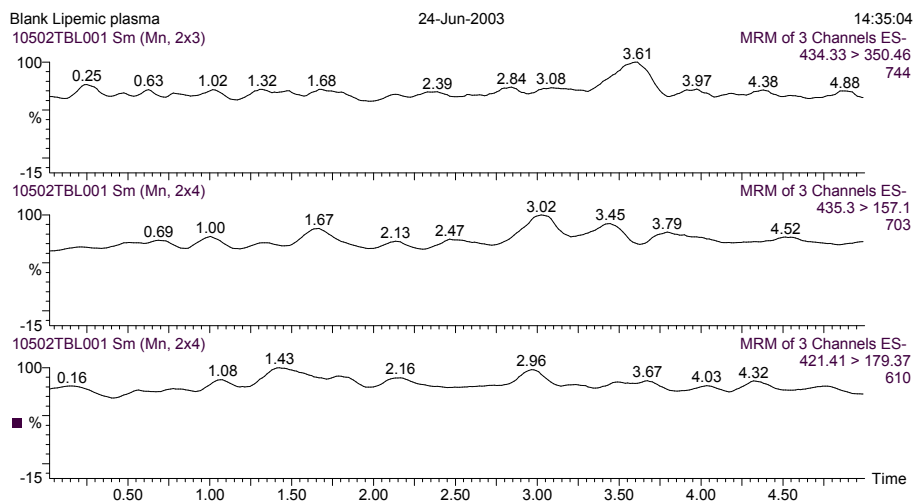
Indiv.	Description	Source	Lot #
1	Normal Human Plasma	Hemocentro of São Paulo	Pool of 0102202497, 0102290880 0102306584
2	Hyperlipemic Human Plasma	Cartesius Analytical Unit	Cartesius pool
3	Haemolized Human Plasma	Cartesius Analytical Unit	Cartesius pool

Table 11 - Matrix

Each blank sample were tested for interference using the proposed extraction procedure and chromatographic or spectroscopic conditions and compared with those obtained with an aqueous solution of the analyte at a concentration near to the Limit of Quantification.

No significant interference (i.e. then interference should be equal or less than 5 times the area for the LOQ) at the retention time of the drug, metabolites or internal standard were found, as showed on the chromatograms presented in Figure .

In Figure 2 are showed the typical chromatograms for Zero, LOQ, QCA, QCB and QCC samples. It was observed that there was an interference from the internal standard channel to the metabolite channel due to the mass difference between them be less than 1 Da. However, since the LC method offers a good chromatographic separation, this phenomenon did not interfere into the reliability of the metabolite quantification.



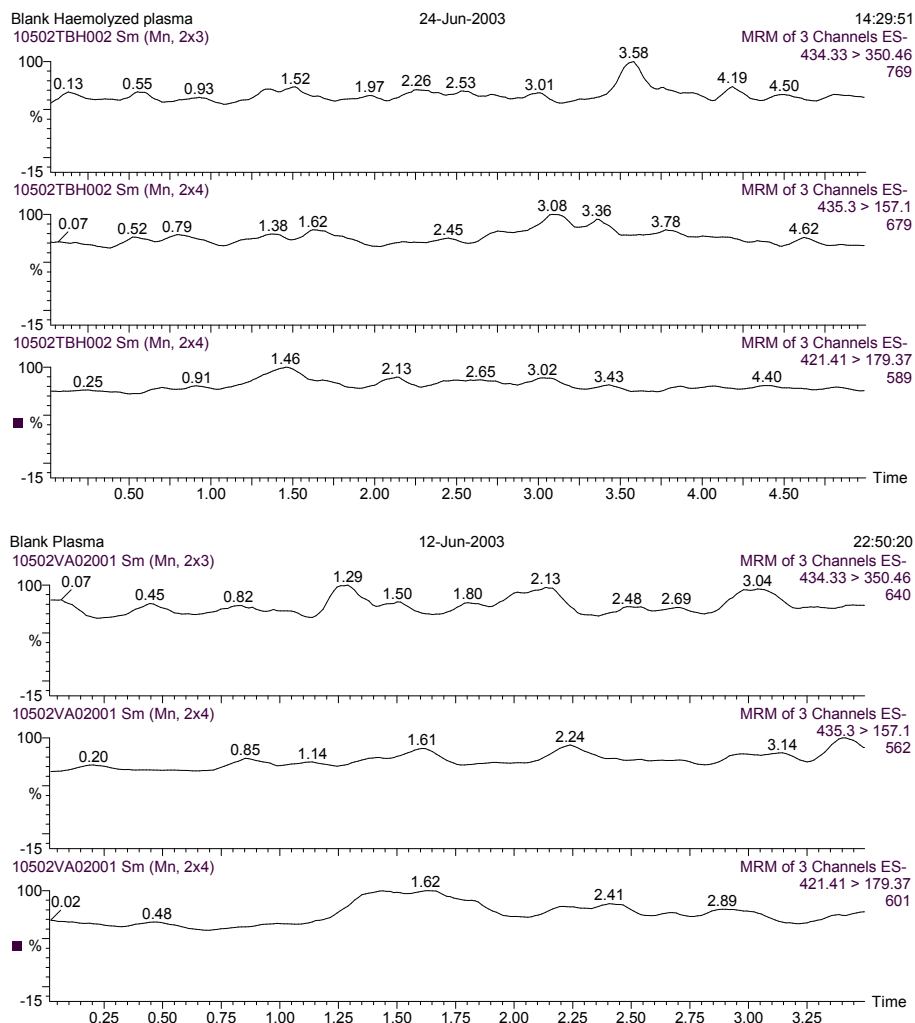
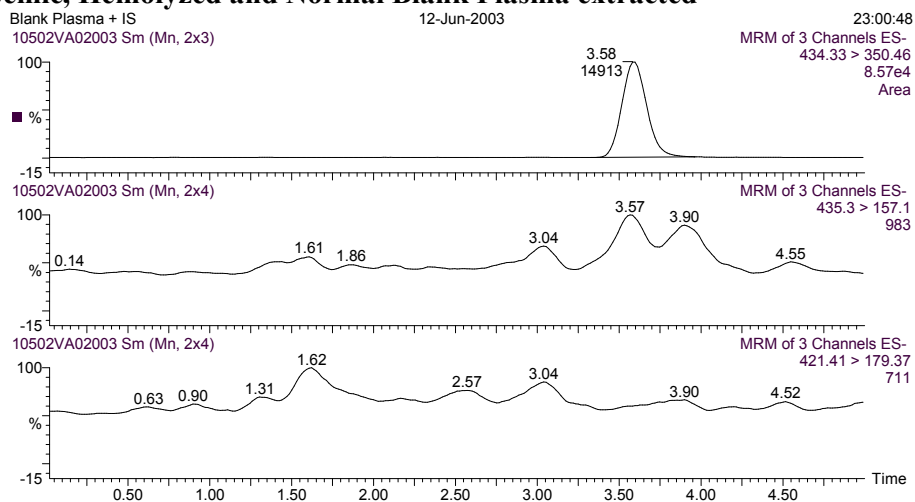
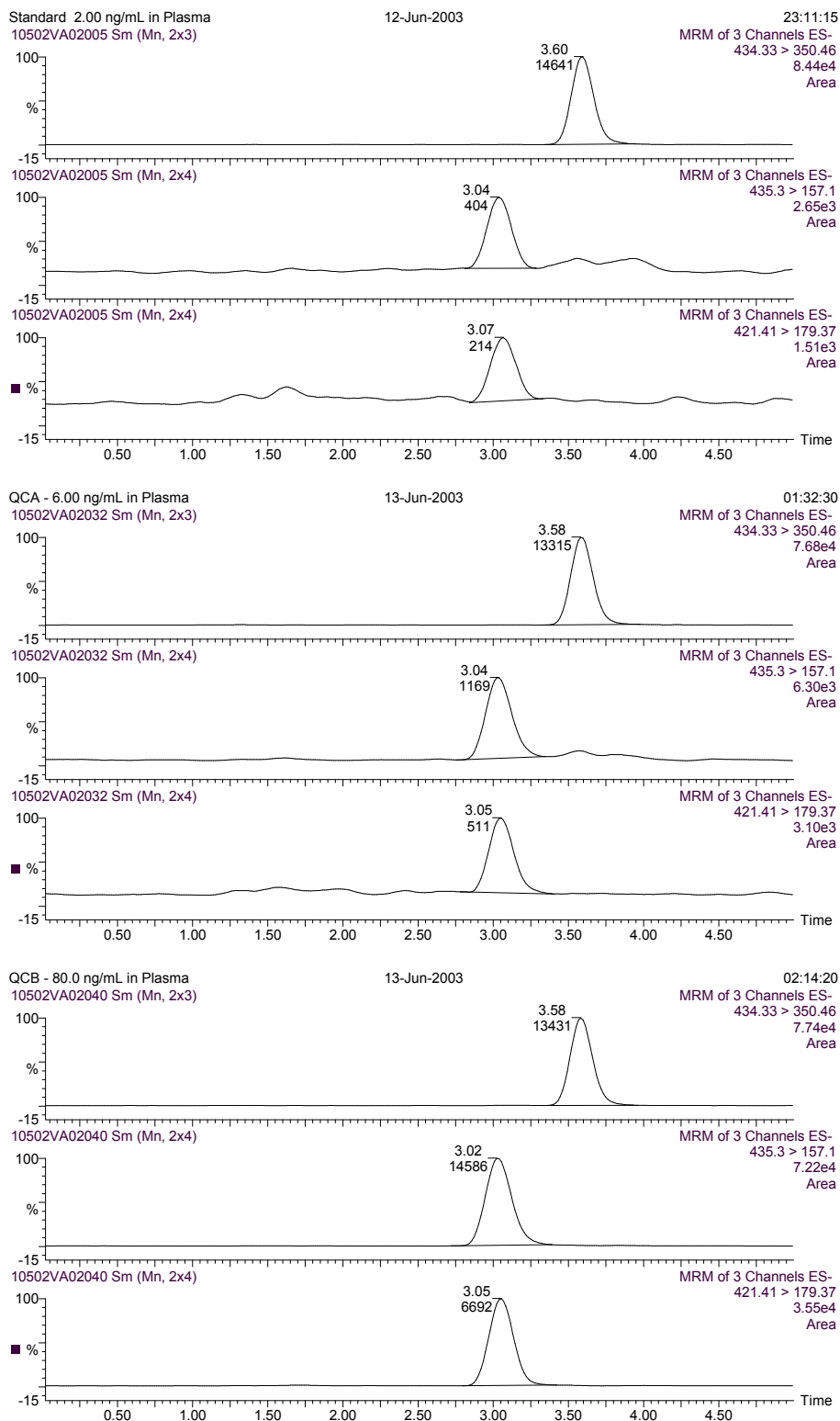


Figure 2 –Lipemic, Hemolyzed and Normal Blank Plasma extracted





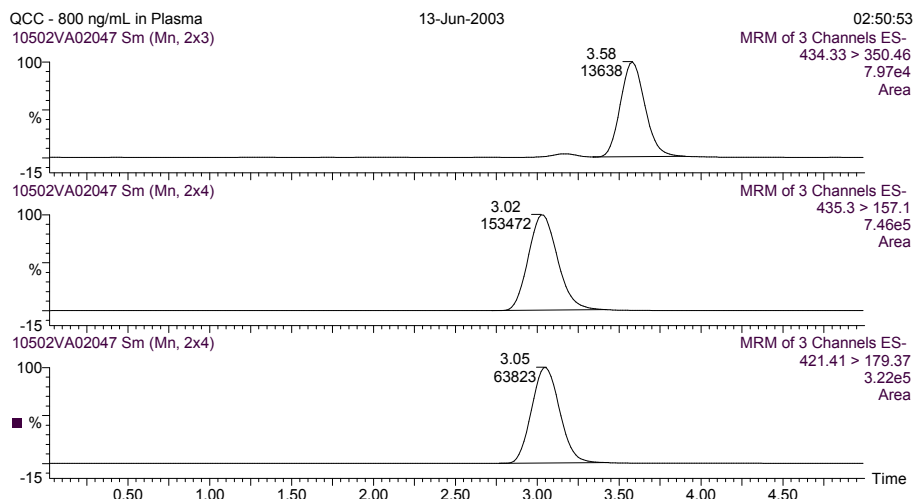


Figure 3 – Standard Peaks for Zero, LOQ, QCA, QCB and QCC samples (Analytes & Internal Standard)
Calibration Curve

To define the relationship between concentration and response a calibration curve containing 9 none zero standards were prepared. The specific values were adjusted in subsequent tests, including first real sample quantification, taking into account the method sensitivity and the anticipated range of analytical values.

The following subsections present the procedures followed to determine the involved parameters as well as validation criteria and results.

Determination of the Limit of Quantification

Limit of Quantification were defined taking into account the method sensibility and also precision and accuracy. Three low concentration values, around the anticipated LOQ, where tested with duplicate analytes included in the curve. To evaluate precision and accuracy, specific quality control samples were also included in the validation procedure (see also Section **Erro! Fonte de referência não encontrada.**, below). Although sensitivity was good enough to quantify even lower values, measures were taken to guarantee a LOQ near to 1 to 3 % of the anticipated Cmax.

The following criteria were met to approve the final value:

- No interference present in blanks at the retention time of the analyte or a response 5 times greater than any interference in blanks at that retention time;
- Analyte peak identifiable, discrete and with an accuracy between 80% - 120% in relation to the nominal standard concentration.
- Precision of 20%, calculated among duplicate standards when both are approved
- LOQ Quality Control pair with the same nominal concentration as the one in consideration, meting the above mentioned criteria for precision and accuracy.

As so, the LOQ validated, for both analytes, under the condition found during the pre-study validation was of 2.00 ng/mL. Specific data are presented in Table 12 and 13

Validation List ID	VA02
Sample Code	QL1
Quantified Concentration (ng/ml)	Individual Accuracy (%)
2.26	113.0
1.79	89.5
2.10	105.0
1.57	78.5
1.63	81.5
2.03	101.5
1.83	91.5
1.55	77.5
Mean (ng/mL)	1.85
Precision (CV%)	14.2
Accuracy (%)	92.3

Table 12 – LOQ validation data for Losartan

Validation List ID	VA02
Sample Code	QL1
Quantified Concentration (ng/ml)	Individual Accuracy (%)
2.05	102.5
1.78	89.0
2.18	109.0
2.19	109.5
2.05	102.5
1.79	89.5
2.07	103.5
1.94	97.0
Mean (ng/mL)	2.01
Precision (CV%)	7.9
Accuracy (%)	100.3

Table 13 – LOQ validation data for Losartan acid

Linearity

Calibration Curve Linearity was developed in order to meet the following criteria:

- < 20% deviation from nominal concentration at the LOQ, for at least one of the duplicates;
- < 15% deviation of standards other than LOQ from nominal concentrations for at least one of the duplicates;
- at least six non-zero standards of each nominal concentration meeting the above criteria, including the LOQ and the highest concentration.
- 0.97 or greater correlation coefficient (r)

For the present method, was not possible to fit the calibration points into a linear curve. The method was fully validated using a second order weighted calibration curve for both analytes.

Specifics data are presented on Table 14 and Table 15 as well as the regression curve on Figure 4 and Figure 5

Nominal Concentration (ng/mL)	Quantified Concentr. (ng/mL)	Acc. (%)	CV (%)	Analyte Approved?	Conc. Approved?
2.00	2.04	101.8	4.2	Yes	Yes
	1.99	99.7	5.6	Yes	
5.00	5.52	110.5	11.1	Yes	Yes
	4.24	85.0	7.5	Yes	
10.0	11.0	109.6	2.5	Yes	Yes
	9.63	96.3	6.4	Yes	
20.0	18.6	92.9	4.2	Yes	Yes
	20.0	99.9	3.5	Yes	
50.0	52.2	104.5	5.2	Yes	Yes
	50.6	101.1	5.1	Yes	
100	101	100.9	1.9	Yes	Yes
	99.8	99.8	1.8	Yes	
200	191	95.3	4.0	Yes	Yes
	205	102.7	6.5	Yes	
500	515	103.0	2.1	Yes	Yes
	495	98.9	3.5	Yes	
1000	999	99.9	1.5	Yes	Yes
	992	99.2	2.9	Yes	
Mean Correlation Coefficient:			0.999829428		

Table 14 – Calibration Curve Validation Data for Losartan

Nominal Concentration (ng/mL)	Quantified Concentr. (ng/mL)	Acc. (%)	CV (%)	Analyte Approved?	Conc. Approved?
2.00	2.01	100.5	5.7	Yes	Yes
	1.96	98.0	6.7	Yes	
5.00	4.87	97.3	2.6	Yes	Yes
	4.32	86.4	14.3	Yes	
10.0	10.2	102.2	5.8	Yes	Yes
	10.7	107.2	5.4	Yes	
20.0	18.9	94.3	5.0	Yes	Yes
	19.0	94.8	3.4	Yes	
50.0	52.2	104.4	3.7	Yes	Yes
	50.9	101.8	4.6	Yes	
100	100	100.2	1.8	Yes	Yes
	100	100.1	2.3	Yes	
200	192	96.0	3.9	Yes	Yes
	203	101.7	6.3	Yes	
500	509	101.8	0.6	Yes	Yes
	501	100.2	2.5	Yes	
1000	994	99.4	1.7	Yes	Yes
	997	99.7	2.1	Yes	
Mean Correlation Coefficient:			0.999899951		

Table 15 – Calibration Curve Validation Data for Losartan acid

Compound 1 name: losartan Method File: 10502VA02
 Coefficient of Determination: 0.999322
 Calibration curve: $-6.86975e-7 * x^2 + 0.00613337 * x + 0.00122829$
 Response type: Internal Std (Ref 3), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x^2, Axis trans: None

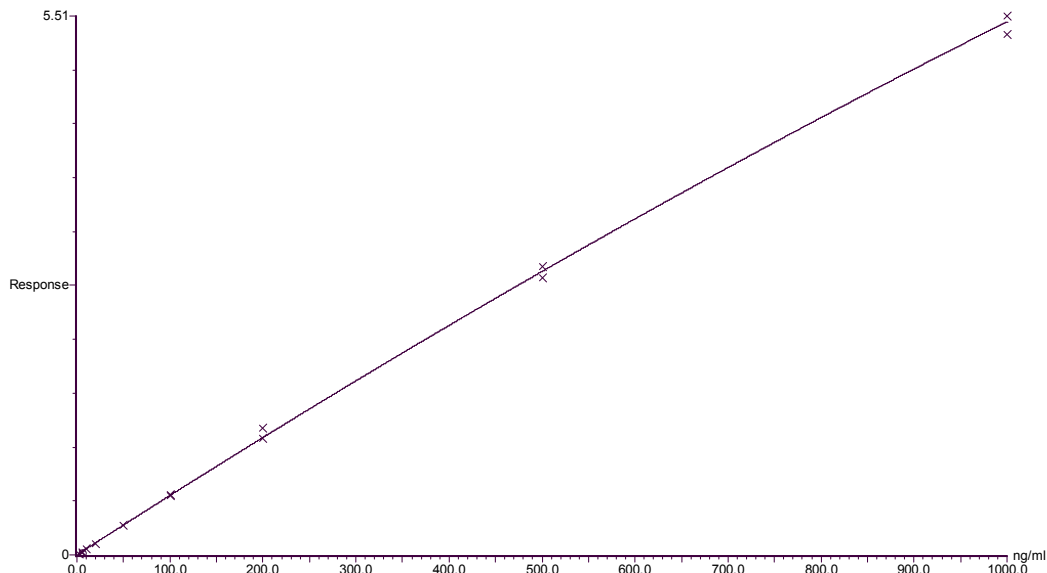


Figure 4 – Representative Calibration Curve Graph for Losartan

Compound 2 name: losartan acido Method File: 10502VA02
 Coefficient of Determination: 0.999622
 Calibration curve: $1.31807e-7 * x^2 + 0.0139143 * x + -0.00135893$
 Response type: Internal Std (Ref 3), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

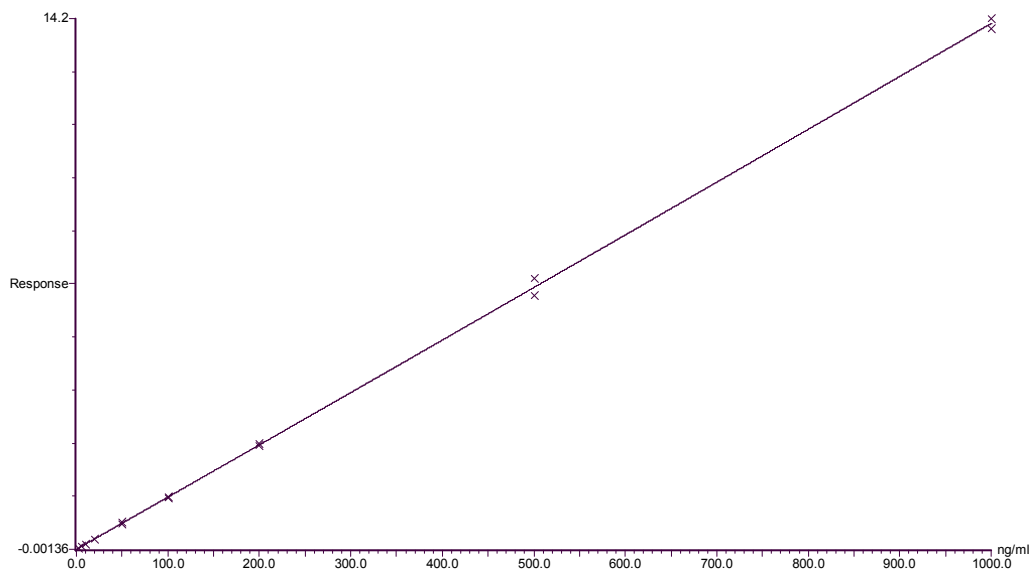


Figure 5 – Representative Calibration Curve Graph for Losartan acid

Precision and Accuracy

To assess the precision and accuracy at least four distinct concentrations in the range of expected concentrations (including the LOQ and Quality Control Concentrations) where evaluated using at least six determinations per concentration.

Precision and Accuracy was assessed at within-day basis, which defines those parameters during a single analytical run; and at between-day basis, which measure the between day variability, possibly involving different analysts, reagents, etc.

The following subsections present the procedures followed to determine the involved parameters as well as validation criteria and results.

Determination of the Quality Control Concentrations

The specific values were defined based on criteria presented below and were adjusted in subsequent tests, including first real sample quantification, taking into account the anticipated range of analytical values.

Quality control samples concentrations were finally defined, for the both analytes, as presented in the following table:

QC Type	QC Code	Range Definition	Defined Value
LOQ QC Sample	QL1	Same concentration as LOQ	2.00 ng/mL
Low QC Sample	QCA	$\leq 3 \times \text{LOQ}$	6.00 ng/mL
Medium QC Sample	QCB	Midway between high and low QC	80.0 ng/mL
High QC Sample	QCC	75% - 90% of highest calibration standard	800 ng/mL

Table 16 – Quality Control Samples Definition for Losartan and Losartan acid

Intra-batch Validation

The intra-batch precision and accuracy validation were carried out using a batch containing the following samples:

- A calibration curve containing standards as defined above
- Eight quality control (QC) samples of each of the QC types defined above.

The following criteria was met in order to approve intra-batch precision and accuracy:

- Precision: For each concentration level, coefficient of Variation (CV) not exceeding 15% (Tolerance until 20% at LOQ concentration).
- Accuracy: Mean value of samples at each concentration level, within 15% of the actual value (Tolerance until 20% at LOQ concentration).

Validation data for both analytes are presented in the following tables.

LOQ QC Code	Quantified Concentration (ng/mL) of individual samples								Validation List ID		
QL1									VA02		
Smpl Code	1	2	3	4	5	6	7	8	Mean	CV	Accuracy
QL1	2.26	1.79	2.10	1.57	1.63	2.03	1.83	1.55	1.85	14.2	92.3
QCA	5.98	6.01	5.16	6.52	6.13	6.05	5.64	6.26	5.97	6.9	99.5
QCB	81.2	81.8	76.3	77.2	80.5	83.0	80.9	85.1	80.8	3.6	100.9
QCC	843	810	809	844	825	868	850	819	834	2.5	104.2

Table 17 – Intra-batch Validation Data for Losartan

LOQ QC Code	Quantified Concentration (ng/mL) of individual samples								Validation List ID		
QL1									VA02		
Smpl Code	1	2	3	4	5	6	7	8	Mean	CV	Accuracy
QL1	2.05	1.78	2.18	2.19	2.05	1.79	2.07	1.94	2.01	7.9	100.3
QCA	6.15	6.47	6.24	6.37	5.76	6.30	5.88	5.94	6.14	4.1	102.3
QCB	80.8	79.2	75.7	77.2	78.1	82.4	81.1	81.1	79.5	2.9	99.3
QCC	804	796	778	813	813	824	831	807	808	2.0	101.0

Table 18 – Intra-batch Validation Data for Losartan acid

Inter-batch Validation

The inter-batch precision and accuracy validation were carried out using additional two batches, each one prepared with human plasma collected from a different source.

The same preparation conditions defined for intra-batch validation were followed. To obtain within-batch data, the mean and CV of each QC concentration in each batch was calculated.

The following criteria was met in order to approve inter-batch precision and accuracy:

- Precision: For each concentration level, coefficient of Variation (CV), obtained from the mean values of each batch, not exceeding 15% (tolerance until 20% at LOQ concentration).
- Accuracy: Mean value of each batch at each concentration level, within 15% of the actual value (tolerance until 20% at LOQ concentration).

Inter-batch validation data for both analytes are presented in Table and 20

n	Mean Concentration (ng/mL) of individual Batches			Inter-Batch Precision & Accuracy		
24						
Sample Code	Batch VA02	Batch VA03	Batch VA04	Mean	Mean CV (%)	Mean Accuracy (%)
QL1	1.85	1.91	1.69	1.82	13.7	90.8
QCA	5.97	6.11	6.28	6.12	9.0	102.0
QCB	80.8	82.0	80.8	81.2	3.9	101.5
QCC	834	795	803	811	3.3	101.3

Table 19 – Inter-batch validation data for Losartan

n	Mean Concentration (ng/mL) of individual Batches			Inter-Batch Precision & Accuracy		
24						
Sample Code	Batch VA02	Batch VA03	Batch VA04	Mean	Mean CV (%)	Mean Accuracy (%)
QL1	2.01	1.84	1.72	1.85	10.3	92.7
QCA	6.14	6.01	5.84	5.99	5.2	99.9
QCB	79.5	79.3	80.1	79.6	3.5	99.5
QCC	808	789	778	792	2.9	99.0

Table 20 – Inter-batch validation data for Losartan acid

Reinjection Process Validation

The precision of the reinjection process validation was carried out reinjecting the quality control samples immediately after the end of the validation batch under the same detection conditions.

The same criteria defined for intra- and inter-batch validation were followed. To obtain the precision, expressed as the percentage of the variation (Var), the mean of each QC concentration for the reinjection process was calculated.

The following criteria was met in order to approve the precision of the reinjection process:

- Precision: For each concentration level, the variation (Var), obtained from the mean values of each reinjection set, not exceeding 15% (tolerance until 20% at LOQ concentration).

The reinjection process validation data is presented in Table 21 and 22 individual data are presented in Appendix IV.

Validation list	Reinjection Process Validation				
VA04					
Sample Code	Mean original value (in ng/mL)	CV (%)	Mean reinjected values (in ng/mL)	CV (%)	Var. (%)
QL1	1.85	14.2	1.69	12.9	-8.3
QCA	5.97	6.9	6.28	11.5	5.2
QCB	80.8	3.6	80.8	3.0	0.0
QCC	834	2.5	803	2.8	-3.7

Table 21 – Inter-batch dilution validation data for Losartan

Validation list	Reinjection Process Validation				
VA04					
Sample Code	Mean original value (in ng/mL)	CV (%)	Mean reinjected values (in ng/mL)	CV (%)	Var. (%)
QL1	2.01	7.9	1.72	8.7	-14.4
QCA	6.14	4.1	5.84	5.9	-4.9
QCB	79.5	2.9	80.1	2.8	0.8
QCC	808	2.0	778	3.6	-3.7

Table 22 – Inter-batch dilution validation data for Losartan acid

Recovery

The extraction efficiency of the analytical method was assessed using a specific batch, containing the following samples:

- Five quality control (QC) samples of each type (Low, Medium & High), obtained by the usual extraction process;
- At least three samples of each of the concentrations mentioned above, obtained by diluting master standard or working solutions directly in blank plasma extracts;

Recovery was evaluated by calculating the mean of the area or response of each concentration and dividing the extracted sample mean by the unextracted (spiked blank plasma extract) sample mean of the corresponding concentration. The recovery was also evaluated in different types (normal, hemolized and lipemic) of human plasma at a medium concentration value (for example QCB). The individual values are showed in Appendix V.

These values and the overall mean are shown in the following table:

Compound: Losartan (mean values, n = 5)						
Conc. type	Plasma Type	Unextracted samples	Extracted samples	Individual Recovery (%)	Mean Recovery	CV (%)
Low	Pool 1	3.62	3.16	87.4	100.5	11.6
	Pool 2	2.92	3.21	110.0		
	Pool 3	3.18	3.31	104.0		
Medium	Pool 1	40.9	42.3	103.3	102.7	3.9
	Pool 2	41.5	43.2	104.0		
	Pool 3	41.2	44.4	107.9		
	Hemolized	40.8	41.3	101.1		
	Lipemic	42.1	40.9	97.1		
High	Pool 1	456	448	98.4	97.7	10.4
	Pool 2	507	442	87.2		
	Pool 3	457	492	107.6		

Table 23 – Recovery Results in several types of plasma samples for the analyte, Losartan.

Compound: Losartan acid (mean values, n = 5)						
Conc. type	Plasma Type	Unextracted samples	Extracted samples	Individual Recovery (%)	Mean Recovery	CV (%)
Low	Pool 1	3.43	3.75	109.4	93.7	15.3
	Pool 2	3.85	3.46	90.0		
	Pool 3	3.99	3.25	81.5		
Medium	Pool 1	40.8	44.1	107.9	100.7	14.3
	Pool 2	47.6	39.4	82.7		
	Pool 3	42.7	43.3	101.5		
	Hemolized	35.7	42.9	120.1		
	Lipemic	39.4	36.1	91.5		
High	Pool 1	409	339	83.1	87.6	15.9
	Pool 2	512	391	76.4		
	Pool 3	422	436	103.2		

Table 24 – Recovery Results in several types of plasma samples for the active metabolite, Losartan acid.

Compound: Valsartan (mean values, n = 5)						
Conc. type	Plasma Type	Unextracted samples	Extracted samples	Individual Recovery (%)	Mean Recovery	CV (%)
Low	Pool 1	6.64	6.12	92.1	74.6	21.9
	Pool 2	7.41	5.32	71.8		
	Pool 3	9.04	5.41	59.8		
Medium	Pool 1	92.3	75.3	81.6	77.6	10.5
	Pool 2	125.2	81.3	65.0		
	Pool 3	114.6	97.1	84.7		
	Hemolized	118.0	97.4	82.5		
	Lipemic	128.0	94.6	73.9		
High	Pool 1	866	792	91.4	83.1	8.6
	Pool 2	980	768	78.3		
	Pool 3	1018	811	79.7		

Table 25 – Recovery Results in several types of plasma samples for the internal standard, Valsartan.

Assesment of Ion Suppression

Suppression of the MS signal (“ion suppression”) can be caused by contaminants (e.g. salts) in the LC eluant entering the MS. Thus, a non-specific extraction procedure may produce ion suppression that could interfere with the analysis of the samples. The effects of the sample preparation method (for the matrix that is being analyzed) on the variability of the electrospray ionization response should be determined.

To assess the effect of ion suppression on the MS/MS signal of the analytes, Losartan and Losartan acid, and the internal standard, Valsartan, the extraction procedure described in item 6.2 of chapter I was evaluated. The experimental set-up (Figure 6 consisted of an infusion pump connected to the system by a “zero volume tee” before the split and the HPLC system pumping the mobile phase, which was the same as that used in the routine analysis of Losartan and Losartan acid, i.e. acetonitrile/water (60/40 v/v) + 10 mM ammonium acetate + 11.2 mM formic acid at 0.8 mL/min. The infusion pump was set to transfer (50 ul/min) of a mixture of analytes and internal standard in mobile phase (both at 50 ug/mL).

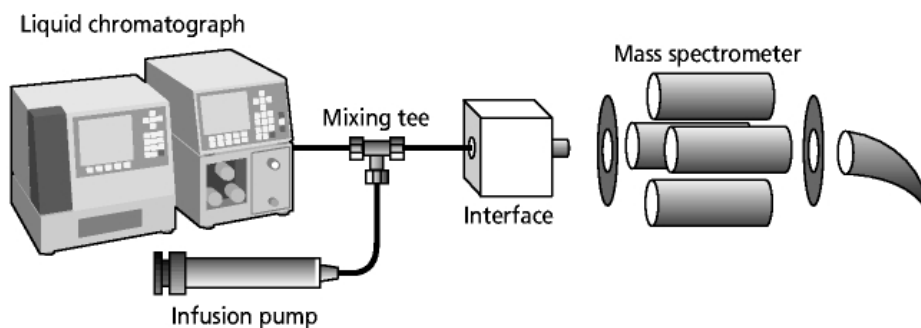


Figure 6 – Ion suppression experiment set-up

A sample of human pooled blank plasma sample was extracted by the procedure recorded in chapter I (item 6.2). The reconstituted extract was injected into the HPLC system while the standard mixture was being infused (see above). In this system any ion suppression would be observed as a depression of the MS signal.

In the case of Losartan, Losartan acid and its internal standard, Valsartan, there was no significant ion suppression in the region where the analytes and internal standard were eluted as shown in Figure 7. However, a large MS signal suppression was observed at the void volume region, but this phenomenon did not interfere into the whole profile of the assay since the analytes and the internal standard are eluting far away from it.

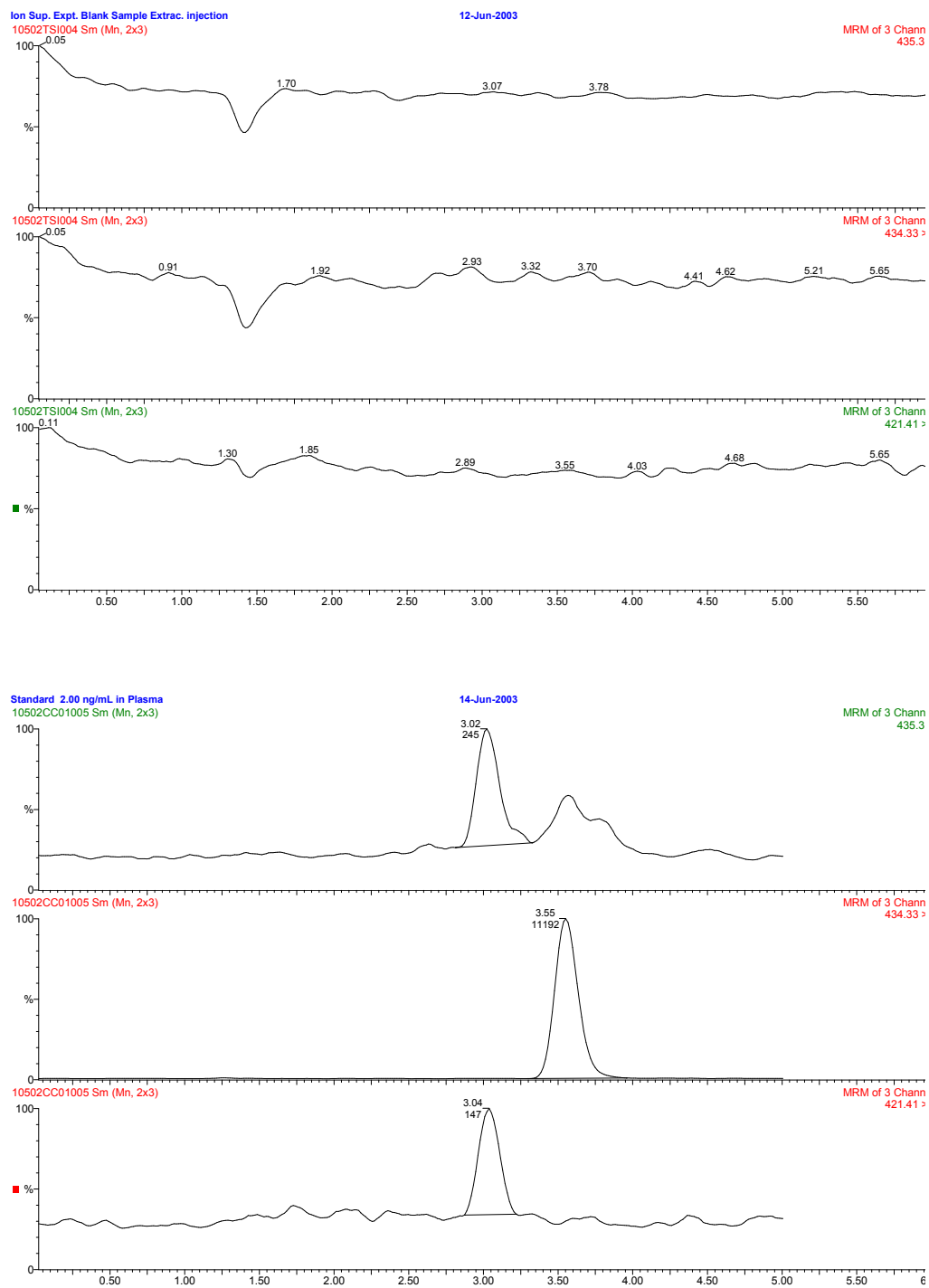


Figure 7 – Ion suppression experiment (baseline profile after blank plasma extract injection and the standard peak at the LOQ level)

STABILITY

Stability procedures evaluate the stability of the analytes in human plasma under distinct timing and temperature conditions, as well as the stability of the analyte in stock solution.

As drug stability in a biological fluid is a function of the storage conditions, the chemical properties of the drug, the matrix (human plasma) and the container system; results of the present tests are relevant only on the same conditions, and should not be extrapolated to other matrices and container systems.

To test stability, a series of standard samples were prepared from freshly made master solution in the same solvent used for the assay. The respective LOW, MEDIUM and HIGH concentration quality controls, including the analyte and internal standard (when appropriate) were used. Human plasma samples of each concentration were prepared in enough volume to have multiple aliquots, each. Five aliquots of each concentration were processed and quantified immediately in order to provide the *reference* (fresh) values and other five aliquots of each concentration were processed for the desired tests.

The following sub-sections present the procedures carried out and corresponding results. In Appendix V are showed all the individual values obtained for the stability tests analysis.

Autosampler Stability

To evaluate autosampler stability, eight aliquots of each sample type were maintained, immediately after preparation, at the autosampler temperature used during analysis, for the anticipated time the batch size would take to run. Therefore, the parameters were:

- Autosampler temperature: 5 °C
- Anticipated batch run time: 20 hours
- Test time: 64 hours

The concentrations obtained after the test time were compared to the respective reference concentrations. Results are showed in Table .

Auto-sampler simulation (n=8)			Fresh conc. values		Conc. values after 64 hours		Mean variatio n (%)
Analyte	Sampl e type	Reference conc.	Mean	CV (%)	Mean	CV (%)	
Losartan	QCA	6 ng/mL	5.88	7.2	5.47	9.2	-7.0
	QCB	80 ng/mL	79.1	5.3	77.4	3.7	-2.2
	QCC	800 ng/mL	830	1.9	851	4.8	2.5
Losartan acid	QCA	6 ng/mL	5.98	6.2	6.05	6.2	1.0
	QCB	80 ng/mL	80.3	4.5	81.4	4.3	1.3
	QCC	800 ng/mL	820	1.9	839	2.6	2.4

Table 26 – Autosampler Stability Results

Freeze and Thaw Stability

To evaluate freeze and thaw stability, a freeze and thaw *cycle* were defined as the storage of samples at three distinct concentrations at the desired temperature (-20 °C) followed by thawing unassisted at room temperature, as follows:

Initially, aliquots were prepared to be tested during the following cycles:

- 1st cycle - 24h freeze ;
- 2nd cycle - 12h freeze;
- 3rd cycle - 12h freeze.

Samples were quantified after the third cycle, together with fresh reference samples.

Table shows the corresponding results, which define freeze and thaw stability limitations.

Freeze-and-thaw stability test (n=5)			Fresh conc. values		Conc. values after the third cycle		Mean variatio n (%)
Analyte	Sampl e type	Reference conc.	Mean	CV (%)	Mean	CV (%)	
Losartan	QCA	6 ng/mL	6.35	9.6	6.36	5.3	0.2
	QCB	80 ng/mL	84.1	12.0	77.0	3.5	-8.4
	QCC	800 ng/mL	758	4.7	765	12.6	0.9
Losartan acid	QCA	6 ng/mL	6.92	6.3	6.79	11.4	-1.9
	QCB	80 ng/mL	84.0	4.9	74.0	2.9	-11.9
	QCC	800 ng/mL	818	2.6	791	8.0	-3.4

Table 27 – Freeze and Thaw Stability Results

Short Term Room Temperature Stability

To evaluate short term stability, five aliquots of each sample type were maintained, immediately after preparation, at room temperature for 6 hours, which exceeds the expected duration that samples could be maintained at room temperature after thawing until they are analyzed.

The stability of all analytes and the internal standard were compared to the respective reference concentration. Results are showed in table 28.

Short-term stability test (n=5)			Fresh conc. values		Conc. values after 6 hours		Mean variation n (%)
Analyte	Sample type	Reference conc.	Mean	CV (%)	Mean	CV (%)	
Losartan	QCA	6 ng/mL	6.35	9.6	7.26	7.5	14.4
	QCB	80 ng/mL	84.1	12.0	82.2	7.5	-2.2
	QCC	800 ng/mL	758	4.7	744	12.0	-1.8
Losartan acid	QCA	6 ng/mL	6.92	6.3	6.97	7.4	0.8
	QCB	80 ng/mL	84.0	4.9	79.3	7.3	-5.6
	QCC	800 ng/mL	818	2.6	783	8.8	-4.3

Table 28 – Short Term Stability Results

Long Term Stability

Aliquots of each sample type were initially frozen at -20°C and then thawed to be extracted and tested after 85 and 278 days

Table shows the corresponding results which define long term stability limits.

Long-term stability test (n=5)			Fresh conc. values		Conc. values after 85 days		Mean variation n (%)
Analyte	Sample type	Reference conc.	Mean	CV (%)	Mean	CV (%)	
Losartan	Medium	75 ng/mL	65.7	3.9	65.2	2.0	-0.7
	High	750 ng/mL	655	1.9	658	4.2	0.5
Losartan acid	Medium	10 ng/mL	9.03	4.1	8.87	3.2	-1.7
	High	100 ng/mL	87.4	4.0	87.1	3.5	-0.4

Table 29 – Long Term Stability Results

Long-term stability test (n=5)			Fresh conc. values		Conc. values after 278 days		Mean variatio n (%)
Analyte	Sample type	Reference conc.	Mean	CV (%)	Mean	CV (%)	
Losartan	Low	7.5 ng/mL	8.27	7.7	8.52	4.1	3.0
	Mediu m	75 ng/mL	82.7	6.8	72.2	2.4	-12.7
	High	750 ng/mL	771	5.7	718	2.9	-6.9
Losartan acid	Low	10 ng/mL	10.3	2.9	10.4	4.7	1.4
	High	100 ng/mL	104	2.0	101	4.6	-2.5

Table 30 – Long Term Stability Results

Master Solution Stability

To evaluate the master solution stability, each analyte and internal standard master solutions were prepared freshly and compared to the same master solutions already available under the conditions showed below:

Master Solution Stability (n=5)		Conc. Values for new solution (in ng/mL)		Conc. values for old solution (in ng/mL)		Mean variation after 14 days (%)
Analyte	Reference conc.	Mean	CV (%)	Mean	CV (%)	
Losartan	80 ng/mL	80	2.7	79	2.8	-0.8
	800 ng/mL	743	3.3	755	6.0	1.7
Losartan acid	80 ng/mL	79	2.9	79	1.6	0.3
	800 ng/mL	794	0.8	829	3.7	4.4
Valsartan	80 ng/mL	82	4.2	85	3.9	4.3
	800 ng/mL	813	1.6	813	1.6	1.5

Table 31 – Master Solution Stability Results

STABILITY CONSIDERATIONS

Autosampler Stability

Tests performed indicate that the analytes and the internal standard, on processed samples, can remain at the autosampler temperature for at least 64 hs, without showing significant loss in the quantified values.

Freeze and Thaw Stability

Tests performed indicate that the analytes are stable on human plasma for three cycles of freeze and thaw, when stored at -20°C thawed to room temperature.

Short Term Room Stability

Tests performed indicate that the analytes are stable on human plasma, when thawed to room temperature and processed after 6 hours. The samples did not present any significant degradation.

Long-Term Stability

Tests performed indicate the both analytes, Losartan and Losartan acid can be stored in human plasma for at least 278 days without showing any significant degradation.

Master Solution Stability

Tests performed indicate that the master solutions for Losartan, Losartan acid and Valsartan did not present any degree of degradation after 14 days. Therefore master solutions should not be freshly prepared everyday, during the assay conduction.

Conclusion

It was concluded that the analytical method is fully validated as it meets the following overall criteria:

Precision: The between-batch CVs for low, medium and high QC concentrations were below 15%, and below 20% for the LOQ QC, taking the three batches tested;

Accuracy: The between-batch mean value was within $\pm 15\%$ of the nominal value at low, medium and high QC concentrations and was not deviated more than $\pm 20\%$ at LOQ;

Sensitivity: The lowest standard proved to be accepted as the limit of quantitation of the method since the between-batch CV was $\leq 20\%$;

Specificity: There were no interfering peaks at the retention time of the analytes or they were less than 20% of the response of the LOQ standard. There were no interfering peaks at the retention time of the internal standard or it was less than 5% of the response of the concentration of the internal standard used in the study;

Stability: Autosampler, short-term, freeze-and-thaw, long-term and master solution stability tests proved that the analytes, and the internal standard when appropriate, did not show any perceivable degradation at the temperatures and time periods specified to be used in the SOP.

As the validation procedures are dependent of the laboratory conditions, any assay based on the present Standard of Procedures should also be preceded by a “pre-study validation”, in order to evaluate if the above conditions will also be achieved in the environment where it is being done.