

MÁRCIA APARECIDA DA SILVA

**Determinação de clorpropamida em plasma, empregando
cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à
espectrometria de massa seqüencial (LC/MS/MS) e sua
aplicação em um estudo de bioequivalência.**

CAMPINAS

Unicamp

2007

MÁRCIA APARECIDA DA SILVA

**Determinação de clorpropamida em plasma empregando
cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à
espectrometria de massa seqüencial (LC/MS/MS) e sua
aplicação em um estudo de bioequivalência.**

Tese de Doutorado apresentada a Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas, para a obtenção do título de
Doutor em Farmacologia.

ORIENTADOR: PROF. Dr. GILBERTO DE NUCCI

CAMPINAS

Unicamp

2007

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

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

Si38d	Silva, Márcia Aparecida da Determinação de clorpropamida em plasma, empregando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa seqüencial (LC/MS/MS) e sua aplicação em um estudo de bioequivalência. / Márcia Aparecida da Silva. Campinas, SP : [s.n.], 2007. Orientador : Gilberto de Nucci Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 1. Plasma. 2. . Farmacocinética. 3. Espectometria de massa. 4. Bioequivalência. 5. Biodisponibilidade. 6. Validação de método. 7. Cromatografia líquida de alta eficiência. I. Nucci, Gilberto de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.
-------	--

Título em inglês: Determination of chlorpropamide in plasma, using high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) and their application in a study of bioequivalence

Keywords: . Plasma
. Pharmacokinetics
. Mass spectrometry
. Bioequivalence
. Bioavailability
. Validation of method

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora: Prof^o. Dr^o. Gilberto de Nucci
Prof^o. Dr^o. Celso Henrique de Oliveira
Prof^o. Dr^o. Félix Guillermo Reyes Reyes
Prof^o. Dr^o. Marcos Antônio Tambascia
Prof^a. Dr^a Regina Scivoletto

Data da defesa: 20-08-2007



Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador:

Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Membros:

Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Profa. Dra. Regina Scivoletto

Prof. Dr. Celso Henrique de Oliveira

Prof. Dr. Marcos Antônio Tambascia

Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes

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

Data: 20/08/2007

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

*A meus pais, **Wenceslau Duque da Silva e Esther Soares da Silva**, a quem devo minha formação acadêmica e moral, a educação e o caráter de que tanto me orgulho, agradeço por todo amor, apoio, ajuda, incentivo e orações.*

*A meus irmãos, **Olívia Cecília da Silva, José Martins Horta Valério da Silva, Marcelo José da Silva** e a minha cunhada **Ivone Levandoski da Silva** pela credibilidade e incentivo.*

*Ao grande amor da minha vida, **Olívio Agenor Sivieri**, por toda ajuda, amparo, confiança, credibilidade, paciência e amor que me dedica.*

*A meus queridos sobrinhos, **Arthur Augusto L. da Silva e Isabela Catarina L. da Silva**, que tantas alegrias e felicidade nos trouxeram.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** que sem o amparo do qual este trabalho e tudo mais não teria se realizado e a presença de **Jesus Cristo** em todos os momentos, atividade, experimentos, trabalhos enfim em toda a minha vida. Agradeço também aos coordenadores, colaboradores e mentores da **Morada Espírita Prof. Lairi Hans**, pelas preces, orações, forças e amparo fraterno.

Ao Prof. Dr. **Gilberto de Nucci** dedico um agradecimento especial por ter me aceito como aluna, me orientado e pela credibilidade durante as atividades do curso de doutorado, qualificação técnica e na execução dos trabalhos. Sem seu apoio este trabalho não teria se realizado.

A minha mãe, **Esther**, ao meu pai, **Wenceslau**, e a minha irmã **Olívia**, pelas orações e palavras de incentivo que me proporcionaram conforto e forças para eu seguir sempre em frente independentemente dos obstáculos.

Ao **Olívio** por tudo que fez com o objetivo de me dar estrutura psicológica, material e espiritual viabilizando a conclusão desta etapa na minha vida.

Ao **LAFEPE** por viabilizar minha vinda e permanência em Campinas-SP.

Ao **HSE-PE** por viabilizar minha vinda e permanência em Campinas-SP.

A **Acripel** por viabilizar a minha vinda e permanência em Campinas-SP.

A Prof^a. **Regina Scivoletto** que sem a intervenção da qual este curso não teria sido concluído.

A toda equipe de colaboradores da **Cartesius e Galeno** que me proporcionaram treinamento e aprendizagem sem os quais este trabalho não teria sido concluído de forma satisfatória.

A **Lu chi shen** por todos os ensinamentos, orientações e correções que tanto contribuíram para o meu aprendizado e qualidade final do trabalho.

Ao **Mauro Sucupira** por todos os ensinamentos, treinamento e apoio que foram fundamentais ao meu aprendizado.

Ao Dr. **Jaime Ilha** pelos ensinamentos e orientações.

A Prof^a. **Wanda** pela imensa ajuda e ensinamentos fundamentais a realização deste trabalho.

A **Rosana** pela grande ajuda com a correção e formatação das referências bibliográficas, citações e tudo mais.

Ao **Toninho**, ao **Eder**, a **Tainá**, a **Denise** Goulart, ao **Gabriel** Garcia, ao **Hugo** do Vale, a **Andréa** Penteado, ao José **Jorge**, ao **Jones** Pereira, a **Elisiene** Martins, ao **César**, ao **Sandro**, ao André **Borges**, ao **Ravi**, ao **Marcelo** Darini, ao **Rogério** de Oliveira pelos ensinamentos e apoio.

Ao laboratório **Ranbaxy**, Dewas India pela participação no estudo.

A **Dra. Claudia** e ao **Dr. Donato** pelas orientações e treinamento.

Ao **Alberto Oliveira**, **Beatriz Bicalho** e **Gustavo Mendes** meus sinceros agradecimentos e reconhecimento por todas as orientações e ensinamentos.

A **Marinalva** pela importante acolhida e apoio fraterno.

Ao **Dr. José Rubens** pelas diretrizes que me foram dadas.

A todos os **colegas, membros da equipe do Prof. Dr. Gilberto de Nucci** e a todos aqueles que me acolheram, apoiaram, transmitiram conhecimento, incentivaram e que de alguma forma contribuíram para a conclusão do curso, meu aprendizado, realização dos trabalhos e redação da tese, os meus mais sinceros sentimentos de reconhecimento e agradecimentos.

“Ensinar tudo a todos é a única via de realizar a felicidade humana aqui e na eternidade”

Comenius

“... a educação é a obra da minha vida, e todos os meus instantes são empregados em meditar sobre essa matéria; feliz quando encontro algum meio novo de descobrir novas verdades. (...) não faltarei à minha missão, pois penso compreendê-la. (...) não tenho o tolo orgulho de acreditar cumpri-la com perfeição, mas tenho ao menos a convicção de cumpri-la com consciência.”

Hippolyte Léon Denizard Rivail

	PÁG.
RESUMO	<i>xlvi</i>
ABSTRACT	<i>li</i>
1- INTRODUÇÃO	55
2- OBJETIVOS	63
3- REVISÃO DA LITERATURA	67
1- Diabetes mellitus e antidiabéticos orais	69
2- Clorpropamida	73
2.1- Farmacocinética e metabolismo.....	73
2.2- Mecanismo de ação.....	74
2.3- Indicações.....	74
2.4- Contra-indicações.....	75
2.5- Reações adversas.....	75
2.6- Interações medicamentosas.....	75
3- Pesquisa clínica e considerações éticas	76
4- Definições importantes	79
4.1- Biodisponibilidade.....	79
4.2- Bioequivalência.....	80
4.3- Denominação comum brasileira (DCB).....	80
4.4- Denominação comum internacional (DCI).....	80
4.5- Equivalência terapêutica.....	80
4.6- Equivalentes farmacêuticos.....	81

4.7- Medicamento.....	81
4.8- Medicamentos bioequivalentes.....	81
4.9- Medicamento sob patente.....	82
4.10- Medicamento de referência.....	82
4.11- Alternativa farmacêutica.....	82
4.12- Medicamento inovador.....	82
4.13- Medicamento similar.....	83
5- Absorção e fatores que afetam a absorção.....	83
5.1- Fatores físicos.....	84
5.1.1- Solubilidade intrínseca e velocidade de dissolução.....	84
5.1.2- Dimensão das partículas.....	86
5.1.3- Morfologia dos cristais.....	87
5.1.4- Constante de dissociação (pK_a) e ionização.....	87
5.2- Fatores químicos.....	88
5.2.1- Lipofilia.....	88
5.2.2- Estabilidade.....	89
5.3- Fatores metabólicos.....	90
5.3.1- Trato gastrointestinal.....	90
5.3.2- Fígado.....	91
5.3.3- Pulmões.....	92
5.4- Fatores fisiológicos e patológicos.....	93
5.4.1- Idade, gravidez e estados patológicos.....	93
5.4.2- Local de absorção.....	94

5.4.3- Tempo de residência, esvaziamento gástrico e presença de alimento.	95
5.4.4- Redistribuição e recirculação.....	96
6- Espectrometria de massa.....	97
6.1- Descrição básica do sistema.....	99
6.1.1- Fonte de ionização.....	99
6.1.2- Analisadores de massas.....	101
6.1.3- Detectores.....	102
6.2- Espectrometria de massa sequencial (<i>Tandem Mass Spectrometry</i>).....	102
4- PARTE EXPERIMENTAL – MATERIAIS E MÉTODOS.....	105
7- Materiais.....	107
7.1- Fase clínica.....	107
7.2- Fase analítica.....	108
7.3- Fase estatística.....	110
8- Métodos.....	110
8.1- Fase clínica.....	110
8.1.1- Desenho do estudo.....	110
8.1.2- Recrutamento seleção e retirada dos voluntários.....	111
8.1.3- Critérios de inclusão do voluntário.....	113
8.1.4- Critérios de exclusão do voluntário.....	114
8.1.5- Critérios de retirada do voluntário.....	116
8.1.6- Considerações gerais.....	117
8.1.7- Medicações/Tratamentos e condutas permitidas e não permitidas antes e durante o estudo.....	118
8.1.8- Coleta de amostras.....	119

8.1.9- Processamento e armazenamento inicial das amostras.....	120
8.1.10- Avaliação de segurança.....	120
8.1.11- Considerações éticas.....	122
8.1.11.1- Termo de consentimento livre e esclarecido.....	122
8.1.11.2- Confidencialidade.....	123
8.2- Fase analítica.....	123
8.2.1- Processamento e estocagem das amostras de plasma dos voluntários.....	124
8.2.2- Preparo das soluções.....	124
8.2.3- Preparo dos padrões de calibração, controles de qualidade (QC) e limite inferior de quantificação (LOQ).....	125
8.2.4- Teste de desempenho do sistema (TSS- <i>System Suitability Test</i>).....	126
8.2.5- Validação do método de análise.....	127
8.2.5.1- Curva de calibração, coeficiente de correlação linear, linearidade, faixa de aplicação (<i>range</i> analítico), limite de quantificação.....	129
8.2.5.2- Precisão e exatidão.....	131
8.2.5.3- Recuperação.....	133
8.2.5.4- Supressão iônica.....	134
8.2.6- Testes de estabilidade das amostras, solução mãe e de trabalho.....	134
8.2.7- Procedimento de extração.....	135
8.2.8- Condições e parâmetros cromatográficos e espectrográficos.....	136
8.2.9- Preparo da corrida analítica (Lista).....	137
8.2.10- Validação da corrida analítica.....	138
8.3- Fase estatística.....	139

5- RESULTADOS.....	141
9- Fase clínica.....	143
9.1- Dados demográficos.....	143
9.2- Lista de aleatorização.....	144
10- Fase analítica.....	146
10.1- Validação do método analítico.....	146
10.1.1- Supressão Iônica, <i>Carry Over</i> , <i>Cross Talk</i> , Branco de Matriz....	146
10.1.2- Curva de calibração.....	146
10.1.3- Determinação do limite inferior de quantificação.....	147
10.1.4- Validação intra-lote e inter-lote.....	148
10.1.5- Validação do processo de re-injeção.....	148
10.1.6- Recuperação.....	149
10.2- Testes de estabilidade das amostras e soluções.....	150
10.3- Validação dos lotes de amostras dos voluntários.....	153
10.3.1- Teste de desempenho do sistema (<i>TSS-System Suitability Test</i>).....	154
10.3.2- Validação das curvas de calibração.....	155
10.3.3- Validação intra-lote e validação inter-lote.....	156
10.4- Reanálise.....	158
10.5- Determinação da concentração de clorpropamida nas amostras dos voluntários.....	160

11- Fase estatística.....	166
11.1- Concentração plasmática média x tempo.....	166
11.2- Parâmetros farmacocinéticos.....	167
11.3- Estatística descritiva dos parâmetros farmacocinéticos.....	168
11.4- Media das razões T/R.....	169
11.5- Razão T/R.....	170
11.6- Avaliação da bioequivalência.....	171
6- DISCUSSÃO.....	173
7- CONCLUSÃO.....	187
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	191
9- ANEXOS.....	213

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

PORTUGUÊS	INGLÊS	SIGNIFICADO/SIGNIFY
	ADA	American Diabetes Association
ANOVA	ANOVA	Análise de variância / Analysis of Variance
Anvisa		Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC	AUC	Área sob a curva conc. X tempo/Area under the drug concentration-time curve
ASC_{0-inf}	AUC_{0-inf}	$AUC_{0-Tlast} + C_{last}/k_e$
ATP	ATP	Adenosina trifosfato/Adenosine triphosphate
	$AUC_{0-Tlast}$	Area under the drug concentration-time curve from dosing time to the last measurement time point with a value above LOQ or baseline
	BLOQ	Below limit of quantitation
BPC	GCP	Boas práticas clínicas / Good Clinical Practices
BPF	GMP	Boas práticas de fabricação/ Good Manufacture Practices
BPL	GLP	Boas práticas laboratoriais / Good Laboratory Practices
b.p.m		Batimentos por minuto
CCD	TLC	Cromatografia de Camada Delgada / Thin-Layer Chromatography
	CE	Capillary eletrophoresis
	CI	Chemical ionization
	CID	Collision induced dissociation

CEP		Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos
	CFR	Code of Federal Regulations
CG	GC	Cromatografia Gasosa /Gas Chromatography
CLAE	HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência/High Performance Liquid Chromatography
CL/EM-EM	LC/MS-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa/ liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry
	C _{Last}	Last observed quantifiable concentration at T _{last}
C _{max}	C _{max}	Concentração Plasmática Máxima / Maximum drug concentration in plasma
CNS-MS		Conselho Nacional de Saúde-Ministério da Saúde
CONEP		Conselho Nacional de Ética em Pesquisas com Seres Humanos
CQ	QC	Controle de qualidade/ Quality Control
CV	CV	Coeficiente de Variação/ Coefficient of Variation
	CYP	Cytochrome P
DCB		Denominação Comum Brasileira
DCI		Denominação Comum Internacional
d.i.	i.d.	Diâmetro Interno/Internal Diameter
DM		Diabetes Mellitus
DMNID		Diabetes Mellitus Não Insulino Dependente
DP	SD	Desvio Padrão/Standard Deviation
DPR	RSD	Desvio Padrão Relativo/Relative Standard Deviation

EA	AE	Evento Adverso/ Adverse Event
ECG		Eletrocardiograma
	EI	Electron impact
	ES	Electron spray
EUA	USA	Estados Unidos da America / States United of American
eV	eV	Eletron Volts/Electron Volts
EXCEL	EXCEL	Planilha de cálculos comercial
	FDA	Food and Drug Administration
FRC	CRF	Formulário de Relato de Casos/Case Report Form
	FTMS	Fourrier Transform Mass Spectrometry
	GraphPad Prism	Aplicativo gráfico e estatístico comercial
HbA		Hemoglobina A
IC	CI	Intervalo de Confiança/Confidence interval
	ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements For Registration of Pharmaceuticals for Human Use
	ICR	Ion Ciclotron ressonance
IMC	BMI	Índice de Massa Corpórea / Body-Mass Index
	IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
	K ⁺ ATP	Canais de potássio sensíveis ao ATP
	k _e	Constante de eliminação/elimination constant
LAD		Lista de amostras de concentração desconhecidas (refere-se às amostras de plasma dos voluntários)

LIQ	LOQ	Limite inferior de quantificação
Log		Logarítmo
LRE		Lista de Repetição com Amostras dos Voluntários
LRP		Lista de Repetição de uma lista completa
MAX	MAX	Máximo/Maximum
MIN	MIN	Mínimo/Minimum
min	min	Minuto(s)/Minute(s)
mL	mL	Mililitro(s)/Milliliter(s)
M		Molar
	M/S	Missed sample
	MS/MS	Espectrometria de massa seqüencial /Tandem mass spectrometry
	MS	Espectrometria de massa/Mass spectrometry
MRM	MRM	Monitoramento de reação múltipla/Multiple reaction monitoring
m/z	m/z	Relação massa/carga
n.a.	n.a.	Não Aplicável/Not applicable
n.d. ou ND	n.d. ou ND	Não Determinado/Not Determined
n.s.		Não Significativo
N/D	N/A	Não Disponibilizado/Not Available
	NDA	New Drug Application
	ng/mL	Nanograma por Mililitro/Nanogram per milliliter
OMS	WHO	Organização Mundial de Saúde/World Health Organization

	OHSR	Office of Human Subjects Research
PA		Princípio Ativo
pH		Potencial Hidrogeniônico
PI	IS	Padrão Interno/Internal Standard
POP	SOP	Procedimento Operacional Padrão/ Standard Operating Procedure
RPM	RPM	Rotações por minuto/revolution per minute
	SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SQR		Substância Química de Referência
	T _{last}	Time of last quantifiable concentration
t _{max}	t _{max}	Tempo para alcançar C _{max} /Time to reach maximum drug concentration
t _{1/2}	t _{1/2}	Tempo de meia vida/Terminal half-life = ln2/k _{el}
T/R	T/R	Razão Teste/Referência - Ratio Test/Reference
	TOF	Time of flight
	TSS	System Suitability Test
	VDI	Velocidade de Dissolução Intrínseca
	UKPDS	United Kingdom Prospective Diabetes Study
	USDA	United States Department of Agriculture
	USP	United States Pharmacopoeia
	WinNonLin	Sistema comercial de avaliação farmacocinética e estatística
μ	μ	Micron (10 ⁻⁶)
μL		Microlitro
UI	IU	Unidade Internacional /International Unit

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1- Padrões de referência.....	108
Tabela 2- Materiais e instrumentos.....	108
Tabela 3- Reagentes e solventes.....	109
Tabela 4- Equipamentos e software.....	109
Tabela 5- Preparo das soluções.....	125
Tabela 6- Preparo dos padrões de calibração.....	126
Tabela 7- Preparo dos QC e LOQ.....	126
Tabela 8- Parâmetros da cromatografia.....	136
Tabela 9- Parâmetros da espectrometria de massa.....	137
Tabela 10- Dados demográficos de todos os voluntários e por gênero.....	145
Tabela 11- Validação das curvas de calibração.....	147
Tabela 12- Limite inferior de quantificação.....	147
Tabela 13- Precisão e exatidão intra-lote e inter-lote.....	148
Tabela 14- Validação do procedimento de reinjeção.....	148
Tabela 15- Teste de recuperação clorpropamida.....	149
Tabela 16- Teste de recuperação glibenclamida.....	149
Tabela 17- Teste de estabilidade no auto-injetor.....	150
Tabela 18- Teste de estabilidade no congelamento e descongelamento.....	150
Tabela 19- Teste de estabilidade de curta duração.....	151
Tabela 20- Teste de estabilidade de longa duração.....	151
Tabela 21- Estabilidade da solução mãe de clorpropamida.....	152

Tabela 22-	Estabilidade da solução mãe de glibenclamida.....	152
Tabela 23-	Estabilidade da solução de trabalho de clorpropamida.....	152
Tabela 24-	Identificação das listas de amostras analisadas dos voluntários.....	153
Tabela 25-	Informações adicionais sobre as listas de amostras.....	154
Tabela 26-	Dados do System Suitability Test (TSS) e perfil de resposta do PI.....	154
Tabela 27-	Equações das curvas de calibração de cada lista de amostras.....	155
Tabela 28-	Controle de qualidade intra – lote.....	156
Tabela 29-	Controle de qualidade inter – lote.....	157
Tabela 30-	Amostras de controle de qualidade.....	158
Tabela 31-	Percentual de reanálise.....	158
Tabela 32-	Motivos e decisões quanto às re-análises.....	159
Tabela 33-	Concentração plasmática de clorpropamida em $\mu\text{g/mL}$ - voluntários 01 a 06.....	160
Tabela 34-	Concentração plasmática de clorpropamida em $\mu\text{g/mL}$ - voluntários 07 a 12.....	161
Tabela 35-	Concentração plasmática de clorpropamida em $\mu\text{g/mL}$ - voluntários 13 a 18.....	162
Tabela 36-	Concentração plasmática de clorpropamida em $\mu\text{g/mL}$ - voluntários 19 a 24.....	163
Tabela 37-	Concentração plasmática de clorpropamida em $\mu\text{g/mL}$ - voluntários 25 a 30.....	164
Tabela 38-	Concentração plasmática de clorpropamida em $\mu\text{g/mL}$ - voluntários 31 a 36.....	165

Tabela 39-	Parâmetros farmacocinéticos.....	167
Tabela 40-	Estatística descritiva.....	168
Tabela 41-	Razão teste/referência.....	170
Tabela 42-	Tratamento estatístico da razão teste/referência para ASC e C _{max}	171
Tabela 43-	Referências – Fase clínica.....	177
Tabela 44-	Referências – Fase analítica.....	179

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1- Concentração plasmática Média x Tempo. Dados normais (sem transformação logarítmica).....	166
Figura 2- Concentração plasmática Média x Tempo. Dados com transformação logarítmica.....	166
Figura 3- Razão T/R para $C_{\max}$	169
Figura 4- Razão T/R para ASC_{0-72}	169
Figura 5- Perfil da linha de base após injeção de plasma branco demonstrando ausência de supressão iônica.....	234
Figura 6- Cromatograma após injeção de amostra com o analito e padrão interno (PI).....	234
Figura 7- Cromatograma referente à amostra de um pool de plasma branco normal e PI.....	235
Figura 8- Cromatograma referente à amostra de um pool de plasma branco normal com analito na concentração do LOQ e PI.....	235
Figura 9- Curva de calibração.....	236
Figura 10- Média da área do PI.....	236

LISTA DE QUADROS

	PÁG.
Quadro 1- Materiais, equipamentos e instrumentos.....	107
Quadro 2- Produtos teste e referência.....	107
Quadro 3- Exames laboratoriais do processo de recrutamento e seleção dos voluntários.....	111
Quadro 4- História clínica e exames físicos referenciados no FRC.....	112
Quadro 5- Refeições.....	117
Quadro 6- Protocolo de coleta das amostras.....	120
Quadro 7- Testes de <i>carry-over</i> , <i>cross talk</i> , branco da matriz.....	128
Quadro 8- Lote de validação.....	128
Quadro 9- Concentrações e critérios de aceitação da curva de calibração.....	130
Quadro 10- Critérios para aprovação do limite inferior de quantificação (LOQ).....	131
Quadro 11- Critérios de aceitação para validação intra-lote e inter-lote.....	133
Quadro 12- Testes de estabilidade.....	135
Quadro 13- Lote de amostras desconhecidas – Protocolo de extração.....	137
Quadro 14- Critérios para execução de re-análise.....	138
Quadro 15- Critérios de decisão para definir valores aceitos após a re-análise.....	139
Quadro 16- Dados demográficos.....	143
Quadro 17- Lista de aleatorização.....	144
Quadro 18- Eventos adversos.....	145
Quadro 19- Supressão iônica, <i>carry over</i> , <i>cross talk</i> , Branco de matriz.....	146

RESUMO

A biodisponibilidade relativa, de duas formulações de comprimido de clorpropamida 250 mg, foi avaliada em voluntários sadios de ambos os sexos. O estudo foi aberto, aleatorizado, cruzado em dois períodos com intervalo de três semanas, para o qual foram selecionados 36 voluntários. As amostras de sangue foram coletadas antes da administração de dose única de cada formulação, uma Teste (T) e outra Referência (R) e durante 72 horas após a administração. A concentração plasmática de clorpropamida foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa sequencial (LC/MS/MS), usando ionização tipo *eletrospray* no modo positivo com monitoramento de reação múltipla (MRM). O limite de quantificação foi de 0,1 µg/mL. O padrão interno foi a glibenclamida. A ASC_{0-72} , que representa ASC truncada, C_{max} e T_{max} foram obtidas da curva de concentração plasmática em função do tempo. A ASC foi calculada empregando o método trapezoidal. Apenas ASC_{0-72} e C_{max} de ambas as formulações foram estatisticamente comparados. A média geométrica e o intervalo de confiança (90%) da razão T/R foram respectivamente 93,99 (87,11%–101,41%) para C_{max} e 92,45 (85,96%–99,44%) para ASC_{0-72} . Como o intervalo de confiança (90%), para ASC_{0-72} e C_{max} , apresenta-se dentro do intervalo de confiança de 80-125% proposto pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e pelo *Food and Drug Administration* (FDA-EUA), concluiu-se que ambas as formulações estudadas são bioequivalentes, no que diz respeito à magnitude e a velocidade de absorção e, portanto podem ser clinicamente intercambiáveis sem prejuízo terapêutico.

Palavras-chave: Clorpropamida, bioequivalência, HPLC acoplada à espectrometria de massa sequencial (LC/MS/MS), biodisponibilidade, farmacocinética.

ABSTRACT

The relative bioavailability between two formulations of chlorpropamide was assessed on the dosage form tablet 250 mg, in healthy volunteers of both sexes. The study was conducted using an open, randomized, two-period crossover design with the 3-week washout interval. Thirty-six subjects were selected. The blood samples were collected at the time prior to dosing and over an interval of 72 hours, of the single dose of each formulation, a Test (T) and another Reference (R). Chlorpropamide plasma concentrations were analyzed by high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) with positive ion electrospray ionization using multiple reaction monitoring (MRM). The limit of quantification was 0,1 µg/mL for plasma Chlorpropamide analysis. The internal standard was the glibenclamide. The AUC₀₋₇₂, which represents AUC truncated, C_{max} and T_{max} were obtained from plasma concentration-time curve. The AUC was calculated using the trapezoidal rule. Only AUC₀₋₇₂ and C_{max} of the each other formulations were statistically compared. The geometric mean and respective 90% confidence interval (CI) of T/R ratios were 93.99 (87.11%–101.41%) for C_{max} and 92.45 (85.96%-99.44 %) for AUC₀₋₇₂. Since the interval confidential (90%) for AUC₀₋₇₂ and C_{max} ratios were within the 80-125% interval proposed by the Agência Nacional de Vigilância Sanitária-Brazil (Brasil-Anvisa) and by the Food and Drug Administration (USA-FDA), it was concluded that both the formulations studied are bioequivalent for both the rate and extent of absorption and, therefore can be used interchangeably without impairing therapeutic effectiveness.

Key words: Chlorpropamide, bioequivalence, high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC/MS/MS), bioavailability, pharmacokinetic.

1- INTRODUÇÃO

O impulso conferido pelos avanços científicos dos séculos XIX e XX associado aos interesses comerciais das indústrias farmacêuticas, resultou no desenvolvimento de inúmeros novos produtos numa verdadeira explosão de novos fármacos. Muitas destas indústrias, fundadas naquela época são, na atualidade, campeãs de faturamento no mercado mundial (Modell, 1961).

Os Estados Unidos da América (EUA) tiveram, certamente, papel de relevo no desenvolvimento do conceito de regulação quanto à saúde pública, especialmente pelo fato de reconhecerem, verdadeiramente e sem sofismas, a igualdade entre os homens, aspecto este praticamente inexistente nas sociedades monárquicas absolutistas dos séculos XVII e XVIII. Com um padrão de colonização basicamente comunitário difundiu essa mentalidade igualitária e participante, que se cristalizou na própria constituição (Oliveira, 2006).

Nos EUA, um marco no controle de produtos farmacêuticos foi o *Pure Food And Drug Act* de 1906. Foi a primeira lei federal norte-americana destinada a regulamentar a fabricação de medicamentos e exigia que medicamentos comercializados entre Estados apresentassem as especificações quanto a pureza, potência e qualidade (Allen *et al*, 2005).

A lei de 1906 foi em 1938 substituída pelo *Food, Drug and Cosmetic Act* e foi então criado o *Food and Drug Administration* (FDA) para administrar e executar a legislação. Esta lei teve sua publicação motivada pelo lamentável e trágico episódio ocorrido com o Prontosil, 4-[(2,4-Diaminophenyl)azo] benzenesulfonamide, utilizado com sucesso, até então na forma farmacêutica sólida, teve sua formulação alterada e passou a ser produzido na forma de elixir tendo como solvente o dietilenoglicol, que é uma substância altamente tóxica. Pacientes que faziam uso do medicamento como antimicrobiano foram a óbito por insuficiência renal causada pelo excipiente nefrotóxico. A partir de então, a distribuição e o uso de qualquer fármaco ou medicamento só poderia ser feita após petição de um medicamento novo (*new drug application* - *NDA*) e submissão deste à aprovação pelo FDA comprovando a sua segurança e assim obtendo a aprovação para comercialização (Allen *et al*, 2005).

Novos fármacos são desenvolvidos sob proteção de patente que protege o investimento, feito no desenvolvimento do fármaco, dando a companhia que o patrocina o exclusivo direito à venda do medicamento enquanto esta estiver sob vigência. Após a

expiração, deste período de validade da patente, outros fabricantes podem produzir e comercializar o fármaco e formulações do mesmo (Di Masi, 2001).

Quando uma molécula recém sintetizada demonstra causar efeito sobre sistemas biológicos, com o potencial de trazer benefício, tem início uma extensa bateria de testes pré-clínicos (in vitro e em animais) e de pré-formulação seguidos de procedimentos e testes regulatórios. Sendo então, feita a administração em humanos pela primeira vez, iniciando-se assim, os primeiros estudos para avaliação da segurança e eficácia em humanos. Geralmente, o tempo entre os estudos pré-clínicos e a aprovação pelo FDA, para início da comercialização nos EUA, é de 10,4 anos e emprega de 0,8 a 1,7 bilhões de dólares. Das moléculas submetidas aos vários testes, apenas uma em cada dez será aprovada para comercialização, sendo as causas de eliminação: eficácia e segurança insuficientes, dificuldade de formulação e de produção, e benefícios econômicos insatisfatórios (Di Masi, 2001).

Nas décadas de 60 e 70, quando os avanços na área de tecnologia farmacêutica possibilitaram a cópia de formas farmacêuticas, que após a expiração dos direitos de patente, puderam ser comercializadas, foram relatados vários casos de falhas terapêuticas, nos EUA, por falta de eficácia (amitriptilina, carbamazepina, glibenclamida, oxitetraclina) e por intoxicações (carbamazepina, fenitoína, digoxina) (Rheinstein, 1990). Desde então, com o desenvolvimento de técnicas analíticas, suficientemente sensíveis para a determinação da concentração plasmática de fármacos, foram identificadas diferenças significativas entre formulações distintas de um mesmo fármaco produzidas por diferentes fabricantes. Assim foram retomados os conceitos de biodisponibilidade, inicialmente propostos na década de 40, e levantada a necessidade da determinação de bioequivalência (Chow e Liu, 1992).

A eficácia tornou-se um requisito em 1962, com a emenda *Kefauver- Harris Amendment*, posterior ao gravíssimo incidente com a talidomida (Contergan), que causou muitos casos de neuropatias periféricas irreversíveis e defeitos congênitos (focomelia). O produto não havia sido aprovado nos Estados Unidos pelo FDA, mas após alguns anos no mercado mundial foi retirado deixando o lamentável saldo de cerca de 8000 crianças afetadas em 46 países inclusive o Brasil. Com a promulgação desta emenda todos os

medicamentos, introduzidos no mercado norte americano após 1962, possuem alguma prova de eficácia (Oliveira, 2006).

A partir de 1970 o FDA começa a requerer evidências de biodisponibilidade para alguns processos de liberação de medicamentos. Os métodos estatísticos, empregados na determinação de bioequivalência, são também investigados e criteriosamente estudados por um comitê especialmente formado para este fim, com conseqüente publicação de vários trabalhos apresentando métodos de tratamento estatístico dos dados de bioequivalência, ao longo das décadas de 70 e 80. Em 1977 é efetivada a regulamentação para submissão dos dados de biodisponibilidade para liberação de novos medicamentos constando na 21^a edição do *Code of Federal Regulation* (CFR) Part 320 (Allen *et al*, 2005; FDA, 1977).

Em 1984 o FDA foi autorizado a aprovar medicamentos genéricos pelo *Drug Price Competition and Patent Term Restoration Act*. Com a promulgação desta lei a proteção patentária foi estendida para empresas inovadoras manterem a exclusividade na comercialização de suas formulações (Patterson e Jones, 2006).

A Organização Mundial de Saúde (OMS), desde a implantação do programa de medicamentos essenciais em 1981, vem colaborando com os países para assegurar a disponibilização de medicamentos essenciais. O ponto central da estratégia de uma política de medicamentos essenciais, no atual contexto, é a adoção de programas de medicamentos genéricos, entendendo assim a comercialização de produtos rotulados exclusivamente de acordo com a denominação comum internacional (DCI) e com características de intercambialidade com os produtos inovadores (Bermudez, 1994).

O Brasil estabeleceu uma legislação para medicamentos genéricos a partir de 1999, com a publicação da lei 9787/99 e da resolução 391/99, bem como pela criação da Anvisa - Agencia Nacional de Vigilância Sanitária pela lei nº 9782, de 26 de Janeiro de 1999, que definiu o sistema nacional de vigilância sanitária (Brasil, 1999a; Brasil, 1999b; Brasil, 1999c).

O pioneirismo nos estudos de biodisponibilidade e bioequivalência no Brasil coube a Gilberto de Nucci, que na década de 90 implantou a Unidade Miguel Servet no Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade

Estadual de Campinas – FCM - Unicamp e posteriormente criação da Unidade Cartesius, na Universidade Estadual de São Paulo - USP (Brasil, 2002).

A Anvisa conceitua medicamento genérico como “Produto igual ou comparável ao de referência (inovador, original, de marca) em quantidade de princípio ativo (PA), concentração, forma farmacêutica, modo de administração e qualidade, podendo ser com ele intercambiável, sem prejuízo de eficácia terapêutica e segurança. É geralmente produzido após expiração ou renúncia da patente e de direitos de exclusividade, comprovando sua eficácia, segurança e qualidade através de testes de biodisponibilidade e equivalência terapêutica” (Brasil 1999b; Brasil 1999c).

Os estudos de bioequivalência, ou biodisponibilidade comparativa, avaliam a intercambialidade de formulações farmacêuticas baseados na premissa de que as características de absorção definem a biodisponibilidade e que para um fármaco ser eficaz é necessário que uma quantidade suficiente de fármaco alcance os sítios de ação, em tempo apropriado, para exercer o seu efeito farmacológico (Balthasar, 1999; Verbeeck, 2006).

Existe um equilíbrio dinâmico entre a concentração do fármaco no plasma sanguíneo e a concentração no(s) sítio(s) de ação. Esse equilíbrio é denominado distribuição, cuja magnitude depende consideravelmente da sua lipofilia. Uma vez que é difícil avaliar o fármaco no próprio sítio ou nos sítios de ação é freqüente considerar a concentração do fármaco no plasma, como um meio substitutivo para avaliar a sua concentração nestes locais. Assim sendo, é a concentração total de fármaco no plasma que normalmente é determinada para fins clínicos (Chen *et al*, 2001).

Qualquer ação que afete a liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica, a sua dissolução nos fluidos gastrintestinais, a sua permeação e sua estabilidade na barreira gastrintestinal ou na circulação porta-hepática terá influencia sobre a sua biodisponibilidade. Afetando assim a fração da dose que de fato será absorvida, de um dado fármaco incorporado em uma forma farmacêutica, por meio da qual foi administrado (Hendriksen *et al*, 2003).

Diversos fatores podem influenciar a velocidade e a extensão da absorção, e, portanto, o percurso do fármaco no plasma, assim como no(s) sítio(s) de ação. Esses fatores incluem:

- os alimentos ingeridos pelo paciente,
- o efeito do estado de uma doença sobre a absorção do fármaco,
- a idade do paciente,
- o(s) sítio(s) de absorção do fármaco administrado,
- a administração concomitante de outros fármacos,
- as propriedades físico-químicas do fármaco administrado,
- o tipo de forma farmacêutica, a composição e o seu método de produção,
- o tamanho da dose,
- a frequência da administração (Dressman *et al*, 1998).

Desse modo, um determinado fármaco pode apresentar diferenças quanto a sua biodisponibilidade, se for administrado:

- No mesmo tipo de forma farmacêutica, mas por diferentes vias de administração, por exemplo, uma solução aquosa de um determinado fármaco administrada pelas vias oral e intramuscular;
- Pelas mesmas vias de administração, mas utilizando formas farmacêuticas diferentes, por exemplo, um comprimido, uma cápsula de gelatina dura e uma suspensão aquosa administradas pela via oral;
- No mesmo tipo de forma farmacêutica, pela mesma via de administração, mas em diferentes formulações da forma farmacêutica, por exemplo, suspensões aquosas para administração oral formuladas de modo diferente.

A variabilidade na biodisponibilidade, apresentada por uma determinada formulação, pode fazer com que a sua concentração plasmática resulte muito elevada, causando efeitos colaterais; ou muito baixa, tornando o fármaco ineficaz.

Os estudos de biodisponibilidade comparativa não requerem a reprodução dos extensos ensaios clínicos que foram necessários no desenvolvimento do fármaco original (Chow e Liu, 1992). Estes testes envolvem normalmente algumas centenas de pacientes e voluntários sadios. Desde que a segurança e eficácia do produto inovador, tido como referência, já tenham sido bem estabelecidas, por ensaios clínicos, e freqüentemente muitos anos de uso em pacientes, com sua permanência no mercado, é cientificamente desnecessário, e seria pouco ético, requerer que tais provas sejam repetidas em seres humanos, para cada medicamento genérico cuja solicitação de autorização de fabricação e comercialização seja requerida aos órgãos competentes. Entretanto, em alternativa a isto, os candidatos a medicamentos genéricos devem demonstrar cientificamente que são bioequivalentes, ou seja, apresentam o mesmo desempenho que a droga pioneira. Os estudos de bioequivalência são por isso de custos muito menores e muito mais éticos, que os que seriam necessários caso fossemos admitir a necessidade de realização dos estudos clínicos de fases I, II e III para todas as formulações candidatas ao mercado, já que envolvem um número de sujeitos de pesquisa sadios muito menor e não envolvem pacientes (Westlake, 1979).

2- OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método de análise para clorpropamida, em matriz biológica (plasma humano), usando a técnica de cromatografia líquida de alto desempenho acoplada à espectrometria de massa sequencial (LC/MS/MS), e a aplicação do método desenvolvido nas determinações plasmáticas do fármaco, com o objetivo de comparar os parâmetros farmacocinéticos de duas formulações de clorpropamida 250 mg, na forma farmacêutica de comprimido, avaliando a equivalência terapêutica entre elas.

3- REVISÃO DA LITERATURA

1- Diabetes mellitus e antidiabéticos orais

Em 1869 Paul Langerhans identificou as células, agrupadas em ilhas ou ilhotas (Bhonde *et al*, 2007), responsáveis pela produção de insulina, e que posteriormente receberam o seu nome, ilhotas de Langerhans. Minkowski e Von Mehring em 1889 obtiveram provas indiretas da função destas células após sedimentarem os estudos iniciados por Malpighi e Bruner, os quais no século XVII produziram diabetes mellitus (DM) pela pancreatectomia. Posteriormente foram muitas as tentativas de extrair e identificar a substância pancreática responsável pela regulação da glicemia (Bonner e Smith, 1994). Em 1921, Frederick Grant Banting (1891-1941), em colaboração com Charles Herbert Best (1899-1978), descobriu e isolou a isletina (posteriormente chamada insulina) comprovando que a injeção desse hormônio baixa a glicemia de cães pancreatomizados, melhorando drasticamente os sintomas da doença (Owens *et al*, 2001). Em 1922 Abel purificou e cristalizou a insulina. A sequência de aminoácidos do hormônio foi estabelecida em 1960, por Sanger (Arduino, 1980) o que permitiu a síntese completa da proteína, em 1963 por Katsoyannis, Meienhofer e colaboradores com posterior elucidação de sua estrutura tridimensional por Hodgkin, Mercola e colaboradores em 1972 (Joslin, 1994).

A Insulina, especialmente produzida pelas células β , é um dos mais importantes reguladores da homeostase de glicose, sendo liberada em condições basais uniformes e principalmente em resposta a uma alteração de glicemia (Shoelson e Halban, 1994; Emilien *et al.*, 1999).

Embora referências ao DM tenham sido feitas pelos egípcios no ano 3000 aC, sendo mencionada no famoso papiro de Ebers (1500 aC), foi somente no século II da era cristã que Celsus e Ereteus (Roma) deram-lhe o nome atual e forneceram uma das mais bem elaboradas descrições da doença e de sua história natural (Krall *et al*, 1994).

O DM é um conjunto de distúrbios metabólicos que apresentam em comum a hiperglicemia, que se instalam quando o pâncreas não produz insulina de forma eficiente, ou quando o organismo não pode efetivamente usá-la, conduzindo com o tempo a séria degeneração de vários sistemas do organismo (Cheng e Fantus, 2005).

A incidência de DM na atualidade tem atingido proporções epidêmicas. Recentes estimativas indicam que eram 171 milhões de pessoas no mundo com diabetes no ano de 2000, com projeção de chegar a 366 milhões no ano 2030. O número de indivíduos diabéticos está aumentando devido ao crescimento e ao envelhecimento populacional, à maior urbanização, crescente prevalência de obesidade e sedentarismo, bem como à maior sobrevida do paciente com DM (World *Health Organization* - WHO, 2002a; WHO, 2002b).

A OMS, a *American Diabetes Association* (ADA) e a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) adotam uma classificação para a DM que inclui quatro classes clínicas: DM tipo 1, DM tipo 2, diabetes mellitus gestacional e outros tipos específicos de DM, sendo os tipo 1 e 2 os de maior prevalência (ADA, 1997; SBD, 2003; WHO, 2006).

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1), forma presente em 5-10% dos casos, é o resultado de uma destruição das células beta pancreáticas com conseqüente deficiência de insulina. É tratado com insulina (ADA, 1997).

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é a forma presente em 90-95% dos casos e caracteriza-se por defeitos na ação e na secreção da insulina (Kahn e Shechter, 1991). O DM2 pode ocorrer em qualquer idade, mas é geralmente diagnosticado após os 40 anos. Os pacientes não são dependentes de insulina exógena para sobrevivência, porém eventualmente, podem necessitar de tratamento com insulina para a obtenção de um controle metabólico adequado (ADA, 1997). Segundo Scheen (2005) o DM é caracterizado por dois defeitos fisiopatológicos principais: a resistência à insulina, resultando em aumento da produção hepática de glicose e redução da sua utilização periférica, e o comprometimento da função secretora da célula β , basal que é estimulada por substrato, particularmente a glicose. A hiperglicemia, quando existe cronicamente, compromete a função da célula β e acentua a resistência à insulina, sendo referida como glicotoxicidade, e os efeitos decorrentes dos elevados valores dos ácidos graxos circulantes são conhecidos como lipotoxicidade (Turner *et al*, 1999; Inzucchi, 2002).

O critério diagnóstico é baseado na avaliação dos sintomas (poliúria, polidipsia), da glicemia e da resistência à insulina. A hemoglobina glicada mostrou-se

inferior às glicemias de jejum e pós-prandial para o diagnóstico de DM. O termo genérico hemoglobina glicada refere-se a um conjunto de substâncias formadas com base em reações entre a hemoglobina normal, a hemoglobina A (HbA) e alguns açúcares. O nível de hemoglobina glicada reflete a glicemia média de um indivíduo durante os dois a três meses anteriores à data de realização do teste e, assim, tem grande utilidade na avaliação do nível de controle glicêmico e da eficácia do tratamento vigente. Por outro lado, os testes de glicemia refletem o nível de glicose sangüínea no exato momento da realização do teste. Para uma avaliação mais global e mais clinicamente fundamentada do controle glicêmico, ambos os métodos são importantes, uma vez que as informações que fornecem se complementam. Níveis de hemoglobina glicada acima de 7% estão associados a um risco progressivamente maior de complicações crônicas (WHO, 2006).

Quando o paciente com DM2 não responde ou deixa de responder adequadamente às medidas não-medicamentosas, devem ser indicados um ou mais agentes antidiabéticos (insulina, hipoglicemiantes orais), com o objetivo de controlar a glicemia e promover a queda da hemoglobina glicada. Estudos epidemiológicos (*United Kingdom Prospective Diabetes Study* - UKPDS 13, 1995; UKPDS 33, 1998; UKPDS 34, 1998) sustentam a hipótese de uma relação direta entre os níveis sangüíneos de glicose e a doença microvascular. Assim sendo, o tratamento tem como meta a obtenção de níveis glicêmicos tão próximos da normalidade quanto os possíveis de serem alcançados na prática clínica, devendo dispor de boas estratégias para a sua manutenção em longo prazo (Inzucchi, 2002; Krentz e Bailey, 2005).

Grandes avanços, na área dos agentes antimicrobianos, vieram com os trabalhos de Gerhard Domagk, em 1935, mostrando a eficácia do corante sulfamídico, *p*-sulfamidocrisoidina (Prontosil rubrum), no tratamento das pneumonias, escarlatina e infecções urinárias. Sendo posteriormente provado por pesquisadores do Instituto Pasteur da França, que o princípio dotado de ação antibiótica era um metabólico do Prontosil, a sulfanilamida. Outro importante avanço contemporâneo às pesquisas com as sulfonamidas foi o desenvolvimento da penicilina por Howard Walter Florey e Ernest Boris Chain, a partir da descoberta de Alexander Fleming, publicada em 1928 no “*Annals of Microbiology*

and Bacteriology”, de que um PA, extraído de algumas espécies de fungos do gênero *Penicillium*, tinha atividade antibiótica (Oliveira, 2006; Allen *et al*, 2005).

A atividade hipoglicemiante de compostos sulfamídicos foi primeiramente descrita, em 1930, por Ruiz e colaboradores. Entretanto, seu emprego somente se postulou, em 1942, com as observações de Jabon e colaboradores da ocorrência de hipoglicemia em casos de febre tifóide tratados com o bacteriostático sulfatiazol (*p*-aminobenzeno-sulfanilisopropiltiodiazol) e, sobretudo depois dos clássicos estudos de Loubatières, demonstrando a alta eficiência hipoglicemiante deste sulfamídico em animais (Skillman e Feldman, 1981). Em 1955 Franke e Fuchs relataram os bons resultados obtidos no tratamento de DM com a carbutamida (*p*-metilbenzeno-sulfonil-butiluréia). Logo em seguida sintetizou-se a tolbutamida (*p*-aminobenzeno-sulfonil-butilurea), desprovida de atividade antimicrobiana e muito menos tóxica que a carbutamida. A clorpropamida (*p*-clorobenzeno-sulfonil-propilurea) foi introduzida em 1957 e desde então vários outros hipoglicemiantes do grupo das sulfonilureas foram sintetizados (Lebovitz, 1994; Arduíno, 1980).

Os Hipoglicemiantes orais são substâncias que, quando ingeridas, têm finalidade de baixar a glicemia e mantê-la normal (jejum < 100mg/dl e pós-prandial < 140mg/dl) (Inzucchi, 2002; ADA, 1998). Sob esse conceito amplo, de acordo com o mecanismo de ação principal, os antidiabéticos orais podem ser separados em: medicamentos que incrementam a secreção pancreática de insulina (sulfonilureas e glinidas); reduzem a velocidade de absorção de glicídios (inibidores das alfa-glicosidases); diminuem a produção hepática de glicose (biguanidas); e/ou aumentam a utilização periférica de glicose (glitazonas). No entanto, com finalidade prática, os antidiabéticos orais podem ser classificados em duas categorias principais: os que aumentam a secreção de insulina (hipoglicemiantes) e os que não aumentam (anti-hiperglicemiantes) (SBD, 2006; Campbell, 2000).

As sulfoniluréas consistem de uma classe de fármacos que tradicionalmente são divididos em dois grupos: as de primeira geração (tolbutamida e clorpropamida) e as de segunda geração (glibenclamida, glipizida e gliclazida) (Melander, 2004). Todos os membros desta classe de drogas que consistem em arilsulfoniluréias substituídas. Diferem

por substituições ocorridas na posição para do anel de benzeno e em um resíduo de nitrogênio da fração da uréia (Kahm e Shechter, 1991).

Quando comparada com placebo as sulfoniluréas reduzem em média a HbA em 1,0-1,5% (Cheng e Fantus, 2005).

2- Clorpropamida

A clorpropamida (1-[(p-Clorofenil)sulfanil]-3-propilurea), uma sulfoniluréia efetiva no tratamento da DM2 e utilizada desde a década de 1950 (Murray, 1958), é um pó cristalino branco, com leve odor. A sua fórmula empírica é $C_{10}H_{13}ClN_2O_3S$ e o peso molecular é 276,74. Praticamente insolúvel em água em pH 7,3. Sua solubilidade em pH 6 é 2,2 mg/mL (The Merck Index, 2001). DL_{50} em ratos é 580 mg/mL (Goldenthal, 1971).

2.1- Farmacocinética e metabolismo

A Clorpropamida é rapidamente absorvida após administração oral, com a concentração máxima sangüínea atingida em 1 a 7 horas, após a sua administração. Apresenta ligação com as proteínas plasmáticas de cerca de 90% (Ferner e Chaplin, 1987).

Sofre extenso metabolismo hepático (Kirchheiner *et al*, 2005) é 80% biotransformado, entretanto o anel para-aminobenzeno permanece intacto e os principais metabólicos são 2-hidroxi e 3-hidroxiclorpropamida, e para-clorobenzeno sulfoniluréia (Taylor, 1972) e para-clorobenzeno sulfonamida (Shon *et al*, 2004). Em humanos a 2 hidroxilação é principal rota de metabolização sendo a 2-hidroxiclorpropamida presente na urina em quantidades variando de 43 a 69 %. As isoformas CYP2C9 e CYP2C19 são responsáveis por esta reação de hidroxilação, sendo a CYP2C9 a principal envolvida com a reação (Shon *et al*, 2004; Hasler *et al*, 1999).

A excreção renal da forma inalterada (não biotransformada) é da ordem de 20% e pode ser aumentada com a alcalinização da urina e reduzida quando é reduzido o pH da

urina. Isto sugere que a diurese alcalina pode ser empregada no tratamento da intoxicação por superdosagem (Ferner e Chaplin, 1987).

A administração por longos períodos com doses terapêuticas, não produz um acúmulo excessivo no sangue, dado que os níveis de absorção e de excreção se estabilizam entre 5 e 7 dias após o início do tratamento (Ferner e Chaplin, 1987).

Estudos realizados por Taylor e colaboradores (1977) indicaram que a dissolução *in vitro* das formulações de clorpropamida é dependente do pH, sendo praticamente completa após 30 minutos, em pH 7,2, mas de apenas 40-60% após 90 minutos, em pH 2.

O estudo realizado por Monro e Welling, em 1974, apresentou a ampla variação entre duas das formulações testadas, sugerindo que a absorção da clorpropamida pode ser influenciada pelo tamanho das partículas do fármaco.

O estudo realizado por Sartor e colaboradores em 1980 sugere que a absorção da clorpropamida não é influenciada pela ingestão de alimento, que reduz C_{max} sem, entretanto afetar a biodisponibilidade (Sartor *et al*, 1980; Ferner e Chaplin, 1987).

2.2- Mecanismo de ação

As sulfoniluréias causam hipoglicemia através da estimulação da liberação de insulina das células β pancreáticas. O mecanismo molecular envolve o bloqueio dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K^+ATP), que controlam o potencial de membrana nas ilhotas de Langerhans. A inibição do K^+ATP reduz a condutância ao K^+ e conseqüentemente, promove despolarização e influxo de cálcio, através dos canais de cálcio voltagem-dependente. O aumento da concentração de cálcio intracelular promove a liberação de insulina (Siconolfi-Baez *et al*, 1990; Malaisse, 1990).

2.3- Indicações

A clorpropamida possui atividade terapêutica como hipoglicemiante oral indicada no tratamento do DM2, não insulino dependente (DMNID), não cetótica, e que não

pode ser controlado apenas com a dieta. A clorpropamida deve ser um tratamento complementar da dieta, específica do diabético e não, suplementar desta (Melander, 2004).

2.4- Contra-indicações

A clorpropamida é contra-indicada nos casos de acidose, queimaduras graves, coma diabético, infecção aguda, cetoacidose. A relação risco-benefício deverá ser avaliada na presença de insuficiência supra-renal, febre elevada, disfunção hepática ou renal, insuficiência hipofisária. Também o é nos casos de hipersensibilidade conhecida ao fármaco ou a fármacos de estrutura similar (sulfas, etc.) e componentes da formulação, bem como, nos casos de diabetes mellitus insulínica (Tipo 1). O seu uso é contra-indicado na gravidez e lactação (Merlob, 2002). Ainda não foram estabelecidas a eficácia e a segurança de clorpropamida em crianças (Little e Boniface, 2005).

2.5- Reações adversas

Em geral, dependem da dose administrada, são transitórias e respondem à diminuição ou suspensão do tratamento (Emilien *et al*, 1999). O efeito adverso mais comum é a hipoglicemia, que pode ser provocada pela ingestão inadequada de calorias ou aumento das necessidades calóricas, podendo ser em alguns casos com gravidade elevada (coma, convulsões ou distúrbios neurológicos) (Harrower, 2000).

Também há uma tendência ao ganho de peso, que pode estar associado ao estímulo do apetite ou mesmo a retenção de líquido e edema. Raras vezes pode ocorrer icterícia colestática, desconforto gastrointestinal (3% dos pacientes), erupções cutâneas, lesão de medula óssea (raras), fraqueza muscular, ataxia, tontura, confusão mental, fotossensibilidade, discrasias sanguíneas. Foram descritas também: dores de cabeça, sonolência. Pode ocorrer sensibilidade cruzada com sulfonamidas antibacterianas (Melander, 2004).

2.6- Interações medicamentosas

A clorpropamida se liga às proteínas plasmáticas em elevado percentual e sofre

extenso metabolismo pelas enzimas microsossomais (citocromo P450). Assim, a interação com fármacos que são capazes de deslocá-las de seus sítios de ligação às proteínas plasmáticas ou inibir o seu metabolismo também podem potencializar a hipoglicemia (sulfonamidas antibacterianas, cloranfenicol, propranolol, salicilatos, fenilbutazona, probenecida, cumarínicos, inibidores da monoaminoxidase, miconazol, cetoconazol e álcool) (Scheen, 2005).

Alguns fármacos tendem a produzir hiperglicemia: as tiazidas e outros diuréticos, anfetaminas, corticosteróides, fenotiazinas e agentes derivados da tiróide, estrogênios, contraceptivos orais, fenitoína, ácido nicotínico, simpatomiméticos, agentes bloqueadores dos canais de cálcio e isoniazida (Melander, 1987).

A ingestão concomitante de álcool pode provocar, em função da dose ingerida, reação do tipo dissulfiram, caracterizada por vermelhidão na face, pescoço, às vezes a nível de tórax e hiperemia conjuntival (Harrower, 2000).

3- Pesquisa clínica e considerações éticas

A relação entre médicos, cientistas, e a indústria farmacêutica pode ser mutuamente vantajosa, e plena de complexidade ética (Robinson, 1992). A bioética é o estudo de questões éticas associadas à assistência a saúde ou à realização de pesquisas biomédicas (Vieira e Hossne, 1998). A maioria das abordagens bioéticas é por natureza independente das perspectivas religiosas ou teológicas da sociedade. Da mesma forma é independente da análise legal. As leis são uma consideração nas tomadas de decisão no campo da bioética, mas por si só não determinam a moralidade de uma ação. As leis refletem um consenso da sociedade sobre questões e são estabelecidas para determinar um padrão mínimo de comportamento. Da mesma forma, embora as crenças religiosas possam de alguma forma representar um papel importante na determinação da moralidade pessoal, o esforço mais amplo da bioética tende a se destituir de perspectiva religiosa particular. Assim, ao mesmo tempo em que a religião e a lei fornecem parâmetros para ações aceitáveis, as crenças religiosas e o conhecimento da lei são em muitas situações

insuficientes para guiar as ações morais no contexto clínico e científico (Hulley *et al*, 2006).

Embora a análise bioética seja multifatorial, ela se fundamenta sobre quatro princípios morais essenciais, constituindo uma estrutura sólida para a análise crítica dos diversos temas debatidos pela bioética. São eles: o princípio da autonomia, do benefício, do não malefício e da justiça. O princípio da autonomia que considera todo indivíduo como possuidor de valor e reconhece o seu direito moral de decidir sobre sua vida. O princípio do benefício que preconiza, como sendo o objetivo maior de uma investigação científica ou procedimento médico, o benefício ao indivíduo ou a sociedade como um todo. O princípio do não malefício que afirma que todo e qualquer dano deve ser evitado e quando inevitável minimizado ao extremo. Estes dois princípios ditam que o objetivo global, dos avanços científicos, não devem ser maiores que o de proteger os seres humanos sujeitos de pesquisa. O princípio de justiça estabelece que casos parecidos recebam tratamento semelhante e que distinções devem ser demonstradas e justificadas de forma consistente. O princípio da justiça não determina o que é justo ou razoável, mas que os critérios sejam previamente e amplamente discutidos e uma vez determinados aplicados com justiça (Siqueira *et al*, 2000).

Em 1947 foi elaborado na Alemanha o Código de Nuremberg, após o julgamento dos médicos nazistas pelos crimes cometidos, durante a Segunda Grande Guerra Mundial, em pesquisas experimentais envolvendo seres humanos. Este tornou internacional, pela primeira vez, algumas diretrizes éticas que propõem como essencial o consentimento voluntário do sujeito de pesquisa (Nuremberg code, 1947). Nos anos subseqüentes, o conteúdo ético deste Código passou por uma ampliação, resultando na Declaração de Helsinque, adotada pela Associação Médica Mundial, na 18ª Assembléia Médica Mundial, realizada na Finlândia em 1964. Este documento, com suas revisões de 1975, 1983, 1989, 1996 e 2000, fazem referência à criação de comitês independentes para análise ética de projetos de pesquisa com seres humanos (WHO, 2004). Sendo este o documento internacional que rege os parâmetros para experimentações envolvendo seres humanos, e propõem que estas pesquisas, envolvendo seres humanos, devem ressaltar a proteção a integridade e privacidade dos sujeitos, bem como a minimização de riscos e

desconfortos, a busca de benefícios, a não discriminação e a proteção de grupos de pessoas vulneráveis (*Office of Human Subjects Research - OHSR*, 2004).

Em 1977 o FDA publica suas diretrizes para pesquisas clínicas e em 1988 o órgão publica as Normas de Boas práticas clínicas (ICH - *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, 1995b; ICH, 1996).

Em 1988, o Conselho Nacional de Saúde (CNS), do Ministério da Saúde, publicou a Resolução 01/88 (Brasil, 1988), com marcante participação do Prof. Elisaldo Carlini em sua elaboração. Uma das determinações desta Resolução era que toda instituição de saúde que realizava pesquisas em seres humanos, credenciada pelo CNS, tivesse um comitê de ética. Algumas das principais atribuições desse Comitê eram autorizar a realização de pesquisas em seres humanos e orientar os pesquisadores quanto aos aspectos éticos e de segurança biológica. Neste documento é determinado que a pesquisa somente pode ser iniciada após parecer favorável, por escrito, de um comitê de ética. Em 1996, após revisão da Resolução 01/88 (Brasil, 1988), o CNS publicou a Resolução 196/96 (Brasil, 1996), ficando revogada a anterior de 1988. A resolução 251/97 (Brasil, 1997) complementa a de 1996, sendo exercida por meio destas a regulamentação do Ministério da Saúde sobre pesquisas clínicas (Goldim *et al*, 2003).

As duas estratégias que têm sido utilizadas no intuito de proteger os indivíduos estudados são: a utilização do consentimento livre e esclarecido (CLE) e a avaliação do protocolo de pesquisa por um comitê de ética em pesquisa (CEP). Este comitê, devido a sua independência e representatividade acadêmica e social, deve garantir que as pesquisas tenham um aval institucional, além da responsabilidade já assegurada pelo pesquisador. O CLE permite à pessoa, que está sendo convidada a participar de um projeto de pesquisa, compreender os procedimentos, riscos, desconfortos, benefícios e direitos envolvidos, visando permitir uma decisão consciente e autônoma, e para tanto podem ser usados recursos didáticos, mas é fundamental assinatura do consentimento escrito. Este é o documento mais importante no processo de salvaguarda do ser humano participante da pesquisa clínica (Hardy *et al*, 2004; Craig e Stitzel, 2005).

4- Definições importantes

4.1- Biodisponibilidade

Biodisponibilidade é definida, pelo FDA no CFR título 21 parte 320.1 como sendo a velocidade e a extensão nas quais um PA é absorvido a partir de uma forma farmacêutica e se torna disponível no sítio de ação (FDA, 1977). Esta definição enfoca os processos pelos quais o PA é liberado da forma farmacêutica que o veicula e se move até o local de ação. A sua avaliação pode ser considerada um ensaio de controle de qualidade *in vivo* de uma formulação farmacêutica. O conceito de biodisponibilidade é crítico para a compreensão do desempenho de uma formulação farmacêutica (Westlake, 1979).

Sob uma perspectiva farmacocinética, os dados de biodisponibilidade para uma dada formulação fornecem uma estimativa da fração relativa da dose administrada oralmente que é absorvida e alcança a circulação sistêmica quando comparada com os dados de biodisponibilidade para uma solução ou suspensão oral, ou para uma solução intravenosa (FDA, 1977). Além do que, estudos de biodisponibilidade fornecem outras informações farmacocinéticas úteis relativas à distribuição, eliminação, efeitos de alimento sobre a absorção do fármaco, a proporcionalidade da dose e linearidade na farmacocinética do fármaco. Os dados de biodisponibilidade também podem fornecer indiretamente informações sobre as propriedades do fármaco antes de cair na circulação sistêmica, tais como permeabilidade e a influência das enzimas pré-sistêmicas e/ou sistemas transportadores (glicoproteína P) (Chow e Liu, 1992; Keogh e Kunta, 2006).

A biodisponibilidade para formas farmacêuticas administradas oralmente pode ser documentada desenvolvendo um perfil de disponibilização sistêmica, obtido medindo-se a concentração do fármaco e, quando apropriado, de seus metabólitos ativos (Midha *et al*, 2004) ao longo do tempo, coletando amostras da circulação sistêmica. Através do emprego de um estudo de biodisponibilidade adequadamente planejado, o desempenho de uma formulação farmacêutica, durante as pesquisas clínicas, pode-se ter evidências de segurança e eficácia antes da comercialização do medicamento, permitindo inclusive melhorias na formulação (FDA, 1977).

A Anvisa define biodisponibilidade como indicativo da velocidade e a extensão da absorção de um PA em uma forma de dosagem, a partir de sua curva concentração, na circulação sanguínea (ou sua excreção na urina), em função do tempo (Brasil, 1999b; Brasil, 2007).

4.2- Bioequivalência

Bioequivalência é definida, pelo FDA no CFR título 21 parte 320.1 como sendo a ausência de diferenças estatisticamente significativas na biodisponibilidade de formulações que são entre si equivalentes ou alternativas farmacêuticas, quando administrados na mesma dose molar, sob condições similares em um estudo adequadamente planejado (FDA, 1977).

4.3- Denominação comum brasileira (DCB)

“Denominação do fármaco ou princípio farmacologicamente ativo aprovada pelo órgão federal responsável pela vigilância sanitária” (Brasil, 1999b; Brasil, 2007).

4.4- Denominação comum internacional (DCI)

“Denominação do fármaco ou princípio farmacologicamente ativo recomendada pela Organização Mundial da Saúde” (Brasil, 1999b; Brasil, 2007).

4.5- Equivalência terapêutica

Dois medicamentos são considerados terapeuticamente equivalentes se eles são farmaceuticamente equivalentes e, após administração na mesma dose molar, seus efeitos em relação à eficácia e segurança são essencialmente os mesmos, o que se avalia por meio de estudos de bioequivalência apropriados, ensaios farmacodinâmicos, ensaios clínicos ou estudos *in vitro* (Brasil, 2007; Westlake, 1979).

4.6- Equivalentes farmacêuticos

São medicamentos que contém 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. Deve 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 (FDA, 1977; Brasil, 2007; Balthasar, 1999).

4.7- Medicamento

Os medicamentos são sistemas de liberação de fármacos, ou seja, constituem um meio de administrar um fármaco de maneira segura, eficiente, reprodutível e prática ao organismo. A Anvisa aplica o seguinte conceito para medicamento: “Produto farmacêutico, tecnicamente obtido ou elaborado, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico”. (Lei nº 5.991, de 17/12/73). É uma forma farmacêutica acabada que contém o fármaco, geralmente em associação com adjuvantes farmacotécnicos (FDA, 1977; Brasil, 1973).

4.8- Medicamentos bioequivalentes

Os medicamentos bioequivalentes são equivalentes farmacêuticos que, ao serem administrados na mesma dose molar, nas mesmas condições experimentais, não apresentam diferenças estatisticamente significativas em relação à biodisponibilidade (FDA, 1977; Brasil, 2007).

4.9- Medicamento sob patente

São produtos inovadores, registrados no órgão federal responsável pela vigilância sanitária e comercializados no país. Sua eficácia, segurança e qualidade foram comprovadas cientificamente junto ao órgão federal competente, por ocasião de seu registro e ainda estão sob proteção patentária não podendo ser copiados para a fabricação de genéricos, a não ser por alguma medida extraordinária (Maia Neto, 2005; Patterson e Jones, 2006).

4.10- Medicamento de referência

Medicamento inovador registrado no órgão federal responsável pela vigilância sanitária e comercializado no país, cuja eficácia, segurança e qualidade foram comprovadas cientificamente junto ao órgão federal competente, por ocasião do registro (Brasil, 1999b; Brasil, 2007). Este tipo de medicamento já foi objeto de patente, a qual já expirou, tendo esse nome pelo fato de servir como referência para a fabricação e liberação de genérico do fármaco que veicula (Chow e Liu, 1992).

4.11- Alternativa farmacêutica

São diferentes formas farmacêuticas (comprimidos, suspensão, etc.) nas quais a velocidade e extensão da absorção não mostram diferenças estatisticamente significativas quando administradas sob condições similares (Westlake, 1979; Verbeeck, 2006).

4.12- Medicamento inovador

Medicamento comercializado no mercado nacional, composto por, pelo menos, um fármaco ativo, sendo que esse fármaco deve ter sido objeto de patente, mesmo já extinta, por parte da empresa responsável por seu desenvolvimento e introdução no

mercado do país de origem. Em geral, o medicamento inovador é considerado medicamento de referência, entretanto, na sua ausência, a Anvisa indicará o medicamento de referência (Brasil, 2007).

4.13- Medicamento similar

A medida provisória n 2190-34 de 23 de agosto de 2001, e suas atualizações têm a seguinte redação para o conceito de medicamento similar: “... Aquele que contem o mesmo ou os mesmos princípios ativos, apresentando a mesma concentração, forma farmacêutica, via de administração, posologia e indicação terapêutica e que é equivalente ao medicamento registrado no órgão federal responsável pela vigilância sanitária”. Os medicamentos similares podem diferir somente em características relativas ao tamanho e forma do produto, prazo de validade, embalagem, rotulagem, excipientes e veículos, devendo sempre ser identificado por nome comercial ou marca (Brasil, 2001a; Brasil, 2001b; Brasil, 1999b; Brasil, 2007).

5- Absorção e fatores que afetam a absorção

Com exceção da via intravenosa, na qual o fármaco é introduzido diretamente na corrente sanguínea, todas as demais vias de administração, para as quais seja requerida uma ação sistêmica, implicam a absorção do fármaco para a corrente sanguínea. A absorção é o processo pelo qual os fármacos atravessam as membranas biológicas do local de administração até a corrente sanguínea. No procedimento de avaliação da bioequivalência (biodisponibilidade relativa) de duas formulações, a absorção é o processo, no que diz respeito a sua velocidade e magnitude, que é efetivamente o parâmetro estudado (Balthasar, 1999).

Quando um fármaco é administrado, utilizando-se uma forma farmacêutica destinada à liberação bucal, respiratória, retal, intramuscular ou subcutânea, ele passa do tecido de absorção diretamente para a corrente sanguínea. Quando o fármaco é

administrado pela via oral, o início do efeito pode ser retardado, devido ao tempo de trânsito gastrointestinal, ao processo de absorção e às características da circulação sanguínea hepatoentérica. A forma física da forma farmacêutica oral pode, também, influir na velocidade de absorção e no início da atividade, sendo que as soluções atuam mais rapidamente que as suspensões, que, por sua vez, atuam, em geral, mais rápido que as cápsulas e os comprimidos. Assim, as formas farmacêuticas podem ser ordenadas segundo o tempo de início do efeito terapêutico. Porém, os fármacos, independentemente da via de administração, são substâncias estranhas ao corpo humano. Os processos de distribuição, metabolização e eliminação começam imediatamente após a sua absorção, ou mesmo ainda a nível intestinal, até que sejam eliminados do corpo por meio da urina, das fezes, da saliva, da pele ou dos pulmões, tanto na forma inalterada como na biotransformada (Florence e Attwood, 2003).

O padrão de absorção de fármacos varia consideravelmente de uma substância para outra, assim como entre diferentes vias de administração. As formas farmacêuticas são projetadas para ceder o fármaco, em uma forma que se ajuste à absorção, a partir de cada via de administração selecionada. As formas farmacêuticas orais são normalmente planejadas para obter um efeito sistêmico decorrente da absorção do fármaco por vários epitélios e mucosas do trato gastrointestinal. As mais amplamente utilizadas são os comprimidos, as cápsulas, as suspensões, as soluções e as emulsões (Aulton, 2005).

5.1- Fatores físicos

5.1.1- Solubilidade intrínseca e velocidade de dissolução

Para que a absorção do fármaco ocorra é necessário que as suas moléculas estejam em solução no local de absorção (Charman *et al*, 1997). A solubilidade de uma molécula deve ser estudada em diversos pH (Hendriksen *et al*, 2003). Nos casos em que a solubilidade aumenta com o pH, a priori, poucos problemas ocorrerão (Florence e Attwood, 2003; Amidon e Lobenberg, 2000).

A desagregação e dissolução da forma farmacêutica sólida nos fluidos gastrintestinais é um pré-requisito para que ocorra a absorção a que se segue a distribuição do fármaco para a circulação sistêmica. A dissolução depende em parte da solubilidade do fármaco no meio que o rodeia (Lachman *et al*, 2001). A velocidade de dissolução intrínseca (VDI) é independente dos efeitos de formulação e mede as propriedades intrínsecas do fármaco e sais em função do meio de dissolução, ou seja, pH, força iônica, contra-íons, etc. Comparando-se a VDI de um sal em água com a obtida em um ácido ou uma base, ou a base livre com seus sais no mesmo meio, pode-se medir a capacidade do sal em controlar o seu micro ambiente (Black *et al*, 2007). A VDI de um fármaco é importante apenas quando esta for a etapa determinante da velocidade no processo de absorção (Avdeef *et al*, 2000). Amidon *et al*. (1995) propôs a classificação biofarmacêutica dos fármacos a qual distingue quatro classes de fármacos, de acordo com sua solubilidade ao longo da faixa de pH gastrintestinal e sua permeabilidade pela mucosa gastrintestinal. Nesta classificação duas das quatro potenciais barreiras à absorção são, nesse caso, consideradas pelo esquema que, foi originariamente proposto para a identificação de produtos orais sólidos de liberação imediata, para os quais os testes de bioequivalência *in vivo* poderiam não ser necessários. Contudo, este sistema de classificação também é útil para classificar fármacos e prever problemas de biodisponibilidade que podem surgir durante os vários estágios do processo de desenvolvimento. As classes propostas por Amidon e colaboradores são:

classe I: alta solubilidade/alta permeabilidade;

classe II: baixa solubilidade/alta permeabilidade;

classe III: alta solubilidade/baixa permeabilidade;

classe IV: baixa solubilidade/baixa permeabilidade.

Um fármaco é considerado altamente solúvel quando a maior dose é solúvel em 250 mL ou menos de meio aquoso, na faixa de pH de 1 a 8. O volume corresponde ao volume mínimo previsto no estômago, quando uma forma farmacêutica é administrada em jejum, com um copo de água. Se o volume de meio aquoso necessário para dissolver o fármaco for maior que 250 mL, nas condições de pH variando de 1 a 8, considera-se que o

fármaco possui baixa solubilidade. Um fármaco é considerado altamente permeável quando se presume que a extensão da absorção em seres humanos seja maior que 90% da dose administrada. Existem várias técnicas que permitem estimar ou mesmo medir a velocidade de permeação por membranas biológicas, as quais são utilizadas para avaliar a absorção oral em seres humanos. Elas abrangem desde previsões computacionais (*in silício*) até métodos físico-químicos e biológicos, que por sua vez podem ser métodos *in vitro*, *in situ* e *in vivo* (Kaus *et al*, 1999).

De um modo geral, para substâncias solúveis, a velocidade de dissolução é a etapa que limita a absorção, enquanto, para as substâncias pouco solúveis, é a solubilidade (Leblanc *et al*, 1997). Solutos polares são mais solúveis na água do que em fases orgânicas, enquanto que, o inverso é verdadeiro para solutos não polares. Partículas ionizadas apresentam uma solubilidade em água superior em relação aquelas que não estão ionizadas. A solubilidade total dos ácidos ou das bases em meio aquoso é, pois, dependente do pH. Para fármacos absorvidos por difusão passiva, aqueles que apresentam uma solubilidade reduzida em água tendem a ter uma velocidade de absorção oral menor daqueles que apresentam uma solubilidade aquosa mais elevada (Lachman *et al*, 2001). Outro efeito importante sobre a solubilidade principalmente sobre a de um eletrólito pouco solúvel é do íon comum, que neste caso resulta em redução de solubilidade. Esse efeito de “*salting out*” resulta da remoção de moléculas de água como solvente devido à hidratação competitiva de outros íons. O processo reverso, “*salting in*”, ocorre com ânions grandes, que “expandem” a estrutura da água, aumentando a solubilidade de alguns compostos fracamente solúveis em água (Aulton, 2005).

5.1.2- Dimensão das partículas

A área superficial das partículas de fármaco é outro parâmetro que influencia a sua dissolução e, conseqüentemente a absorção, pois o tamanho das partículas determina a área de superfície específica. Partículas pequenas com uma grande área de superfície total dissolvem-se mais rapidamente do que as partículas maiores, embora ambas tenham a mesma solubilidade intrínseca. O tamanho das partículas parece ter pouca influência sobre

a absorção dos fármacos com solubilidade aquosa elevada, mas pode ter um efeito acentuado sobre a absorção de fármacos com solubilidade aquosa reduzida. Entretanto quando o pó é muito fino pode ocorrer dificuldade pela tendência que este pode ter de flutuar e não se impregnar, com a presença de cristais envolvidos com uma fina camada de ar conferindo a esta certa hidrofobicidade e o que dificulta a dissolução (Florence e Attwood, 2003).

5.1.3- Morfologia dos cristais

Os polimorfos são formas cristalinas que diferem pelo empacotamento e orientação das moléculas sob condições de cristalização diferentes. As propriedades físico-químicas destas formas cristalinas (densidade, solubilidade, ponto de fusão) são influenciadas pelas forças intermoleculares (Singhal e Curatolo, 2004). Os polimorfos diferem no ponto de fusão, solubilidade e densidade (Snider *et al*, 2004). Por exemplo, polimorfos com forças de atração fracas (estado de energia elevado) apresentam uma solubilidade maior do que aquelas com forças de atração fortes. Podem ser observadas diferenças nas velocidades de dissolução e na absorção entre polimorfos de um determinado composto (Singhal e Curatolo, 2004). Quando as diferenças na energia do cristal são pequenas, os efeitos do polimorfismo sobre a absorção podem não ser observados, como é o caso da clorpropamida que apresenta concentrações plasmáticas comparáveis para três formas polimórficas (Hörter e Dressman, 2001).

5.1.4- Constante de dissociação (pK_a) e ionização

Os compostos não ionizados ácidos, ou básicos, penetram nas membranas lipídicas do trato gastrointestinal mais facilmente do que as espécies ionizadas. A velocidade de absorção gastrointestinal de um fármaco está, assim, diretamente relacionada com a concentração das suas formas não ionizadas no local de absorção o que é uma função do pK_a do composto e do pH do ambiente. O pH do trato gastrointestinal varia aproximadamente entre 1,2 e 3,5 no estômago, 5,0 a 6,0 no duodeno e 6,5 a 8,0 do jejuno e

intestino grosso. Na gama de pHs de 1 a 8, a fração não ionizada varia bastante para ácidos com valores de pK_a entre 2,5 e 7,5 (diminuindo com o aumento do pH) e para bases com valores de pK_a entre 5 e 11. Para estes compostos prevê-se que a absorção seja dependente do pH. Ácidos fracos com valores de pK_a maiores do que 7,5 e bases com valores inferiores a 5 apresentam uma absorção independente do pH. Normalmente fármacos com valores de pK_a entre 5 e 7 são absorvidos mais facilmente do que os fármacos ácidos com valores de pK_a elevados. Compostos anfóteros apresentam menos problemas de absorção quando estão na forma de duplo íon (*zwitterions*) enquanto que, compostos neutros não apresentam absorção dependente do pH (Hörter e Dressman, 2001).

5.2- Fatores químicos

5.2.1- Lipofilia

Membranas biológicas, sendo de natureza lipídica, são normalmente mais permeáveis a substâncias lipídicas. O transporte através destas membranas depende, assim, em parte da solubilidade no lipídio das espécies que se difundem. A solubilidade em lipídios de um fármaco é determinada pela presença de grupos não polares na estrutura da molécula do fármaco bem como dos grupos ionizáveis que são afetados pelo pH local. As espécies não ionizadas dos fármacos apresentam uma solubilidade nos lipídios maior do que as espécies ionizadas. A relação entre a lipofilia e a hidrofilia de toda a molécula, traduzida pelo coeficiente de partição óleo-água, determina se uma molécula se difunde facilmente ao sofrer difusão passiva através da membrana gastrointestinal ou não. Normalmente o coeficiente de partilha óleo-água de uma molécula constitui um índice útil da sua propensão para ser absorvida por difusão passiva. No entanto, uma solubilidade elevada em lipídios não tem necessariamente que favorecer a absorção, amenos que a solubilidade em água seja relativamente baixa de forma a reter o fármaco na fase aquosa (Korolkovas, 1974; Thomas, 2003).

A absorção de um fármaco pode ser aumentada frequentemente por modificações estruturais apropriadas que servem para alterar a razão lipofilia/hidrofilia relativa do composto, como por exemplo, a esterificação de um ácido solúvel em água.

Outra forma de melhorar a absorção de compostos com baixa solubilidade em lipídios é através da inclusão de adjuvantes na forma farmacêutica, os quais em vez de alterarem a solubilidade do fármaco no lipídio em questão, aumentam a absorção por alteração da permeabilidade da membrana do epitélio (Florence e Attwood, 2003).

5.2.2- Estabilidade

A integridade química da molécula deve ser mantida até que o composto atinja o local desejado de absorção. Obviamente a instabilidade química da forma farmacêutica ou, a instabilidade da molécula antes de ser transportada através da barreira biológica inicial afeta a biodisponibilidade (Korolkovas e Burckhalter, 1988).

A formação de sais constitui uma modificação química que aumenta, normalmente, a solubilidade da molécula em água. No entanto, a solubilidade aquosa pode não ser a única determinante da biodisponibilidade. Por exemplo, sais de ácidos fracos podem precipitar ao primeiro contato com o ambiente gástrico após a administração oral. Assim, a dissolução do precipitado é um pré-requisito para que a absorção ocorra. Numa situação estática a concentração e as características de partição do fármaco em relação ao pH da superfície da mucosa, onde a absorção ocorre, pode ser estudada independentemente. A dinâmica do transporte através do trato gastrointestinal e através das membranas gastrintestinais é, no entanto, de tal forma que o efeito da formação do sal sobre a biodisponibilidade do fármaco no medicamento é normalmente imprevisível. O efeito observado é uma função da velocidade de dissolução do sal ou do seu precipitado, do pH gástrico, do tempo de esvaziamento gástrico, da mobilidade intestinal, do pK_a do fármaco, etc. (Rodríguez-Spong *et al*, 2004).

A instabilidade química é frequentemente uma função do pH. Compostos a que sejam bastante lábeis a pH neutro são, normalmente, os fármacos mais adequados. Enquanto que a instabilidade na gama de pHs alcalina é encontrada frequentemente sob condições fisiológicas, a estabilidade em ácidos é uma preocupação particular para fármacos para os quais se pretenda uma administração oral (Charman *et al*, 1997). A formação de pró-fármacos é usada frequentemente para aumentar a absorção de um

fármaco devido à modificação química. Um pró-fármaco ideal é aquele que é quantitativamente absorvido e biotransformado no fármaco durante o seu transporte até ao local de ação (circulação sistêmica, cérebro, etc.) (Hörter e Dressman, 2001).

5.3- Fatores metabólicos

5.3.1- Trato gastrointestinal

A eliminação pré-sistêmica de fármacos ocorre, geralmente, após administração oral. A metabolização pode ocorrer no lúmen ou na parede do intestino, ou no fígado. As enzimas que metabolizam fármacos e que são encontradas na parte superior do intestino são, provavelmente, originárias da secreção das células de Paneth ou de células provenientes da descamação celular da mucosa para o lúmen (Leblanc *et al*, 1997).

Da flora intestinal faz parte uma grande diversidade de microrganismos constituindo uma fonte importante de atividade metabólica. São bactérias, sobretudo anaeróbicas, estão envolvidas em reações de redução. Os fármacos que contêm grupos nitro podem ser reduzidos a aminas as quais podem apresentar toxicidade. Fármacos com enxofre, lactulose e alguns catárticos podem ser ativados por estas bactérias. Estas reações podem ser complementares ao metabolismo ocorrendo subsequentemente na parede do tubo digestivo ou no fígado, mas podem ser também regeneradoras (hidrólise do glucoronídeo e metabólitos de sulfatos ou da acilamida que são excretados na biliar). A dieta, processos patológicos ou a presença de fármacos contribuem para a alteração do número, tipo e localização destas bactérias. Uma vez que a maioria das bactérias está restrita à porção terminal do intestino grosso, a probabilidade de degradação bacteriana é maior quando os fármacos são administrados por via retal. Os fármacos que são absorvidos rapidamente por via oral podem não ser expostos às bactérias intestino grosso. Por outro lado, a bioinativação, pela flora do intestino, pode reduzir ainda mais a biodisponibilidade de compostos que não são absorvidos eficazmente na porção superior do trato gastrointestinal. O metabolismo do fármaco durante o seu trânsito através da parede do intestino influencia também a sua biodisponibilidade. As enzimas que metabolizam fármacos estão localizadas

no retículo endoplasmático, mitocôndrias (monoaminaoxidase) e citosol (N-acetiltransferase). Algumas enzimas, tais como a fenol- e a estrona-sulfoquinase, existem ao longo do trato gastrointestinal, enquanto que, outras podem estar localizadas na mucosa do jejuno (esteróide-álcool-sulfoquinase). Estes sistemas de enzimas agrupam-se em duas categorias:

(1) aquelas enzimas que catalizam as reações de pré-conjugação, tais como a C-oxidação, hidroxilação, desalquilação, N- e S- oxidação, redução e hidrólise

(2) as que catalisam reações de conjugação ou de síntese.

Uma vez que muitas destas reações também podem ocorrer no fígado, normalmente é difícil quantificar a contribuição relativa de cada sítio para a metabolização total de um fármaco. Pode-se dizer, no entanto, que as reações de pré-conjugação que dependem dos citocromos P₄₅₀ ou P₄₄₈ são quantitativamente pouco significativas na parede do intestino ao passo que as reações de síntese de O-sulfatação estão mais desenvolvidas. Embora o piloro, duodeno e jejuno tenham uma atividade metabólica maior, a metabolização pode ocorrer ao longo do aparelho digestivo desde a mucosa bucal até ao reto (Kaus *et al*, 1999).

O metabolismo é uma fonte importante de variação da biodisponibilidade e da resposta terapêutica. Mudanças fisiológicas no trato gastrointestinal, a presença de outros fármacos, a dieta ou a doença podem alterar a atividade enzimática e, conseqüentemente, a metabolização do fármaco na parede do intestino (Goodman e Gilman, 2001).

Os alimentos são conhecidos por conterem vários compostos que podem induzir a oxidação microsomal do fármaco sobre a parede do intestino (Rang *et al*, 2004).

5.3.2- Fígado

O órgão de metabolização mais importante para o metabolismo pré-sistêmico é o fígado que recebe o seu fornecimento sanguíneo pela artéria hepática e pela veia porta hepática. Aproximadamente 75% do débito sanguíneo hepático passa pela veia porta, a qual

drena todo o trato gastrointestinal exceto os 10 cm da porção final do aparelho digestivo e os 55 cm da porção superior. Assim, os fármacos absorvidos a partir do trato intestinal ou, da porção superior do reto, têm que passar pelo fígado antes de atingir a circulação sistêmica. No entanto, fármacos absorvidos a partir do trato intestinal para o sistema linfático podem não passar pelo fígado (Silva, 1989).

Os tipos de reações metabólicas que ocorrem no fígado são semelhantes às aquelas que ocorrem na parede do intestino. Na parede do intestino, existem oxidases com várias funções e desempenhando um papel importante nas reações pré-oxidativas do fígado, nomeadamente a glucoronidação, a reação mais importante do conjunto de reações de conjugação ou de síntese. Um fármaco, ou os seus metabólitos, podem ser submetidos a uma ou mais reações deste tipo originando produtos que apresentam atividade farmacológica diferente. Assim como resultado do metabolismo de primeira passagem hepática a biodisponibilidade de um fármaco fica reduzida (Craig e Stitzel, 2005).

5.3.3- Pulmões

A absorção do fármaco após a sua administração por várias vias de administração (oral, retal, inalação, intramuscular, oral, transdérmica, subcutânea), ao colocar o fármaco na circulação venosa, faz com que este tenha que passar através dos pulmões antes de atingir a parte arterial do sistema. Os fármacos que foram expostos a atividade metabólica no local de aplicação, durante o processo de absorção ou, após a primeira passagem pelo fígado, vão continuar a ser metabolizados quando chegam aos pulmões. A rede extensa de capilares, que existe nos pulmões, faz o sangue atingir a superfície do endotélio, o qual tem uma área de cerca de 70 a 125 m², onde existe um número elevado de vesículas de pinocitose que contêm enzimas que metabolizam fármacos. Em termos de massa, os pulmões são órgãos pequenos, mas contêm, proporcionalmente, mais tecidos fibrosos do que o fígado, além de que o débito sanguíneo para os pulmões ser aproximadamente três vezes superior ao do fígado. Assim, enquanto que a *clearance* intrínseca dos pulmões é, normalmente, mais reduzida do que a do fígado, a *clearance* total dos pulmões pode tornar-se significativa devido ao débito sanguíneo elevado. Os pulmões

têm sido referidos como locais do metabolismo de vários compostos. As enzimas hidrolíticas são numerosas nos pulmões e desempenham um papel importante no metabolismo de compostos endógenos. No entanto, o seu papel no metabolismo de xenobióticos não é bem entendido. Os sistemas enzimáticos de conjugação mais importantes detectados nos pulmões são a glutathione S-transferase, a UDP-glucuroniltransferase, a sulfotransferase e a N-acetiltransferase, sendo a mais importante a conjugação com a glutathione (Leblanc *et al*, 1997).

5.4- Fatores fisiológicos e patológicos

5.4.1- Idade, gravidez e estados patológicos

A biodisponibilidade pode variar com a idade do indivíduo. O pH gástrico, da criança ao nascer, situa-se entre 6 e 8 e atinge os valores de um adulto aos três anos de idade, mas os tempos de esvaziamento gástrico são comparáveis aos dos adultos desde os oito meses de idade. A imaturidade hepática na criança tem influência no metabolismo de primeira passagem. Nos idosos, conjugam-se fatores relacionados ao aumento do pH gástrico, à diminuição da superfície útil do intestino, da motilidade intestinal, do débito sanguíneo e da capacidade de eliminação (Leblanc *et al*, 1997).

A gravidez é acompanhada de diminuição da motilidade gastrointestinal, aumento do pH gástrico, bem como, de modificação da atividade metabólica, da composição, volume e fluxo sanguíneo (Labaune, 1993).

Todas as doenças, infecções (herpes, candidíases, edemas, úlceras, etc.), que afetam o tubo digestivo, na sua maioria, diminuem a absorção, por provocarem atrofia das vilosidades, desequilíbrio da flora, diarreia, esteatorreia, etc. As inflamações, entretanto podem aumentá-la. As modificações na flora bacteriana podem ter efeito sobre a biotransformação dos fármacos que são absorvidos preferencialmente na parte baixa do intestino. As doenças hepáticas (hepatite, icterícia por obliteração, etc.) causam modificação no efeito de primeira passagem hepática e da secreção dos sais biliares, o mesmo acontecendo, com as secreções pancreáticas, nos casos de lesões deste órgão. As

insuficiências cardíacas geralmente provocam diminuição do débito sanguíneo em todos os órgãos, inclusive do intestino. Caso, o débito sanguíneo seja a etapa limitante da absorção, a insuficiência cardíaca também poderá afetar a biodisponibilidade (Silva, 1989).

5.4.2- Local de absorção

A grande área de superfície disponível para absorção no trato gastrointestinal tem uma grande influência sobre a absorção de fármaco administrados oralmente. A superfície da mucosa gastrointestinal é constituída por uma massa de tecido retorcido coberto por projeções de células epiteliais conhecidas por vilosidades e microvilosidades. Estas estruturas aumentam a área efetiva do trato intestinal em cerca 600 vezes relativamente à sua aparência. A área de superfície diminui na direção distal, sugerindo que a absorção passiva do fármaco torna-se menos eficiente à medida que o mesmo se desloca em direção ao cólon. Os processos de transporte ativo prevalecem no íleo em relação à porção superior do intestino delgado podendo compensar a diminuição na absorção passiva (Goodman e Gilman, 2001). Fordtran e colaboradores sugeriram em 1965 que esta diferença na absorção entre a porção superior e inferior do intestino delgado pode não ser explicada por diferenças na dimensão da área de superfície de contato e fluxo sanguíneo na região. Segundo eles há uma diferença marcante na dimensão dos poros e isto seria a principal causa na diferença de permeabilidade.

A cavidade bucal é bastante irrigada por capilares, cujo retorno venoso não passa pelo fígado, pelo que, muitos dos processos químicos e metabólicos a que os fármacos são submetidos, quando administrados oralmente, são evitados quando da administração pela via bucal (Aulton, 2005).

Outro local de absorção é a ampola retal que tem uma superfície entre 200 e 400 cm². Normalmente os fármacos absorvidos na parte inferior do reto entram diretamente na circulação sistêmica sem que tenham que passar pelo fígado. No entanto, se os fármacos forem absorvidos numa região superior passam primeiro através do fígado. As anastomoses que existem entre as veias retais interferem nesta diferenciação (Silva, 1989).

5.4.3- Tempo de residência, esvaziamento gástrico e presença de alimento

O tempo durante o qual os fármacos permanecem no seu local de absorção pode afetar a sua biodisponibilidade. O efeito é mínimo com uma injeção intramuscular ou subcutânea, mas é mais notório para uma aplicação dérmica uma vez que o fármaco se encontra limitado ao seu local de aplicação. Medicamentos tomados oralmente entram no estômago cujo tempo de esvaziamento regula a passagem destes para o intestino delgado. Uma vez ocorrida a passagem para o intestino delgado o seu deslocamento deve ocorrer sem que se verifiquem impedimentos até atingir o cólon (Labaune, 1993; Amidon e Lobenberg, 2000). O tempo de trânsito entre a boca e o intestino grosso para indivíduos saudáveis varia entre 1,5 e 3,5 horas, isto é, 3 horas após a ingestão o fármaco pode entrar no intestino grosso, local onde a absorção pode ser menos eficiente ou, mesmo impedida pela presença do conteúdo fecal. Dependendo da forma farmacêutica ou da presença de alimentos, o estômago e o intestino delgado podem reter um fármaco até 5 e 20 horas, respectivamente. A natureza físico-química do fármaco, o tipo de formulação e os locais de absorção ao longo do trato gastrointestinal vão determinar o tempo para o esvaziamento gástrico, diminuindo a mobilidade intestinal ou afetando a biodisponibilidade do fármaco. Nos casos de úlcera duodenal a velocidade de esvaziamento gástrico aumenta, nas úlceras gástricas diminui (Kaus *et al*, 1999).

Em relação à administração do fármaco por via retal o seu tempo de permanência na ampola retal é determinado pelo esvaziamento desta, defecação ou a eventual migração do fármaco no sentido ascendente no intestino grosso. O primeiro dos dois fatores levará à redução ou, ao fim da absorção do fármaco, enquanto que, o segundo levará ao aumento da quantidade de fármacos que vai ser submetido ao efeito de primeira passagem ficando sujeito ao metabolismo do fígado (Leblanc *et al*, 1997).

As conseqüências no atraso do esvaziamento gástrico variam em conformidade com a natureza do PA. Para aqueles absorvidos por difusão passiva, o atraso diminui a absorção tanto dos ácidos (que não se dissolvem no estomago) como das bases (que embora dissolvidas, são pouco absorvidas no estomago). Para os fármacos cuja absorção é mediada por transportadores intestinais a aumento desta, dado que com a entrada progressiva no intestino diminui o fenômeno de saturação. Para os PA degradados por enzimas gástricas a

biodisponibilidade é diminuída, pois a degradação é mais acentuada com o tempo de permanência (Charman *et al*, 1997).

Uma refeição rica em lipídeos favorecerá a dissolução das moléculas lipofílicas, com conseqüente aumento da biodisponibilidade destes fármacos. Do mesmo modo, a ingestão de uma refeição aumenta as descargas das secreções biliares e intestinais. Como são surfactantes, a bÍlis e os sais biliares favorecem a dissolução das moléculas muito lipófilas e muito pouco solúveis, quando ingeridas em jejum. Aumentam igualmente a permeabilidade da parede e diminuem a tensão superficial, favorecendo a absorção das vitaminas A e E, etc. (Labaune, 1993).

A viscosidade do bolo é um fator susceptível de causar uma redução da velocidade de dissolução. A essa viscosidade intrínseca, há que juntar a das secreções fisiológicas, como a mucina, muito abundantes no momento das refeições (Aulton, 2005).

A natureza e a quantidade dos líquidos ingeridos têm grande importância para a dissolução. Assim, um pequeno volume de água pode diminuir a disponibilização de fármaco (eritromicina, amoxicilina). O pH da maioria das bebidas não alcoólicas e sucos de frutas é ácido (2,5 para as colas e os tónicos, 2,5 a 4 para os sucos de frutas). Estas bebidas ingeridas concomitantemente com medicamentos podem melhorar dissolução dos PA solúveis em pH ácido, mas pode aumentar a degradação de outros (Leblanc, 1997)

5.4.4- Redistribuição e recirculação

O perfil de concentração plasmática de um fármaco pode ser alterado por redistribuição, um processo que pode ocorrer a seguir à administração do fármaco. Por redistribuição entende-se a passagem do fármaco para qualquer fluido do organismo que não o sangue antes, ou após, a entrada no sistema sanguíneo. Dependendo da via de administração e da eficiência do processo de redistribuição o fármaco pode nunca vir a ter ação sistêmica. No entanto, geralmente o fármaco é reciclado através da absorção ou drenagem para a circulação sistêmica. Um exemplo de redistribuição é a secreção de um

fármaco do sangue para os fluidos das glândulas submaxilares ou parótidas. (Goodman e Gilman, 2001).

No fígado também se pode verificar a passagem do fármaco do sangue para a biliar. A biliar é, então, armazenada na vesícula biliar que se esvazia periodicamente embora irregularmente, para o intestino delgado. O fármaco pode então ser reabsorvido e o processo recomeçar (Silva, 1989).

Finalmente, o sistema linfático é uma via através da qual o fármaco, que foi absorvido no estômago, no intestino ou por via parenteral, pode sofrer redistribuição, reaparecendo mais tarde na circulação sistêmica. Quase todos os tecidos do organismo humano possuem vasos linfáticos que drenam o excesso de fluido diretamente dos espaços intersticiais. O sistema linfático constitui a via mais importante para a absorção de substâncias lipídicas a partir do trato gastrointestinal. Cerca de um décimo do fluido filtrado dos capilares arteriais entram nos capilares linfáticos terminais. Esta redistribuição é particularmente importante para substâncias com peso molecular elevado, pois os capilares linfáticos são muito mais permeáveis do que os capilares venosos. A linfa que é produzida na parte inferior e na parte superior esquerda do corpo reentra na circulação sistêmica na zona de junção das veias jugular interna esquerda e da subclávia. Por outro lado, a linfa que drena a parte superior direita do corpo reentra na circulação na zona correspondente, mas no lado oposto. O fluxo da linfa é lento comparado com o débito sanguíneo. Assim, o efeito inicial da redistribuição do fármaco através dos linfáticos, traduz-se por uma redução das concentrações do fármaco no sangue, conferindo-lhe ação retardada (Silva, 1989; Goodman e Gilman, 2001).

6- Espectrometria de massa

A espectrometria de massa molecular (*mass spectrometry* - MS) é uma técnica analítica na qual, moléculas gasosas são ionizadas, aceleradas por um campo elétrico, ficando todos os íons com a mesma energia cinética, e a seguir, separados em função da razão massa/carga ou m/z . Para íons com a mesma energia cinética, quanto maior o valor

de m/z , menor o percurso dos íons (*International Union of Pure and Applied Chemistry* - IUPAC, 1974).

Em um espectrômetro de massa de impacto de elétrons, as moléculas no estado gasoso, sob baixa pressão, são bombardeadas com um feixe de elétrons de alta energia, normalmente 70 eV (elétron-volt), criando o íon molecular, M^+ e vários fragmentos de íons menores. Logo depois de formados a maioria dos íons moleculares sofre fragmentação dado o excesso de energia cedido pelo feixe de elétrons durante o bombardeio da molécula. A fragmentação pode ocorrer de vários modos, dependendo da natureza do íon molecular. O caminho em que um íon molecular se fragmenta pode dar informações muito úteis sobre a estrutura de moléculas complexas (Maurer, 1998). O conjunto de íons é analisado de forma a obter-se um sinal para cada valor de m/z e a intensidade de cada sinal traduz a abundância relativa do íon que o produz. Chama-se espectro de massas ao gráfico que mostra as intensidades relativas dos sinais, correspondentes aos vários valores de m/z . Em cada espectro o pico maior, chamado pico base, tem intensidade arbitrada com o valor de 100. As alturas dos picos restantes são computadas como percentagens da altura do pico base (USP - *United States Pharmacopoeia* XXVIII, 2004b).

Os espectrômetros de massa modelo API 2000, da *Sciex/Applied Biosystems* - USA, são capazes de reconhecer o pico base e normalizar os picos restantes em relação a esse pico.

Se determinarmos o espectro de massas de um composto desconhecido e verificarmos que ele é idêntico ao espectro de um composto de estrutura conhecida referido na literatura química, podemos concluir, praticamente sem qualquer dúvida, que os dois compostos são idênticos (Williams e Stagg, 1971).

Se um elétron é removido da molécula original, produz-se um íon molecular (M^+), cujo valor de m/z é a massa molecular relativa do composto. Às vezes o pico do M^+ é o pico de base e pode ser facilmente reconhecido; mas frequentemente, porém, não é o pico de base e pode até ser bastante pequeno, dando bastante trabalho para ser localizado. Uma vez identificado, fornece a massa molecular relativa mais rigorosa que se pode obter. A primeira vista pareceria que o pico do M^+ seria o pico de maior valor de m/z . Isso não é

porem assim. Na natureza, a maioria dos elementos ocorre constituída por vários isótopos, geralmente há grande predomínio do de maior massa atômica relativa (Coplen *et al*, 2002).

A massa molecular que se determina usualmente e com que se trabalha é obtida a partir das massas atômicas relativas médias dos diversos elementos e reflete, pois a presença destes isótopos pesados. Entretanto, no caso de massa molecular relativa, determinada a partir do espectro de massas, o pico do M^+ corresponde a moléculas que contêm apenas o isótopo mais comum do elemento (Williams e Stagg, 1971).

Para a grande maioria dos compostos, os detectores de massas são mais sensíveis e, de longe, mais específicos do que os detectores tradicionais. Podem analisar vários compostos e identificar componentes em cromatogramas não separados, reduzindo assim a necessidade da cromatografia perfeita. Os dados espectrais de massas podem complementar dados de outros tipos de detectores. Alguns espectrômetros de massas possuem a característica de executar múltiplos estágios de espectrometria de massas em uma única amostra. Eles podem gerar um espectro de massas, selecionar um íon específico e a partir deste gerar um novo espectro. Alguns têm a capacidade de repetir este ciclo por diversas vezes até que sua estrutura seja determinada, MS/MS ou MS^n (espectrometria de massas sequencial - *tandem mass spectrometry*) (Johnson e Parker, 1992).

6.1- Descrição básica do sistema

Os três principais componentes empregados no processo são: a fonte de íons; o analisador e o detector.

6.1.1- Fonte de ionização

A fonte de íons tem a função de gerar íons, sendo onde irá ocorrer a ionização e fragmentação das moléculas. Existem várias técnicas de ionização sendo as mais comuns a por impacto de elétrons (*electron impact* - EI), a ionização química (*chemical ionization* - CI) e a por *electrospray* (ES) (IUPAC, 1973).

A fonte de ionização EI utiliza um filamento que é responsável pela emissão de elétrons com uma energia de 70 eV, como a energia do feixe de elétrons é bem maior que o primeiro potencial de ionização na maioria dos compostos da amostra, esta é ionizada e depois fragmentada. Este tipo de ionização é acoplado à cromatografia gasosa (CG) (Murray *et al*, 2006).

A fonte CI utiliza agentes líquidos ou gasosos para promover uma reação com as moléculas, normalmente a ionização ocorre através da transferência de um próton à molécula, formando espécies denominadas pseudo íon molecular (Bocxlaer *et al*, 2000). Como esta forma de ionizar é bem mais suave do que o impacto de elétrons, o espectro produzido contém poucos fragmentos e quase somente o pseudo-íon molecular, servindo, portanto, para determinação de peso molecular e/ou análises quantitativas. Este tipo de ionização é acoplado à CG (IUPAC, 1973).

Na ionização ES a amostra normalmente é dissolvida em uma mistura de água e solvente orgânico, comumente metanol, isopropanol ou acetonitrila, mas pode ser infundida diretamente, ou injetada em fluxo contínuo, ou seja, contida no eluente de uma coluna de HPLC (*high performance liquid chromatography*) ou coluna capilar de CE (*capillary electrophoresis*). A fonte de ES é simples, com a formação de um spray que acontece em um campo de alta voltagem (Ball e Derrick, 1993). Em uma das propostas de mecanismo, acredita-se que a formação do íon é o resultado de um processo de evaporação iônica, em que um spray de gotículas é gerado pela dispersão eletrostática do líquido lançado pela ponta do capilar. Este é favorecido por um gás aquecido (normalmente nitrogênio), as gotículas sofrem desagregação, perdendo moléculas de solvente no processo e eventualmente produzindo íons individuais. Em outra proposta para o mecanismo, a dessolvatação das gotículas conduz a uma densidade de carga crescente na superfície da gota que causará uma explosão coulombica que conduz eventualmente a íons individuais. Seja qual for o mecanismo proposto, os íons são formados à pressão atmosférica e entram em um orifício localizado no vértice de um cone que age como uma primeira barreira para a fase de vácuo. Um coletor (*skimmer*) recolhe os íons e os guia ao espectrômetro de massas. A formação do *spray* é a parte mais importante da técnica de ES. É normalmente aconselhável filtrar todos os solventes e concentrações altas de eletrólito devem ser evitadas

porque estes podem conduzir a supressões na ionização e condições operacionais instáveis. Altos fluxos, compatíveis àqueles utilizados em HPLC, hoje podem ser utilizados através de um gás de nebulização aquecido para ajudar na formação do *spray*. A fonte ES é utilizada acoplada a todos os analisadores de massas comuns sendo facilmente adaptável para introdução direta da amostra de colunas de HPLC e acontece á pressão e temperatura atmosférica. Este tipo de ionização teve um grande impacto na utilização da espectrometria de massas em pesquisas biológicas durante os últimos anos. Foi o primeiro método a estender a faixa de massa útil de instrumentos para mais de 50 000 Daltons (Crotti *et al*, 2006; Baldwin, 1995).

6.1.2- Analisadores de massas

Após a entrada das moléculas na fonte de íons e posterior ionização, se faz necessária a determinação das respectivas massas dos íons formados a fim de obter o espectro de massas. A função do analisador de massas é promover a separação dos íons a partir de suas relações massas/carga e transmiti-los ao detector. Dentre os analisadores de massas os mais amplamente utilizados são o de setor magnético, o quadrupolo, o *ion trap* e o através de tempo de voo (TOF- *time of flight*) (USP XXVIII, 2004b).

Um espectrômetro com setor magnético separa os íons assim que estes passam por um campo magnético perpendicular a direção do caminho (IUPAC, 1973).

Os analisadores de massas quadrupolares, normalmente os mais robusto, de melhor preço de aquisição e mais compactos, são considerados de varredura, ou seja, a partir da entrada de uma mistura de íons com diferentes relações massa/carga (m/z) e diferentes abundâncias, são aplicados campos elétricos fazendo com que em um determinado momento, somente íons de uma massa específica consigam sair ilesos. Variando-se os valores do campo elétrico aplicado se consegue fazer com que íons distintos sejam selecionados e registrados (Mcluckey e Stephenson, 1998; Murray *et al*, 2006).

Já os analisadores tipo *ion trap* (coleta de íons) não podem ser considerados como instrumentos de varredura puros, pois nestes, os íons são armazenados antes de sua varredura propriamente dita. Ele usa um campo elétrico de radiofrequência para coletar

todos os íons em trajetórias estáveis dentro da cavidade metálica e com a aplicação de outro campo oscilante entre as pontas das cavidades expulsa os íons de uma determinada m/z pelos buracos nas pontas da cavidade (Murray *et al*, 2006).

Um espectrômetro por campo de vôle mede a distância que cada tipo de íon percorre até o detector (Williams e Stagg, 1971).

6.1.3- Detectores

Depois de feita a seleção de íons pelo analisador, estes são direcionados ao detector onde serão transformados em um sinal mensurável (Baldwin, 1995).

6.2- Espectrometria de massas seqüencial (*tandem mass spectrometry*- MS/MS)

A técnica de MS/MS ou MS^n , onde $n = 2, 3, \dots$, é muito sensível para a identificação de misturas de compostos orgânicos. Usa dois ou mais estágios de análise de massa, um para pré-selecionar um íon principal, que freqüentemente é o íon molecular do analito de interesse e o outros para analisar a fragmentação induzida, por exemplo, por colisão (*CID-collision induced dissociation*) com um gás inerte, como argônio ou hélio. Então, os fragmentos dos íons resultantes são separados e suas massas analisada no próximo espectrômetro de massa. A técnica de espectrometria de massa adotando este procedimento conduz a uma quantificação mais específica, precisa e exata por monitorar um fragmento iônico específico de um íon precursor do analito de interesse. Permite também análise qualitativa a partir da interpretação da rota de fragmentação do íon precursor (IUPAC, 1973; Murray *et al*, 2006).

A instrumentação consiste basicamente de três equipamentos, em operação seqüencial no espaço ou no tempo. Seqüencial no espaço consiste em vários analisadores de massa em série. Muitas combinações são possíveis, as mais comuns dentre essas são: o triplo quadrupolo (Q_1qQ_2), os de quatro setores e os instrumentos híbridos. Nesta simbologia, Q representa um quadrupolo filtro de massas e q um quadrupolo que serve

como câmara de colisão. No caso do triplo quadrupolo, um íon de interesse gerado na fonte de ionização é selecionado com o primeiro quadrupolo Q1, dissociado na câmara de colisão q com energias de até 300 eV e os produtos de fragmentação analisados com o segundo quadrupolo Q2 (Biemann, 1993).

A seqüência no tempo pode ser conseguida através de espectrômetros de massa tipo íon trap e do tipo ICR – *ion cyclotron resonance* (também chamados de FTMS- *fourier transform mass spectrometry*) (Marshall *et al*, 1998). Estes instrumentos não estão de fato limitados a experimentos MS/MS, mas podem atingir múltiplos estágios (MS/MS/MS/MS, ou MSⁿ). Nestes instrumentos, os íons são selecionados através da aplicação de pulsos de tensões específicas e as dissociações ocorrem normalmente por colisões com outros gases (Biemann, 1993).

4- PARTE EXPERIMENTAL - MATERIAIS E MÉTODOS

7- Materiais

7.1- Fase clínica

Os materiais, equipamentos e instrumentos empregados, na fase clínica deste estudo de bioequivalência, foram relacionados no quadro 1. No quadro 2 apresentamos as formulações teste e referência, bem como a apresentação farmacêutica e especificações.

Quadro 1- Materiais, equipamentos e instrumentos

Álcool 70%;
Algodão;
Seringa descartável 10 mL;
Estante para os tubos identificados e posicionados em função do tempo de coleta;
Caixa para descarte de material perfuro-cortante;
Garrote;
Gelco 20 ou 22 com adaptador;
Cuba redonda;
Esparadrapo;
Solução de heparina;
Tubos de vidro com tampa apropriado para acondicionamento das amostras;
Caixas térmicas e gelo seco;
Termômetro digital de máxima e de mínima;
Freezer e geladeira;
Centrifuga;

Quadro 2- Produtos teste e referência

FORMULAÇÃO	TESTE	REFERÊNCIA
NOME	Clorpropamida	Diabinese®
FORMA FARMACÊUTICA	Sólido oral - comprimido	Sólido oral - comprimido
PRINCÍPIO ATIVO (PA)	Clorpropamida	Clorpropamida
CONCENTRAÇÃO DE PA	250 mg	250 mg
Nº DE LOTE	1372845	40417006
DATA DE FABRICAÇÃO	Fevereiro, 2004	Março, 2004
DATA DE VALIDADE	Janeiro, 2006	Março, 2007
FABRICANTE	Laboratório Ranbaxy, Índia	Pfizer do Brasil

7.2- Fase analítica

Na Tabela 1 apresentamos as especificações dos padrões de referência (substância química de referência - SQR), empregados neste estudo.

Tabela 1- Padrões de referência

NOME QUÍMICO	USADO COMO	FABRICANTE	FORNECEDOR	LOTE	DATA DE ANÁLISE	DATA DE VALIDADE
Clorpropamida	Analito	Sigma, USA	Ranbaxy, Brasil	031H0722	agosto/2003	ND
Glibenclamida	Padrão interno	USV Limited, India	Barrera, Brasil	CH0033	23-set-2003	31-ago-05

ND: Não determinado. Informação não disponível.

Na Tabela 2 relacionamos o material e o instrumental usados neste estudo e na tabela 3 os reagentes e solventes.

Tabela 2- Materiais e instrumentos

MATERIAIS E INSTRUMENTOS	FABRICANTE, PAÍS
Micropipetas ajustáveis (P200, P1000 and P10000)	Gilson, França
Ponteira plástica azul descartável para pipetas (faixa de 5-200 µL) e amarela (faixa de 200 - 1000 µL)	Gilson, França
Tubos de ensaio descartáveis 120 x 12 mm e 75 x 12 mm	Laborglass, Brasil
Multipipetador	Eppendorf, USA
Tubos de polipropileno descartáveis com tampa tipo rosca com 15 e 50 mL de capacidade	Costar, Brasil
Tubos de vidro (<i>vials</i>) descartáveis com tampas para acondicionar amostras no Auto-injetor	OCP Diagnostics, Brasil
Aagitador (<i>Vortex mixer</i>)	Fischer, USA
Balança Analítica	Ohaus, Alemanha

Tabela 3- Reagentes e solventes

REAGENTE	DESCRIÇÃO	FABRICANTE, ORIGEM
Acetonitrila	Grau HPLC	J. T. Baker, USA
Metanol	Grau HPLC	J. T. Baker, USA
Dietil éter	PA (grau para análise)	Mallinckrodt, USA
Água deionizada	Ultra pura	Millipore, Brasil
Hexano (95% n-hexano)	PA (grau para análise)	Mallinckrodt, USA
Diclorometano	PA (grau para análise)	Mallinckrodt, USA
Ácido acético glacial	PA (grau para análise)	J. T. Baker, USA
Ácido clorídrico fumegante	PA (grau para análise)	Mallinckrodt, USA

Os equipamentos e os *softwares* utilizados no decorrer deste estudo estão listados na tabela 4.

Tabela 4- Equipamentos e *software*

SISTEMA ANALÍTICO		LC-MS/MS	
COMPONENTES	FABRICANTE, ORIGEM	MODELO	NÚMERO DE SÉRIE
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA	Shimadzu, Japão	LC-10ADVP	C20963911092 LP
AUTO-INJETOR	Agilent, USA	G1329-A	DE11106653
ESPECTROMETRO DE MASSA (MS-MS-TANDEM MASS)	Sciex/Applied Biosystems, USA	API 2000	B3740101
FONTE	Sciex/Applied Biosystems, USA	<i>Turboionspray</i>	-
SOFTWARE (PROCESSAMENTO DOS DADOS)	Sciex/Applied Biosystems, USA	<i>Analyst v 1.3.2</i> correndo em Pentium III (Optiplex Dell GX300)	-

Os certificados de análise do analito, clorpropamida, e do PI, glibenclamida, estão reproduzidos nos anexos VI e VII, respectivamente. A estrutura química dos mesmos foi apresentada no anexo VIII.

7.3- Fase estatística

A análise farmacocinética e tratamento estatístico dos dados com a determinação de bioequivalência foram realizados com o apoio dos seguintes softwares:

- Microsoft Excel Versão 7.0;
- WinNonLin *Professional Network Edition*. Versão 1.5;
- Graph Pad Prism Versão 3.02.

8- Métodos

8.1- Fase clínica

A etapa clínica deste estudo foi conduzida de acordo com as Boas Práticas Clínicas (BPC) e demais recomendações estabelecidas pela ICH, bem como de conformidade com as Resoluções 196/96, 251/97 do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde e RDC 103/03 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e Resoluções complementares (ICH, 1995b; ICH, 1996; Brasil, 1996; Brasil, 1997; Brasil, 2003e) .

8.1.1- Desenho do estudo

O estudo foi aberto, aleatorizado, cruzado, com 2 tratamentos, 2 períodos (2 seqüências), nos quais os voluntários receberam, em cada período, a formulação teste ou a formulação referência. O intervalo entre os períodos de tratamento foi de 21 dias (Brasil, 2003b; USP XXVIII, 2004c).

Os voluntários foram designados, por uma lista de aleatorização (quadro 17), a uma das seguintes seqüências de tratamento (Brasil, 2003a):

- Seqüência 1: Referência (período I) – Teste (período II)
- Seqüência 2: Teste (período I) – Referência (período II)

8.1.2- Recrutamento e seleção dos voluntários

Os voluntários participaram inicialmente de um processo de recrutamento, para o qual assinaram o termo de recrutamento (anexo I), após receberem os primeiros esclarecimentos sobre os procedimentos e as condições nas quais são desenvolvidas pesquisas clínicas. Nesta etapa foi feita uma entrevista que incluiu registro de eletrocardiograma (ECG), de pressão sanguínea sistólica e diastólica, de frequência cardíaca e medida de temperatura corpórea. Em seguida os voluntários receberam um formulário de encaminhamento ao laboratório para realização dos exames conforme anexo II. Para fins de avaliação das condições de saúde, durante o processo de recrutamento e seleção dos voluntários realizaram os exames apresentados no quadro 3.

Quadro 3- Exames laboratoriais do processo de recrutamento e seleção dos voluntários

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

Com relação ao eletrocardiograma, o médico responsável por interpretá-los informou caso os achados específicos fossem julgados como normais, anormais não clinicamente significativos (“n.s.”) ou anormais informando, inclusive, se o voluntário foi considerado apto ou não para participar do estudo.

Foi feito registro no formulário de relato de caso (*case report form* - CRF) dos voluntários sempre que um resultado de exame foi considerado como “não clinicamente significativo” (“n.s.”).

Após o recebimento dos resultados destes, foi realizada consulta médica, para a obtenção do histórico médico e exame físico de cada voluntário, ocasião em que o médico informou ao voluntário sobre a sua aptidão física para poder participar de um estudo ou, em caso contrário, deu outras orientações pertinentes. Por ocasião da obtenção do histórico clínico os voluntários foram também informados sobre as restrições de uso de medicamentos e outras apresentadas no item 8.1.7 Os voluntários também foram concomitantemente observados quanto às condições emocionais para participação em estudos clínicos.

Posteriormente voluntários considerados aptos, no processo de recrutamento, foram convidados a participarem do processo de seleção. Para tanto compareceram ao laboratório de análises e pesquisas clínicas designado para a realização dos exames da fase de internação, conforme Anexo II.

No dia anterior, ou no próprio dia da internação, já de posse dos resultados destes exames, foi realizada nova avaliação clínica na unidade ambulatorial, o qual foi explicitamente documentado no formulário de relato do caso (FRC). No quadro 4 apresentamos a descrição sucinta desta avaliação.

Quadro 4- História clínica e exames físicos referenciados no FRC

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

Nesta avaliação, as restrições de uso de medicação e os critérios de exclusão foram cuidadosamente verificados novamente através de questionamento ao voluntário.

A pressão arterial foi considerada como normal dentro dos seguintes limites: 90-140 mmHg para a sistólica e 50-90 mmHg para a diastólica. O pulso dentro de 50-90 b.p.m foi considerado normal.

O índice de massa corpórea (IMC) foi considerado normal quando maior ou igual a 19 e menor ou igual a 27. Os limites do IMC são definidos no *Report of the Dietary Guidelines Advisory Committee on the Dietary Guidelines for Americans, 2000, U.S. Department of Agriculture U.S. (USDA) - Department of Health and Human Services, Fifth Edition, 2000*, tendo sido aceita uma tolerância de 8% quanto ao limite superior (USDA, 2000).

Foi comprovado que voluntários do sexo feminino não estavam grávidas, com o exame β -HCG durante a triagem e também obrigatoriamente antes de cada internação.

Após terem sido prestadas informações adicionais relativas ao estudo e esclarecidas todas as dúvidas restantes, nos casos de concordância, os voluntários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para participação no estudo, anexo III (Brasil, 2003a). Sendo este momento anterior a internação do voluntário.

8.1.3- Critérios de inclusão do voluntário

Os seguintes critérios foram satisfeitos para que o voluntário participasse do estudo:

- Ambos os sexos com idade entre 18 a 55 anos. As mulheres não poderiam estar grávidas e nem em regime de amamentação;
- IMC maior ou igual a 19 e menor ou igual a 27;
- Boas condições de saúde ou sem doenças significativas, a juízo médico, de acordo com as regras definidas no protocolo do estudo, e avaliações a que foi submetido: história clínica, medidas de pressão e pulso, exame físico e psicológico, ECG, e exames laboratoriais complementares;
- Ser capaz de compreender a natureza e objetivo do estudo, inclusive os riscos e efeitos adversos e com intenção de cooperar com o pesquisador e agir de acordo com os requerimentos de todo o ensaio, o que foi confirmado mediante a assinatura do TCLE (anexo III).

8.1.4- Critérios de Exclusão do Voluntário

A resposta positiva a qualquer um dos seguintes critérios foi considerada para a exclusão do voluntário do estudo:

▪ **Problemas relacionados com o fármaco:**

- Hipersensibilidade à droga estudada (clorpropamida) ou a compostos quimicamente relacionados; histórico de reações adversas sérias ou hipersensibilidade a qualquer fármaco;
- História ou presença de doenças hepáticas ou gastrintestinais ou outra condição possa interferir com a absorção, distribuição, excreção ou metabolismo do fármaco;
- Uso de terapia de manutenção com qualquer medicamento, excetuando-se anticoncepcionais por via oral;

▪ **Doenças ou problemas de saúde:**

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

▪ **Hábitos e dependências:**

- Fumante;
- Ingestão de mais do que 5 xícaras de café ou chá por dia; ter hábitos alimentares peculiares, por exemplo, ser vegetariano;
- Histórico de abuso de álcool, drogas ou consumo expressivo de álcool;

▪ **Condições encontradas nos dias/meses que antecedem o estudo:**

- Uso de medicação regular dentro das 2 semanas que antecederam o início do tratamento e a data de avaliação, ou fez uso de qualquer medicação dentro de uma semana, excetuando-se anticoncepcionais por via oral e os casos em que, com base na meia-vida do fármaco e/ou metabólitos ativos, possa ser assumida a sua completa eliminação;
- Internamento por qualquer motivo até 8 semanas antes do início do primeiro período de tratamento deste estudo;
- Tratamento dentro dos 3 meses prévios ao estudo com qualquer fármaco com conhecido potencial tóxico bem definido para os grandes órgãos;
- Participação anterior em qualquer estudo experimental ou ingestão de qualquer droga experimental dentro dos três meses que antecedem o início deste estudo;
- Doação, perda de 450 mL ou mais de sangue dentro dos três meses que antecederam ao estudo ou ainda doação de mais de 1500 mL dentro dos 12 meses precedendo o estudo;

▪ **Outras condições:**

- O voluntário tem qualquer condição que o impede de participar do estudo pelo julgamento do investigador médico;
- Teste positivo de gravidez.

8.1.5- Critérios de retirada do voluntário

O voluntário pode solicitar que seja retirado do estudo, a qualquer momento, por não desejar continuar no estudo por:

- Razões pessoais (ou mesmo sem razão);
- Eventos adversos (EA) da droga em estudo (efeitos não desejáveis possivelmente relacionados à droga em estudo);
- Razões outras que não efeitos adversos, por exemplo, indisponibilidade, intolerância aos procedimentos do estudo;

O Pesquisador pode retirar o voluntário do estudo, por uma das seguintes razões:

- Não aderência às exigências do protocolo;
- EA, sintomas ou sinais de possível toxicidade;
- Doença intercorrente requerendo medicação;
- Resposta positiva à reavaliação de qualquer um dos critérios de exclusão, no momento da admissão ao primeiro período de tratamento ou em ocasião subsequente;
- Qualquer outra condição que, a juízo do Pesquisador, seja do interesse para manutenção da saúde do voluntário;
- Por terem vomitado após a ingestão do medicamento até o dobro do tempo do $T_{\max}$ do PA.

No caso do nosso estudo, voluntários com histórico de vômito dentro de 8 horas após a administração foram excluídos (FDA, 2003).

8.1.6- Considerações gerais

A seleção de voluntários, para este estudo, realizada pela unidade ambulatorial selecionou 36 voluntários sadios (de ambos os sexos) diretamente da população do Estado de São Paulo. Estes foram aceitos no estudo somente no caso de terem sido considerados saudáveis, a juízo médico, com base na história médica, exames físicos e laboratoriais que antecederam a admissão no estudo e então internados por 2 períodos de aproximadamente 52 horas cada, com 21 dias de intervalo entre as internações. Sendo que a eles foi solicitado que se apresentasse para internação, aproximadamente às 16 horas na tarde anterior de cada período de tratamento.

Na noite em que os voluntários foram internados receberam um jantar leve padronizado. A fim de manter a padronização dos grupos de tratamento, a dieta (alimentos e líquidos) oferecida obedeceu ao mesmo padrão para todos os voluntários e todos os alimentos e bebidas servidas foram ingeridas por completo. Os voluntários permaneceram em jejum desde 8,5 horas antes até 2 horas após a ingestão da medicação, prevista para a manhã seguinte. As demais refeições foram servidas conforme descrito no quadro 5. A ingestão de água e líquidos (exceto os que continham cafeína, xantinas ou bebidas alcoólicas) foi permitida *ad libitum* até 2 horas antes e após 2 horas da administração do medicamento.

Quadro 5- Refeições

HORAS (*)	REFEIÇÃO
- 12 horas	Jantar
- 8,5 horas	Ceia
+ 2 horas	Desjejum
+ 5 horas	Almoço
+ 8 horas	Lanche
+ 12 horas	Jantar
+ 15 horas	Ceia
+ 24 horas	Desjejum
+ 29 horas	Almoço
+ 32 horas	Lanche
+ 36 horas	Jantar
(*) Tempo contado a partir do momento da administração do medicamento	

No dia seguinte à internação os voluntários receberam, conforme definido pela aleatorização (quadro 17), 250 mg de clorpropamida em dose única a partir das 7:00 horas da manhã, acompanhado de 240 mL de água mineral sem gás. Após a ingestão de toda a água foi feita checagem para confirmar deglutição do medicamento em sua totalidade.

O intervalo de tempo, entre a administração do medicamento a cada um dos voluntários, foi de aproximadamente 1 minuto de leito para leito e 2 minutos de quarto para quarto com pequenas variações, dependendo da localização do leito.

Os exames laboratoriais pós-estudo (incluindo registro de ECG) foram repetidos dentro de 21 dias após a última coleta de sangue do estudo, em horário previamente combinado, conforme Anexo II.

Após o recebimento destes resultados, em data já agendada por ocasião da coleta para os exames, os voluntários compareceram à unidade ambulatorial para o exame clínico de alta.

Os voluntários tiveram assistência e cuidados especializados durante todos os períodos de tratamento, o que incluiu uma averiguação sumária de suas condições quando de seu confinamento e no momento da alta, de forma a possibilitar avaliar sua aderência aos quesitos do estudo. Para casos de emergência a unidade clínica, onde foram internados os voluntários, dispunha de sala própria equipada com carrinho de emergência e medicação de urgência para qualquer eventualidade, além de unidade de terapia intensiva (UTI) exclusiva para o atendimento de pacientes participantes dos estudos de bioequivalência.

8.1.7- Medicações/Tratamentos e condutas permitidas e não permitidas antes e durante o estudo

Além das condições descritas nos itens referentes aos critérios de exclusão do voluntário os mesmos foram informados de que durante a fase de tratamento (internações ou intervalo entre elas) também não era permitida qualquer medicação concomitante, inclusive aquelas vendidas sem prescrição médica.

Todavia, nos caso de EA, foram administradas as medicações consideradas absolutamente necessárias para o bem estar dos voluntários. Neste caso, o uso da medicação foi registrado apropriadamente nos FRCs individuais.

Não foi permitido, desde 12 horas antes até a última coleta de sangue de cada internação (período), o consumo dos seguintes produtos: cafeína; bebidas que contenham xantina (chá, café, cola); bebidas alcoólicas. Além da proibição nos períodos mencionados, o consumo de bebidas alcoólicas foi limitado durante toda a etapa clínica.

Durante as internações não foi permitida a ingestão de qualquer outro alimento (incluindo doces, pastilhas, balas, chicletes, pastilhas para garganta, salgadinhos ou biscoitos de qualquer tipo), além dos programados, bem como foi ratificada a proibição quanto ao fumo ou uso de drogas e os critérios de exclusão/desligamento do estudo.

Nos dias de confinamento, da noite anterior a administração até 4 horas após a mesma o voluntário reduziu as suas atividades físicas ao mínimo e não foi permitida a doação de sangue durante o estudo.

A adesão às restrições quanto ao uso de medicamentos, limitações dietéticas e demais restrições definidas no protocolo foram investigadas inicialmente através de questionamento ou observação direta no momento da internação, ou antes, da administração do medicamento e por observação direta durante o período de internação.

8.1.8- Coleta de amostras

Conforme o protocolo de coleta, apresentado no quadro 6, em cada período foram coletadas 21 amostras de 5 mL em tubos contendo 50 µL de heparina (5000 UI/mL). Apenas na primeira internação foi feita uma coleta de sangue de 25 mL para controle individual, curvas padrões, etc.

Quadro 6- Protocolo de coleta das amostras

AMOSTRA	HORÁRIO
Amostra pré administração	Imediatamente antes (dentro de 1 hora) da administração da medicação
Amostras após administração	0,5; 1; 1,5; 2; 2,33; 2,67; 3; 3,33; 3,67; 4; 4,5; 5; 6; 8; 12; 16; 24;
	36; 48; 72 horas após a administração da medicação,

Um total de aproximadamente 267 mL de sangue foi coletado durante os 2 períodos do estudo, incluindo o volume coletado para os exames pré e pós-estudo.

8.1.9- Processamento e armazenamento inicial das amostras

As amostras de sangue (no período máximo de 20 minutos após a coleta) foram centrifugadas a 3000 rotações por minuto (RPM) por 10 minutos a baixa temperatura (4°C). Imediatamente após a centrifugação, o plasma foi retirado e armazenado em frasco adequado, igualmente identificado, à temperatura de (-20°C) em freezer específico para armazenagem de amostras biológicas, localizado na própria unidade, até transporte à unidade analítica.

8.1.10- Avaliação de segurança

Para fins de acompanhamento de segurança, os voluntários foram observados durante o estudo visando à detecção de EA. Consideramos EA a qualquer ocorrência médica não desejada em um sujeito de pesquisa, que estivesse participando do estudo, ao qual já tenha sido administrada alguma das formulações sob investigação. Esta ocorrência não necessita ter uma relação causal com a medicação administrada, podendo, portanto ser um sinal (incluindo achados anormais de exames ou sinais vitais) ou sintoma desfavorável e não intencional, ou uma doença temporalmente associada à medicação, relacionada ou não a esta.

Além da comunicação de eventos pelos voluntários ou pela simples observação, foram consideradas e avaliadas as seguintes variáveis, visando à detecção de eventos adversos:

- Sinais vitais dos voluntários (frequência cardíaca, pressão arterial e temperatura) obtidos durante as internações;
- Resultados dos exames laboratoriais (hematologia, bioquímica e análise de urina) e eletrocardiograma, obtidos ao final do estudo e avaliados de forma comparativa àqueles obtidos na fase de seleção dos voluntários.
- Achados de exame físico, obtidos ao final do estudo e avaliados de forma comparativa àqueles obtidos na fase de seleção dos voluntários.

Os voluntários foram monitorados clinicamente durante toda a condução do estudo quanto à possibilidade de estarem desenvolvendo hipoglicemia. Os voluntários que por ventura apresentassem hipoglicemia durante a condução do estudo receberiam 40 mL de glicose 50%.

Os voluntários foram instruídos sobre os EA em potencial, bem como sobre a necessidade de comunicá-los imediatamente ao pesquisador ou sua equipe, mesmo os ocorridos após o período sob supervisão médica direta, deveriam ser imediatamente comunicados à equipe por telefone.

Por ocasião da alta da última internação, todos os voluntários foram novamente avisados de que não deveriam doar sangue e participar de qualquer estudo clínico com medicamentos que envolva a coleta de amostra por pelo menos 3 meses.

Todos os voluntários, inclusive as possíveis exclusões após a administração de pelo menos uma dose de um dos medicamentos, foram reavaliados clinicamente (incluindo sinais vitais, exame físico e ECG) e por exames laboratoriais iguais aos realizados na fase pré-estudo (inclusive testes sorológicos e exame de fezes).

8.1.11- Considerações éticas

O projeto de pesquisa, com o protocolo experimental e o TCLE, foi submetido ao CEP da Unicamp, credenciado pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP do Conselho Nacional de Saúde/MS (CNS-MS).

O ensaio não foi iniciado antes que o protocolo de estudo tivesse sido aprovado pelo CEP.

O Estudo foi conduzido de acordo com a Declaração de Helsinque (1964) e as revisões de Tóquio (1975), Veneza (1983), Hong Kong (1989), Somerset Oeste (1996) e Edinburgh (2000), assim como as regulamentações Nacionais (Resoluções 196/96 do CNS-MS, 251/97 do CNS-MS, bem como RDC 103 de 08 de maio de 2003 da Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária e Resoluções complementares (WHO, 2004; Brasil, 1996; Brasil, 1997; Brasil, 2003e).

8.1.11.1- Termo de consentimento livre e esclarecido

Os voluntários receberam uma explanação da natureza e dos objetivos do estudo. Foi enfatizado que o estudo tem a finalidade de pesquisa e que o voluntário não poderá esperar que haja qualquer efeito terapêutico. Ao voluntário ficou claro que ele/ela estava livre para se retirar a qualquer momento do estudo sem ser obrigado a fornecer o motivo de fazê-lo e sem que isto cause qualquer prejuízo no seu atendimento junto ao centro de bioequivalência.

A participação dos voluntários nas atividades de recrutamento e seleção foi acompanhada de autorização prévia conforme o termo de recrutamento no anexo I. Uma vez aprovada a participação do voluntário no estudo, foi solicitado a cada um que, caso concordasse, assinasse o TCLE (anexo III) para participar no estudo, antes da admissão no primeiro período de tratamento.

8.1.11.2- Confidencialidade

Toda a informação obtida durante o estudo referente ao estado de saúde do voluntário ficou disponível ao médico da unidade clínica, cuja obrigatoriedade de manutenção do sigilo foi inerente a sua função.

Uma cópia dos exames laboratoriais realizados no pré e pós-estudo foram fornecidos aos voluntários.

8.2- Fase analítica

Todos os tubos de ensaio e *vials* usados no estudo (extração, auto injetor, etc.), bem como tubos de polipropileno e ponteiros plásticos para as micropipetas foram descartados após o uso, conforme as normas e legislação específica para descarte de material biológico, produtos químicos e solventes orgânicos. Todos os equipamentos, instrumentos, etc. estavam qualificados e/ou validados, com a rotina de calibração dentro dos prazos de validade (Danzer e Currie, 1998; Danzer *et al*, 2004; ISO: 17025, 1999).

Todos os procedimentos foram realizados conforme as Boas Práticas de Laboratório (BPL), como registros em *logbook* apropriado e conforme procedimentos operacionais escritos e aprovados previamente. O uso de equipamento de proteção individual e coletiva adequado foi rotina em todos os procedimentos.

O protocolo de validação do método foi preparado em conformidade com a legislação da Anvisa, as diretrizes da IUPAC, ICH e FDA (Brasil, 2002; Brasil, 2003c; Thompson, 2002; Danzer e Currie, 1998; Danzer *et al*, 2004; FDA, 2001b; ICH, 1995a; ICH, 1997).

8.2.1- Processamento e estocagem das amostras de plasma dos voluntários

Assim que as amostras foram recebidas na unidade analíticas, elas foram todas inspecionadas quanto a sua integridade e as etiquetas da amostra física comparadas com o respectivo registro na documentação de remessa. Depois de conferidas, conforme procedimento apropriado, foram armazenadas, com registro de sua localização no congelador apropriado, à -20°C até descongelamento para análise. Uma cadeia de custódia para todas as amostras foi aberta para controle interno (Eurachem-CITAC, 2002).

Após da conclusão da fase analítica do estudo, o conteúdo restante das amostras foi transferido para um refrigerador (a -20°C) destinado a armazenamento de amostras por longo prazo, até que a destruição fosse autorizada (Luque-Garcia e Neubert, 2007).

8.2.2- Preparo das soluções

Todas as soluções foram preparadas em tubos de polipropileno com capacidade para 15 ou 50 ml, com tampa tipo rosca, adequadamente rotulados com identificação de data de preparo, visto do analista, analito, concentração e matriz/solvente. Foram estocadas a 4-8°C. A estabilidade das soluções foi determinada por testes específicos descritos posteriormente no item de testes de estabilidade.

A Solução *master* é também designada como solução mãe e dá origem às soluções de trabalho por diluição. Estas permaneceram refrigeradas pelo período do estudo compreendido entre seu preparo e realização dos testes finais de estabilidade e tiveram o padrão (SQR) pesado e diluído separadamente. Foram empregadas soluções mãe distintas para as curvas de calibração, para os controles de qualidade nas concentrações baixa, media e alta (QCA, QCB, QCC), para o limite de quantificação (LOQ) e para as corridas analíticas (listas com amostras de voluntários).

As soluções de trabalho (*work solution*) permaneceram na bancada de preparação pelo tempo necessário para a preparação das amostras (tabela 5).

Tabela 5- Preparo das soluções

SOLUÇÃO	SOLUTO	SOLVENTE	CONCENTRAÇÃO µg/mL
Mãe	Clorpropamida	Metanol/Água (70/30;V/V)	1000
	Glibenclamida		1000
Trabalho	Clorpropamida	Metanol/Água (70/30;V/V)	500,0; 400,0; 350,0; 150,0; 50,0; 30,0; 15,0;
	Glibenclamida		5,0; 2,0; 1,0
TSS	Clorpropamida	Metanol/Água (70/30;V/V)	0,3
	Glibenclamida		0,125
Fase móvel	Acetonitrila	Água	70/30; v/v
	Ac. acético		10µM
Extração		Dietil éter/diclorohexano/hexano	40/30/30; v/v
HCl	Ac. Clorídrico fumegante	Água	0,12M

8.2.3- Preparo dos padrões de calibração, controles de qualidade (*Quality Control* - QC) e limite inferior de quantificação (LOQ)

As concentrações dos padrões foram definidas na fase de desenvolvimento e validação do método analítico e cobriram a faixa de quantificação esperada para o mesmo (*range* analítico). As suas concentrações correspondem aos pontos da curva de calibração e foram utilizadas na construção da mesma (tabela 6).

O QCA foi preparado em concentração correspondente a três vezes a do LOQ. O QCB foi preparado em concentração aproximadamente mediana em relação aos QCA e QCC. O QCC foi preparado em concentração correspondente a 80% da maior concentração da curva de calibração. O LOQ é a menor concentração quantificável pelo método com precisão e exatidão aceitáveis. É definido no desenvolvimento e validação e corresponde a menor concentração da curva de calibração (Tabela 7).

Tabela 6- Preparo dos padrões de calibração

ANALITO	PADRÃO DE CALIBRAÇÃO			SOLUÇÃO DE TRABALHO		FATOR DE DILUIÇÃO
	CONC. (µg/mL)	VOL. PLASMA ADIC. (mL)	VOL. FINAL (mL)	CONC. (µg/mL)	VOL. ADIC. (mL)	
Clorpropamida	50,0	0,90	1,00	500,0	0,10	10,00
Clorpropamida	35,0	0,90	1,00	350,0	0,10	10,00
Clorpropamida	15,0	0,90	1,00	150,0	0,10	10,00
Clorpropamida	5,0	0,90	1,00	50,0	0,10	10,00
Clorpropamida	1,5	0,90	1,00	15,0	0,10	10,00
Clorpropamida	0,5	0,90	1,00	5,0	0,10	10,00
Clorpropamida	0,2	0,90	1,00	2,0	0,10	10,00
Clorpropamida	0,1	0,90	1,00	1,0	0,10	10,00

Tabela 7- Preparo dos QC e LOQ

ANALITO	IDENTIFICAÇÃO	QC E LOQ			SOLUÇÃO DE TRABALHO		FATOR DE DILUIÇÃO
		CONC. (µg/ml)	VOL. PLASMA ADIC. (mL)	VOL. FINAL (mL)	CONC. (µg/ml)	VOL. ADIC. (mL)	
Clorpropamida	QCC	40,0	0,90	1,00	400,0	0,10	10,00
Clorpropamida	QCB	3,0	0,90	1,00	30,0	0,10	10,00
Clorpropamida	QCA	0,3	0,90	1,00	3,0	0,10	10,00
Clorpropamida	LOQ	0,1	0,90	1,00	1,0	1,10	10,00

8.2.4- Teste de Desempenho do Sistema (*System Suitability Test* - TSS)

Os testes de desempenho (conveniência) do sistema são parte integrante dos métodos cromatográficos e baseiam-se no conceito de que o equipamento, eletrônica, operações analíticas e amostras a serem analisadas constituem um sistema integral que deve ser avaliado como tal. Verificam se a resolução e reprodutibilidade do sistema são adequadas para a análise em questão e são mantidas ao longo da corrida analítica (Ribani *et al*, 2004; USP XXVIII, 2004d).

Foram usadas 5 alíquotas de solução com analito na concentração correspondente a 3 vezes o limite de quantificação e PI na concentração usada no estudo (0,125 µg/ml). As amostras foram injetadas no início e no final de cada lote amostras.

8.2.5- Validação do método de análise

O procedimento de validação de um método analítico consiste em demonstrar que o mesmo quando aplicado à avaliação quantitativa de um analito em uma dada matriz biológica, tal como sangue, plasma, soro, ou urina, é confiável e reprodutível conforme o objetivo para o qual este foi desenvolvido. Com a validação asseguramos e documentamos, em conformidade com as BPL, que as características de desempenho do método são satisfatórias, seguras e confiáveis à aplicação para a qual se pretende com o método analítico proposto (Hembeck, 2002). Cada fase do método deve ser investigada com o objetivo de determinar a extensão na qual o meio ambiente, a matriz, o material, ou variáveis do procedimento podem afetar a análise do analito, na matriz em questão, do momento da coleta do material até/e incluindo o tempo da análise (Shah *et al*, 2000).

Pode ser importante considerar a variabilidade da matriz devido à natureza fisiológica da amostra (plasma lipêmico, etc.). No caso dos procedimentos empregando a técnica de LC/MS/MS, passos apropriados devem ser acrescentados para assegurar a ausência de efeitos matriz ao longo de toda aplicação do método, principalmente se a natureza da matriz usada na validação do método for passível de alteração (King *et al*, 2000). Uma das limitações associadas com a técnica de LC/MS é a sua susceptibilidade a sofrer efeito matriz, que é definido como a consequência sobre a ionização do analito de interesse provocada pela coeluição de componentes da matriz. Tipicamente esta pode ser supressão ou aumento do da resposta com conseqüente perda de precisão e exatidão na análise (Dams *et al*, 2003).

Cada lote (*batch*) de amostras analisadas foi chamado de corrida analítica, lista de amostras desconhecidas ou simplesmente lista e foram dispostas no *rack* do auto-injetor conforme sequência descrita no protocolo de extração (quadro 13).

O número de amostras de QC e o seu posicionamento ao longo da corrida analítica devem ser cuidadosamente considerados para assegurar o adequado controle do ensaio (FDA, 2001b; Bressolle *et al*, 1996; Shah *et al*, 1992).

A validação foi realizada antes de darmos início à quantificação das amostras dos voluntários e consistiu da execução dos testes pertinentes em três lotes (*batch*) de amostras, aqui chamado de lista de validação (1, 2 e 3). Como parte integrante do procedimento de validação, realizamos também os testes de: *carry-over*, *cross talk* e branco da matriz, como descrito no quadro 07, bem como, teste de recuperação, avaliação da supressão iônica e testes de estabilidade.

Quadro 7- Testes de *carry-over*, *cross talk*, Branco da matriz

TESTE	OBJETIVO	EXECUÇÃO ^{1, 2, 3}	CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO
<i>CARRY-OVER</i>	Validar procedimento de lavagem	2 <i>vials</i> : solvente; 2 <i>vials</i> : analito + PI; 2 <i>vials</i> : solvente; 2 <i>vials</i> : analito + PI; 2 <i>vials</i> : solvente.	Ausência de pico interferente nos cromatogramas.
<i>CROSS TALK</i>	Validar sistema de detecção	1 <i>vial</i> : Plasma branco; 1 <i>vial</i> : analito; 1 <i>vial</i> : PI. Monitorar transição do analito e do PI	Ausência de pico interferente nos cromatogramas correspondentes ao branco, ao analito e ao PI.
BRANCO DA MATRIZ	Validar seletividade do método	4 <i>vials</i> : pool de plasma normal; 1 <i>vials</i> : pool de plasma hemolisado; 1 <i>vials</i> : pool de plasma lipêmico; 6 <i>vial</i> : LOQ em solvente	Ausência de pico interferente nos cromatogramas de pool de plasma.

1- Todas as amostras com plasma passaram pelo procedimento normal de extração

2- Analito está na conc. do último ponto da curva de calibração

3- PI está na conc. empregada no estudo (0,125 µg/mL)

Cada lista de validação consistiu de amostras dispostas como descrito no quadro 8 e foi conduzida conforme diretrizes preconizadas pelo FDA e Anvisa.

Quadro 8- Lote de validação

AMOSTRA	VIAL	COMPOSIÇÃO
TSS	5	Analito + PI em solvente
Curva de calibração	Duplicata	Plasma branco extraído
	Duplicata	Plasma branco+ PI extraído
	Duplicata	Pontos da curva em plasma extraído (analito +PI)
LOQ	8	Analito + PI em plasma extraído
QCA	8	Analito + PI em plasma extraído
QCB	8	Analito + PI em plasma extraído
QCC	8	Analito + PI em plasma extraído
TSS	5	Analito + PI em solvente

O protocolo de validação foi preparado com o objetivo de comprovar e documentar que a metodologia desenvolvida é adequada para a análise de Clorpropamida em plasma humano e produz resultados confiáveis e reprodutíveis (Inman *et al*, 1987).

8.2.5.1- Curva de calibração, coeficiente de correlação linear, linearidade, faixa de aplicação (*range* analítico), limite de quantificação

A Calibração é um processo matemático e estatístico para extrair informações a partir da resposta de um instrumento (Honorato *et al*, 2002; Danzer e Currie, 1998).

A concentração de uma amostra não é uma grandeza física observável. Em qualquer método analítico, a concentração sempre é obtida de forma indireta, a partir da medida de outras grandezas como absorção ou emissão de luz, condutividade e até mesmo pesos ou volumes, como nos métodos da química analítica clássica. Para chegarmos ao valor da concentração, cuja determinação é o objetivo final da análise, é necessário encontrarmos uma função que relacione as medidas efetivamente realizadas com a concentração procurada. Em qualquer análise é necessário fazer uma calibração que é uma parte fundamental do processo analítico, podendo afetar a aplicabilidade, a exatidão, a precisão, a duração e o custo global de uma análise (Pimentel *et al*, 1998).

A Curva de calibração é a relação entre a resposta de um instrumento e a quantidade (massa, volume, concentração) de um analito (Barros Neto *et al*, 2001).

Qualquer conjunto de pontos em um espaço multidimensional apresentando uma tendência regular pode ser representado por uma função matemática, que freqüentemente pode ser escolhida através de um processo de ajuste conhecido como método de mínimos quadrados. Este fornece resultados não tendenciosos e com variância mínima dentro de certas suposições de natureza estatística (Custódio *et al*, 1997). Quando se deseja construir uma curva de calibração é feita a suposição de que a curva passa “o mais perto possível” dos pontos experimentais (Pimentel e Barros Neto, 1996).

A curva de calibração, com determinação da função resposta, foi preparada usando como matriz plasma humano, no range de concentrações apresentadas no quadro 13. Esta incluiu uma amostra de branco (matriz biológica isenta de SQR do fármaco e do

PI), uma amostra de matriz biológica mais o PI e de oito amostras contendo SQR do fármaco e PI, contemplando o limite de variação esperado para o método, do LOQ até 120% da concentração mais alta que se pretende analisar, ou seja, de 0,100 µg/mL a 50 µg/mL.

O coeficiente de correlação linear expressa a relação de x a y na curva, onde os valores ideais esperados são 1 e -1, ou seja, quanto mais próximo da unidade maior a correlação, maior a probabilidade de existir uma relação linear definida. Caso os valores tendam a zero, indica que não há regressão linear. O intervalo em que o valor de 'r' pode ser encontrado é: $-1 \leq r \leq +1$; onde, 'r' igual a 1, é considerado como sendo a correlação perfeita e 'r' igual a zero, como sendo a correlação inexistente (Leite, 2002; Barros Neto *et al*, 2001).

A linearidade da curva de calibração foi avaliada pela determinação dos desvios da concentração dos pontos da curva em relação à concentração nominal e coeficiente de correlação linear (USP XXVIII, 2004d), conforme os critérios descritos no quadro 9.

Quadro 9- Concentrações e critérios de aceitação da curva

CONCENTRAÇÃO DOS PONTOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (µg/mL)							
0,1	0,2	0,5	1,5	5,0	15,0	35,0	50,0
DESVIOS ENTRE MÉDIA E A CONCENTRAÇÃO NOMINAL						ACEITAÇÃO	
LOQ						≤ 20%	
Concentrações acima do LOQ						≤ 15%	
Coeficiente de correlação linear						≥ 0,98	
Percentual de pontos de concentração aprovados *						≥ 75%	
*Aprovados conforme critérios acima e incluindo o LOQ e maior concentração da curva							

A faixa de aplicação de um procedimento analítico (*range* analítico) é o intervalo, limite inferior e superior, no qual a concentração do analito é determinada com exatidão, precisão e linearidade (The Japanese Pharmacopeia - JP XIV, 2001; European Pharmacopeia, 2002; The British Pharmacopoeia - BF, 2003).

O LOQ foi definido levando-se em conta a sensibilidade, a precisão e a exatidão do método. Para a determinação da precisão e da exatidão foram empregadas oito amostras preparadas na menor concentração da curva de calibração, ou seja, 0,100 µg/mL, que foram avaliadas conforme critérios descritos no quadro 10.

Quadro 10- Critérios para aprovação do limite inferior de quantificação (LOQ)

CRITÉRIO	ACEITAÇÃO
Picos interferentes *	Ausentes ou no mínimo, 5 vezes menores que o LOQ
Exatidão	80-120%
Precisão	> 20%
* Picos interferentes no tempo de retenção do fármaco	

8.2.5.2- Precisão e exatidão

A precisão de um método analítico é o grau de concordância (ou grau de dispersão) entre os resultados de medidas efetuadas em torno de um valor central, obtidos de ensaios efetuados várias vezes, usualmente triplicatas de pesagens distintas, de uma amostra homogênea, sob condições experimentais idênticas (Peters e Maurer, 2002). Pode ser expressa, quantitativamente, como desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV%). Quanto maior a concordância entre os valores (repetições) em torno da média de concentrações, maior a precisão e menor a dispersão (Cienfuegos, 2005). Quanto maior RSD ou CV%, maior a variabilidade estatística e menor a precisão. Para métodos bioanalíticos não são admitidos valores superiores a 15%, segundo a fórmula (Brasil, 2003c):

$$\text{Precisão (CV\%)} = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração média determinada experimentalmente}} \times 100$$

A repetitividade é avaliação de como o método se comporta sendo realizado pelo mesmo analista, na mesma amostra, mesmas condições de análise e com pequeno intervalo de tempo de diferença de uma análise para outra (FDA, 2001b). A repetitividade é uma característica do método e não do resultado da análise (Swartz e krull, 1997). Para

ensaios de bioequivalência deve ser considerada em nível de repetitividade (intra-lote) e precisão intermediária (inter-lote), sob condições de ensaio idênticas (ICH, 1995). A precisão intermediária expressa as possíveis variações dentro do mesmo laboratório tais como: dias, analistas, equipamento, etc. para a análise de várias alíquotas (pesagens) de uma mesma amostra homogênea (ICH, 1997).

O FDA define a exatidão de um método analítico como sendo o “modo de expressarmos o quanto os valores obtidos no ensaio se encontram próximos do resultado real tido como verdadeiro”.

Este resultado exato, sem erro sistemático é um conceito teórico. A exatidão perfeita ou ideal não pode ser alcançada. Portanto, exatidão em seu significado analítico é sempre considerada dentro de certos limites (Swartz e krull, 1997). É expressa como percentual de resposta obtido através do doseamento de uma quantidade conhecida da substância em exame incorporada em um meio de composição definida e idêntico a matriz da amostra (Eurachem, 1998). Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência (Swartz e krull, 1997).

A análise de brancos é muito importante para a obtenção de resultados exatos. Dependendo do tipo de análise alguns tipos de brancos são imprescindíveis a um bom resultado: branco de reagentes, solventes, PI, branco do analito na matriz (teor zero ou não detectado) ou matriz limpa (FDA, 2001b).

Os ensaios devem ser realizados em um mesmo dia e em dias diferentes. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (Brasil, 2003c):

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média determinada experimentalmente}}{\text{Concentração Teórica}} \times 100$$

Na avaliação da precisão e da exatidão do método foram usadas três concentrações distintas (QCA, QCB, QCC) na faixa de alcance do método (*range*), sendo que foram feitas oito determinações por concentração. A precisão foi expressa como CV%

e a exatidão pela relação entre a média das concentrações determinadas experimentalmente e a concentração teórica correspondente, tida como verdadeira (Karnes *et al*, 1991; Karnes e March, 1991).

A Precisão e Exatidão intra-lote (*intra-batch*), foi determinada pela avaliação de amostras de QCs de um mesmo lote e a inter-lote (*inter-batch*) foi determinada pela avaliação destas nos diversos lotes de amostras, com a avaliação da variabilidade destes (com análises realizadas em dias diferentes); com os critérios de aceitação descritos no quadro 11.

Quadro 11- Critérios de aceitação para validação intra-lote e inter-lote

CRITÉRIO	ACEITAÇÃO*
Exatidão	Entre 85-115% do valor tido como verdadeiro
Precisão	$CV \leq 15\%$

A determinação da precisão do procedimento de re-injeção foi executada re-injetando-se as amostras de LOQ e QCs imediatamente após o término de uma lista de validação. Como critérios de aprovação foram considerados os descritos no quadro 09.

8.2.5.3- Recuperação (R)

É importante considerar que a eficiência do método varia em função da concentração da substância (Thompson *et al*, 1999). Na maioria dos casos, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações. Por esse motivo, a recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de interesse (Ribani *et al*, 2004). A sua determinação avalia a eficiência do processo de extração da amostra e corresponde à fração do analito adicionada à matriz limpa da amostra (branco de matriz) que pode ser detectada pelo método (Burns *et al*, 2002; Eurachem, 1998; IUPAC, 1997).

O teste de recuperação foi executado empregando um lote de amostras específico para essa finalidade, com amostras de QCA, QCB e QCC preparadas em pool de plasma normal, lipêmico e hemolisado. Estas amostras foram submetidas ao procedimento

de extração normal (EXT) e os resultados obtidos com estas foram comparados com os obtidos com o mesmo tipo de amostras não submetidas ao processo de extração (BM), ou seja, o plasma passa pelo procedimento de extração e só então é contaminado (fortificado) com padrão.

$$R\% = \frac{EXT}{BM} \times 100$$

8.2.5.4- Supressão iônica

Para a avaliação da supressão iônica empregamos uma instalação experimental que consistiu de uma bomba de infusão conectada ao sistema por um fluxômetro antes da bifurcação e do sistema de bombeamento de fase móvel HPLC, o qual foi o mesmo usado nas análises do estudo. A bomba de infusão foi colocada para transferir (50,0 µL/min) uma mistura de analito e PI em fase móvel. Uma amostra de plasma humano branco, extraída por procedimento normal adotado para todas as amostras, foi injetado no sistema de HPLC, enquanto uma solução de padrão estava sendo infundida e depois de estabilizada a linha de base com este. Neste sistema, qualquer supressão iônica seria observada como uma depressão do sinal emitido pelo analisador de massa (Muller *et al*, 2002). Uma ilustração do esquema da instalação preparada para a realização do teste foi apresentada no anexo XI.

8.2.6- Testes de estabilidade das amostras, soluções mãe e de trabalho

A estabilidade de um fármaco em um fluido biológico é função das condições de armazenamento, das propriedades físico-químicas deste, da matriz, e do sistema de embalagem/acondicionamento. A estabilidade é pertinente apenas ao sistema e condições para os quais foi determinada não devendo ser extrapolada para outras matrizes e outros sistemas de embalagem. O procedimento de avaliação da estabilidade do analito deve ser conduzido de forma a abranger o período de tempo que vai da coleta das amostras até o término do estudo, considerando as condições de manuseio e armazenamento das amostras e soluções empregadas no estudo (Bressolle *et al*, 1996).

Nestes testes amostras de plasma e soluções empregadas no estudo são submetidas às mesmas condições ou mais adversas às quais as amostras dos voluntários e

soluções foram submetidas, no armazenamento e manuseio, durante o estudo. Os valores de concentração obtidos para essas amostras são comparados com os obtidos para amostras de preparação recente, tidas como referência. Não são aceitas variações superiores a 15%. São empregadas cinco amostras para cada nível de concentração (QCA, QCB e QCC). Os parâmetros empregados nos testes de estabilidade das amostras e soluções empregadas no estudo estão apresentados no quadro 12.

Quadro 12- Testes de estabilidade

TESTES DE ESTABILIDADE DAS AMOSTRAS		
	TEMPO	TEMPERATURA
Auto injetor	143 horas	8 ± 2 °C
Congelamento e descongelamento	1º ciclo: 30 horas	-20°C
	2º ciclo: 17 horas	
	3º ciclo: 47 horas	
Curta duração	23 horas	T °C ambiente
Longa duração	68 dias	-20°C
TESTES DE ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES		
	TEMPO	TEMPERATURA
Solução máster de clorpropamida	42 dias	4 – 8 °C
Solução máster de glibenclamida	42 dias	4 – 8 °C
Solução de trabalho de clorpropamida	15 horas	T °C ambiente

8.2.7- Procedimento de extração

O procedimento de extração foi adotado para todas as amostras dos voluntários, bem como para as amostras de controle de qualidade (QCA, QCB, QCC), LOQ e curva de calibração, tanto no procedimento de validação do método como na quantificação das amostras dos voluntários. A extração foi do tipo líquido-líquido (Henion *et al*, 1998). O protocolo de extração esta esquematizado no anexo XII.

8.2.8- Condições e parâmetros cromatográficos e espectrográficos

As condições e parâmetros do sistema de Cromatografia Líquida de Alta Performance e Espectrometria de Massa, empregados no estudo e definidos por ocasião do desenvolvimento do método e validados, são descritas na tabela 8 e 9.

Tabela 8- Parâmetros da cromatografia

PARÂMETRO-CONDIÇÃO	DESCRIÇÃO
Técnica analítica	LC-MS/MS
Fase móvel	Acetonitrila/água (70/30; v/v) + 10 µM de ácido acético
Extração (mistura de solvente)	Líquido/Líquido – dietil éter/hexano/diclorometano (40/30/30; v/v/v)
Solução de lavagem	Acetonitrila
Solvente de ressuspensão	Fase móvel
Solvente das soluções	Metanol/água (70/30; v/v)
Coluna cromatográfica	Jones, Gênesis C18 4µm (100x 2,1 mm d.i)
Matriz biológica	Plasma humano
Temperatura do auto-injetor	5 ° C
Fluxo de fase móvel	0,2 ml/min
Pressão	35 bar
Temperatura da coluna	Temperatura ambiente
Volume de injeção	5 µL
Anti-coagulante	Heparina sódica
Analito quantificado	Clorpropamida
Padrão interno	Glibenclamida
Concentração de padrão interno	0,125 µg/mL
Tempo total da corrida	3,5 min
Tempo de retenção	Clorpropamida 1,8 ± 0,3
Tempo de retenção	Glibenclamida (IS) 2,5 ± 0,3

O espectro do analito (clorpropamida) e do PI (glibenclamida) foram apresentados no anexo XIII e XIX.

Tabela 9- Parâmetros da espectrometria de massa

PARÂMETRO	DESCRIÇÃO	
	Clorpropamida	Glibenclamida
Transição MRM	277,0 > 175,0	494,2 > 369,4
Íon precursor (Íon pai)	277,0	494,2
Íon produto (Íon filho)	175,0	369,4
<i>Dwell time</i> (tempo de residência)	0,2 seg	0,2 seg
Energia de colisão	24	19
Voltagem do cone (<i>decluster</i> potencial)	30	23
Detecção	Monitoramento de Múltipla Reação (MRM)	
Tipo de ionização	ESP+	
Temperatura de dessolvatação (°C)	350	
Voltagem capilar (kV)	5	
Espectrômetro de massa	API 2000	

8.2.9- Preparo da corrida analítica (lista)

Quadro 13- Lote de amostras desconhecidas – Protocolo de extração

AMOSTRA	VIAL	COMPOSIÇÃO
TSS	5	Analito + PI em solvente
Curva	duplicata	Plasma branco extraído
	duplicata	Plasma branco+ PI extraído
	duplicata	pontos da curva em plasma extraído (analito +PI)
Amostras	10	Plasma dos voluntários de concentração desconhecida
QCA	1	analito + PI em plasma extraído
Amostras	10	Plasma dos voluntários de concentração desconhecida
QCB	1	analito + PI em plasma extraído
Amostras	10	Plasma dos voluntários* de concentração desconhecida
QCC	1	analito + PI em plasma extraído
(...)		
TSS	5	Analito + PI em solvente

As amostras de cada lista foram dispostas no *rack* do auto-injetor conforme seqüência descrita no protocolo de extração (quadro 13).

Cada voluntário teve suas amostras do primeiro e segundo períodos analisadas em uma mesma lista. Cada lote continha no máximo 300 *vials* e no mínimo 4 QC de cada nível de concentração intercalados a cada 10 amostras de voluntários, sendo amostras coletadas no primeiro e segundo período de no máximo 2 voluntários.

8.2.10- Validação da corrida analítica

Amostras de QC, em 3 níveis de concentração, foram usadas para monitorar e validar as corridas analíticas e foram descartadas as com desvio $\geq 15\%$ em relação à concentração nominal. A corrida analítica seria rejeitada se mais que 33% do total ou mais que 50% dos QCs na mesma concentração tivessem sido rejeitados.

Se a concentração de uma amostra teve valor abaixo do LOQ seu valor não foi extrapolado e, portanto, relatado como zero ou abreviadamente com a sigla em Inglês BLOQ (Abaixo do Limite de Quantificação).

Quadro 14- Critérios para execução de re-análise

RE-ANÁLISE
PI não é adicionado à amostra
Área do PI apresentando um valor aberrante
Perfil cromatográfico insatisfatório
Erro no processamento (extração) da amostra
Concentração fora do range da curva de calibração
Razões farmacocinéticas

Caso uma amostra de voluntário tenha sido rejeitada devido a razões analíticas ou seu valor foi considerado suspeito, segundo os critérios descritos no quadro 14, foi executado o procedimento de re-análise. Estas foram feitas numa lista separada (Lista de re-análise - LRE01), elaborada especialmente para esta finalidade em triplicata (tabela 24) e adotados os critérios de decisão descritos no quadro 15.

Quadro 15- Critérios de decisão para definir valores aceitos após a re-análise

RE-ANÁLISE	
DIFERENÇA ENTRE MÉDIA DE RE-ANÁLISE E VALOR ORIGINAL	VALOR CONSIDERADO
< 15 %	Valor original
Entre 15-30%	Média dos 4 valores
> 30%	Média da re-análise

8.3- Fase estatística

O tratamento dos parâmetros farmacocinéticos incluiu:

Cálculo de:

$ASC_{(0-72 \text{ horas})} \rightarrow$ Área sob a curva de concentração da droga *versus* tempo do tempo 0 (zero) ao tempo de 72 horas, calculada pelo método linear-log trapezoidal;

Determinação de:

$C_{\max} \rightarrow$ Maior concentração alcançada, com base nos dados experimentais;

$T_{\max} \rightarrow$ Tempo no qual ocorreu $C_{\max}$, não foi considerado estatisticamente.

$T_{1/2}$ e K_e não foram calculados devido ao fato de empregarmos ASC_{truncada}

Foi empregada análise de variância apropriada para o modelo de 2 períodos cruzados, sob os dados de $ASC_{(\text{truncada})}$ e $C_{\max}$ transformados logaritmicamente, a qual levou em conta em seu modelo os efeitos de seqüência, voluntário dentro da seqüência, tratamento e período (Chow e Wang, 2001).

A verificação de existência de efeito residual foi realizada com base na análise de variância (ANOVA), utilizando-se como parâmetro o p -value obtido com base na estatística de F do efeito de seqüência (FDA, 2001a; Brasil 2003d; FDA 2003).

Foram calculados os pontos paramétricos e estimativas dos intervalos da razão T/R (formulação "teste" / formulação "referência") para valores $ASC_{(truncada)}$ e C_{max} . A biodisponibilidade relativa da formulação teste versus referência foi avaliada pelas razões das médias geométricas (pontos estimados). O intervalo de confiança de 90% foi usado como estimativa de intervalo e foi determinado por análises paramétricas (dois testes t unicaudais, $p=0,05$) (Schuirmann, 1987; Senn, 2001; FDA 2003).

As formulações em estudo serão consideradas com biodisponibilidade equivalente caso o intervalo de confiança (IC) de 90%, da média geométrica da $ASC_{(truncada)}$ (no que diz respeito à extensão da absorção) e C_{max} (no que diz respeito à velocidade de absorção), da formulação teste, estejam dentro do intervalo de 80-125% da média geométrica da formulação referência (Brasil 2002; Brasil 2003e; FDA 2003).

No que se refere aos diferentes parâmetros de ASC, para efeito de decisão de bioequivalência, a análise considerou como variável alvo a $ASC_{(truncada)}$ considerada até 72 horas (Marzo *et al*, 1999).

O número planejado foi de 36 voluntários. Em caso de *drop-out* não houve substituição (Chow e Wang, 2001; Senn, 2001).

O nível de significância a ser utilizado é $p < \text{ou} = 0,05$ (Senn, 2001)

Foram incluídos na análise estatística apenas os voluntários que vieram a completar os dois períodos do estudo (Schuirmann, 1990).

5- RESULTADOS

9- Fase clínica

9.1- Dados demográficos

Quadro 16- Dados demográficos

NÚMERO	SEXO	IDENTIFICAÇÃO	NASCIMENTO	IDADE [ANOS]	ALTURA [M]	PESO [KG]	IMC [Kg/M ²]
1	M	AP220960M	22-Set-60	44	1,67	69,00	24,70
2	M	AR140284M	14-Fev-84	20	1,77	62,00	19,70
3	M	AS150872M	15-Ago-72	32	1,68	66,00	23,30
4	M	CS210372M	21-Mar-72	32	1,65	68,00	24,90
5	M	DR120383M	12-Mar-83	21	1,68	73,00	25,80
6	M	E0291256M	29-Dez-56	48	1,61	58,50	22,50
7	M	EO190773M	19-Jul-73	31	1,64	56,50	21,00
8	M	FC010271M	1-Fev-71	33	1,63	67,50	25,40
9	M	FR011083M	1-Out-83	21	1,78	66,60	21,00
10	M	FS090278M	9-Fev-78	26	1,72	67,30	22,70
11	M	FS190566M	19-Mai-66	38	1,73	76,90	25,70
12	M	JX070979M	7-Set-79	25	1,82	72,90	22,00
13	M	JP150975M	15-Set-75	29	1,71	72,80	24,90
14	M	MM231074M	23-Out-74	30	1,72	63,30	21,40
15	M	NS130786M	13-Jul-86	18	1,76	76,60	24,70
16	M	RG170883M	17-Ago-83	21	1,77	71,60	22,80
17	M	RB011173M	1-Nov-73	31	1,58	58,00	23,20
18	M	SP040582M	4-Mai-82	22	1,66	66,50	24,10
19	F	AF090874F	9-Ago-74	30	1,64	65,20	24,20
20	F	AO240385F	24-Mar-85	19	1,57	55,60	22,50
21	F	AG270679F	27-Jun-79	25	1,59	58,20	23,00
22	F	CA011261F	1-Dez-61	43	1,62	68,00	26,00
23	F	CT250670F	25-Jun-70	34	1,52	53,30	23,00
24	F	DC230286F	23-Fev-86	18	1,56	62,10	25,50
25	F	DN060657F	6-Jun-57	47	1,59	61,10	24,10
26	F	DP020782F	2-Jul-82	22	1,70	77,80	26,90
27	F	FM200978F	20-Set-78	26	1,52	52,10	22,50
28	F	JM151057F	15-Out-57	48	1,65	61,20	22,40
29	F	KG220180F	22-Jan-80	25	1,52	51,00	22,00
30	F	LM280876F	28-Ago-76	28	1,67	61,50	21,80
31	F	MB111268F	11-Dez-68	37	1,54	61,20	25,80
32	F	PB190885F	19-Ago-85	19	1,60	60,50	23,60
33	F	RP030968F	3-Set-68	36	1,54	54,30	22,80
34	F	RS300785F	30-Jul-85	19	1,58	56,00	22,40
35	F	RC200570F	20-Mai-70	34	1,55	63,40	26,30
36	F	SR180383F	18-Mar-83	21	1,60	58,50	22,80
			MÉDIA	29	1,64	63,72	23,54
			SD	8.94	0,08	7,17	1,72
			MIN	18	1,52	51,00	19,70
			MAX	48	1,82	77,80	26,90

9.2- Lista de aleatorização

Quadro 17- Lista de aleatorização

NÚMERO	SEXO	IDENTIFICAÇÃO	PERÍODO I	PERÍODO II
1	M	AP220960M	T	R
2	M	AR140284M	R	T
3	M	AS150872M	T	R
4	M	CS210372M	R	T
5	M	DR120383M	T	R
6	M	E0291256M	R	T
7	M	EO190773M	T	R
8	M	FC010271M	R	T
9	M	FR011083M	R	T
10	M	FS090278M	T	R
11	M	FS190566M	R	T
12	M	JX070979M	T	R
13	M	JP150975M	T	R
14	M	MM231074M	R	T
15	M	NS130786M	T	R
16	M	RG170883M	R	T
17	M	RB011173M	R	T
18	M	SP040582M	T	R
19	F	AF090874F	R	T
20	F	AO240385F	T	R
21	F	AG270679F	R	T
22	F	CA011261F	T	R
23	F	CT250670F	R	T
24	F	DC230286F	T	R
25	F	DN060657F	R	T
26	F	DP020782F	T	R
27	F	FM200978F	T	R
28	F	JM151057F	R	T
29	F	KG220180F	T	R
30	F	LM280876F	R	T
31	F	MB111268F	R	T
32	F	PB190885F	T	R
33	F	RP030968F	T	R
34	F	RS300785F	R	T
35	F	RC200570F	T	R
36	F	SR180383F	R	T

Codificação para identificação dos voluntários: AABDDMMAAS em que A=inicial do primeiro nome. B=inicial do sobrenome, DD=dia do nascimento, MM=mês do nascimento, AA=ano do nascimento, S=sexo.

O quadro 16 apresenta a média e desvio padrão dos dados demográficos dos voluntários recrutados para o estudo. O quadro 17 apresenta a lista de aleatorização adotada no estudo. A tabela 10 apresenta os dados separados por gênero, comparativamente aos dados de todos os voluntários.

Tabela 10- Dados demográficos de todos os voluntários e por gênero

VOLUNTÁRIO	IDADE [ANOS]			ALTURA [M]			PESO [KG]			IMC [Kg/M ²]		
	MASC	FEM	TOTAL	MASC	FEM	TOTAL	MASC	FEM	TOTAL	MASC	FEM	TOTAL
MÉDIA	29	29	29	1,70	1,59	1,64	67,39	60,06	63,72	23,32	23,76	23,54
SD	8,32	9,75	8,94	0,07	0,05	0,08	6,05	6,38	7,17	1,82	1,64	1,72
MIN	18	18	18	1,58	1,52	1,52	56,50	51,00	51,00	19,70	21,80	19,70
MAX	48	48	48	1,82	1,70	1,82	76,90	77,80	77,80	25,80	26,90	26,90

O quadro 18 apresenta os eventos adversos relatados pelos voluntários nos dois períodos de medicação. Os resultados dos exames laboratoriais pré e pós-estudo estão graficamente apresentados no anexo IV.

Quadro 18- Eventos adversos

EVENTO	Nº DE CASOS	CLASSIFICAÇÃO
Cefaléia	07	Não sérios de intensidade fraca a moderada
Sonolência	01	Não sério de intensidade fraca a moderada
Náusea	02	Não sérios de intensidade fraca a moderada

O voluntário 21 relatou a ocorrência de diarreia acompanhada de distensão abdominal antes da administração da medicação do segundo período e foi excluído do estudo por decisão do investigador médico.

O protocolo clínico e o termo de consentimento livre e esclarecido foram submetidos à aprovação do CEP da Unicamp e o referido termo foi assinado por todos os voluntários selecionados antes do internamento, conforme preconizado pelas normas que regulamentam as pesquisas envolvendo seres humanos. O documento de aprovação do protocolo pelo comitê está reproduzido no anexo V.

10- Fase analítica

Os certificados de análise do analito, clorpropamida, e do PI, glibenclamida, estão reproduzidos nos anexos VI e VII, respectivamente. A estrutura química dos mesmos foi apresentada no anexo VIII.

10.1- Validação do método analítico

10.1.1- Supressão Iônica, *Carry Over*, *Cross Talk*, Branco de Matriz

Na quadro 19 apresentamos os resultados do ensaio de supressão iônica, *carry-over*, *cross-talk* e branco da matriz. Os cromatogramas referentes a estes ensaios foram apresentados no anexo IX.

Quadro 19- Supressão iônica, *carry over*, *cross talk*, branco de matriz

TESTES	RESULTADO
Supressão iônica	Ausência de supressão iônica no tempo de retenção do analito e PI.
<i>Carry over</i>	Ausência de picos interferentes com área maior ou igual a 20% da área do analito e PI.
<i>Cross talk</i>	Confirmada a relação dos cromatogramas com a presença de analito e do PI.
Especificidade (branco de matriz)	Ausência de picos interferentes com área maior ou igual a 20% da área do analito e PI.

10.1.2- Curva de calibração

A função matemática que melhor descreve a curva de calibração é uma função quadrática do tipo: $y=a+bx+cx^2$. A tabela 11 apresenta os dados de validação das curvas de calibração de três lotes de amostras empregadas para validação do método 1, 2 e 3.

Foram consideradas, para a definição da curva, 8 concentrações proporcionando uma curva com 8 pontos.

A representação gráfica da curva foi apresentada na figura 9 no anexo X.

Tabela 11- Validação das curvas de calibração

CONCENTRAÇÃO NOMINAL (µg/mL)	CONCENTRAÇÕES DETERMINADAS EXPERIMENTALMENTE (µg/mL)						STATUS
	LOTE DE VALIDAÇÃO			MÉDIA (µg/mL)	EXATIDÃO (%)	PRECISÃO (CV%)	
	1	2	3				
0,100	0,0941	0,0800	0,0862	0,0868	86,8	8,1	Aprovado
	0,0954	0,0964	0,0927	0,0948	94,8	2,0	
0,200	0,193	0,184	0,194	0,190	95,2	2,9	Aprovado
	0,214	0,213	0,202	0,210	104,8	3,2	
0,500	0,500	0,520	0,533	0,518	103,5	3,2	Aprovado
	0,508	0,527	0,535	0,523	104,7	2,7	
1,50	1,53	1,65	1,68	1,62	108,0	4,9	Aprovado
	1,54	1,73	1,88	1,72	114,4	9,9	
5,00	5,00	4,99	4,75	4,91	98,3	2,9	Aprovado
	5,13	5,59	5,34	5,35	107,1	4,3	
15,00	14,5	14,2	15,2	14,6	97,6	3,5	Aprovado
	15,0	15,1	13,8	14,6	97,6	4,9	
35,00	35,2	34,8	36,5	35,5	101,4	2,5	Aprovado
	35,5	33,8	35,3	34,9	99,6	2,7	
50,00	49,0	48,9	47,5	48,5	96,9	1,7	Aprovado
	50,6	52,9	51,5	51,7	103,3	2,2	
CORRELAÇÃO LINEAR	0,9999	0,9999	0,9985				

10.1.3- Determinação do limite inferior de quantificação

A tabela 12 apresenta os resultados que validam a concentração de 0,100 µg/mL, como a menor concentração determinada pelo método com precisão e exatidão satisfatórias.

Tabela 12- Limite inferior de quantificação

LOTE	INTRA-LOTE			INTER-LOTE		
	MÉDIA (µg/mL)	PRECISÃO	EXATIDÃO	MÉDIA (µg/mL)	PRECISÃO	EXATIDÃO
1	0,101	6,9	101,0	0,0958	10,8	95,8
2	0,086	3,5	86,0			
3	0,100	11,2	100,4			

10.1.4- Validação intra-lote e inter-lote

A tabela 13 apresenta os resultados obtidos na determinação da precisão e exatidão inter e intra-lote. Nesta tabela para validação a nível intra-lote apresentamos os valores médios de concentração (n=8), o CV% para avaliação da precisão, e o percentual (%) de variação da concentração obtida experimentalmente e a concentração nominal tida como verdadeira para avaliação da exatidão. Os dados são apresentados em três níveis de concentração: baixo, médio e alto (QCA, QCB, QCC) na faixa de alcance do método.

Para validação a nível inter-lote apresentamos os valores médios de concentração, o CV% e a exatidão (%) obtidos a partir das médias de cada lote de validação. A nível inter-lote os dados também são apresentados em três níveis de concentração: baixo, médio e alto (QCA, QCB, QCC) na faixa de alcance do método.

Tabela 13- Precisão e exatidão intra e inter-lote

		QCA (0,300 µg/mL)			QCB (3,00 µg/mL)			QCC (40,0 µg/mL)		
		01	02	03	01	02	03	01	02	03
INTRA-LOTE	MÉDIA (µg/mL)	0,330	0,306	0,335	3,38	3,21	3,37	44,8	39,5	39,4
	PRECISÃO (CV %)	2,7	4,9	4,8	2,6	3,6	5,2	4,7	4,0	6,5
	EXATIDÃO (%)	110,2	102,0	111,6	112,6	107,1	112,3	112,0	98,8	98,4
INTER-LOTE	MÉDIA (µg/mL)		0,324			3,32			41,2	
	PRECISÃO (CV %)		5,7			4,4			7,9	
	EXATIDÃO (%)		107,9			110,7			103,1	

10.1.5- Validação do processo de re-injeção

Os resultados, apresentados na tabela 14, nos permitem avaliar a confiabilidade dos dados fornecidos após a execução de um procedimento de re-injeção das amostras, por exemplo, nos caso em que a corrida tenha sido interrompida por qualquer motivo.

Tabela 14- Validação do procedimento de re-injeção

	LOQ (µg/mL)		QCA (µg/mL)		QCB (µg/mL)		QCC (µg/mL)	
	INICIAL	RE-INJEÇÃO	INICIAL	RE-INJEÇÃO	INICIAL	RE-INJEÇÃO	INICIAL	RE-INJEÇÃO
MÉDIA (µg/mL)	0,101	0,109	0,330	0,341	3,38	3,34	44,8	45,0
VARIAÇÃO (%)	78		31		-1,1		05	

10.1.6- Recuperação

As tabelas 15 e 16 apresentam os resultados obtidos na determinação do fator de recuperação do método para o analito (clorpropamida) e para o PI (glibenclamida), respectivamente.

Tabela 15- Teste de recuperação - clorpropamida

NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO	POOL	AMOSTRA NÃO EXTRAÍDA	AMOSTRA EXTRAÍDA	RECUPERAÇÃO		CV (%)
				INDIVIDUAL	MÉDIA	
BAIXA	1	0,320	0,131	40,9	41,2	44
	2	0,310	0,123	39,6		
	3	0,305	0,132	43,2		
MÉDIA	1	3,24	1,45	44,9	44,9	14
	2	3,22	1,43	44,3		
	3	3,34	1,52	45,6		
	Hemolisado	3,03	1,41	46,6		
	Lipêmico	3,06	1,28	41,7		
ALTA	1	44,8	18,3	40,7	39,0	40
	2	48,4	18,7	38,6		
	3	48,6	18,3	37,8		

Média de valores em $\mu\text{g/mL}$, $n = 5$

Tabela 16- Teste de recuperação - glibenclamida

NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO	POOL	AMOSTRA NÃO EXTRAÍDA	AMOSTRA EXTRAÍDA	RECUPERAÇÃO		CV (%)
				INDIVIDUAL	MÉDIA	
BAIXA	1	0,0285	0,0131	46,0	45,2	37
	2	0,0300	0,0130	43,3		
	3	0,0283	0,0131	46,2		
MÉDIA	1	0,290	0,144	49,9	47,2	48
	2	0,311	0,142	45,8		
	3	0,307	0,141	46,0		
	Hemolisado	0,318	0,146	46,0		
	Lipêmico	0,298	0,140	47,1		
ALTA	1	1,512	0,693	45,8	47,3	32
	2	1,363	0,665	48,8		
	3	1,482	0,701	47,3		

Média de valores em $\mu\text{g/mL}$, $n = 5$

10.2- Testes de estabilidade das amostras e soluções

Os resultados do teste de estabilidade das amostras, no compartimento do auto-injetor, são apresentados na tabela 17. Nesta tabela indicamos a média de concentração em três níveis (baixo, médio e alto) para as amostras processadas, os respectivos coeficientes de variação (para n=5) e a variação após 143 horas de permanência no auto-injetor à 5°C.

Tabela 17- Teste de estabilidade no auto-injetor

	QCA (0,300 µg/mL)		QCB (3,00 µg/mL)		QCC (40,0 µg/mL)	
	REFERÊNCIA	APÓS 143 HORAS	REFERÊNCIA	APÓS 143 HORAS	REFERÊNCIA	APÓS 143 HORAS
MÉDIA (µg/mL)	0,288	0,297	2,81	2,94	37,0	38,0
CV (%)	3,9	3,8	2,7	3,9	8,4	3,9
VARIAÇÃO	3,3		4,6		2,8	

Os resultados do teste de congelamento e descongelamento das amostras, após 3 ciclos de variação de temperatura (-20°C à temperatura ambiente), são apresentados na tabela 18. Nesta tabela indicamos a média de concentração em três níveis (baixo, médio e alto) para as amostras processadas, os respectivos coeficientes de variação (para n=5) e a variação entre os dados de concentração obtidos antes e após o 3º ciclo de congelamento e descongelamento.

Tabela 18- Teste de estabilidade no congelamento e descongelamento

	QCA (0,300 µg/mL)		QCB (3,00 µg/mL)		QCC (40,0 µg/mL)	
	REFERÊNCIA	APÓS 3º CICLO	REFERÊNCIA	APÓS 3º CICLO	REFERÊNCIA	APÓS 3º CICLO
MÉDIA (µg/mL)	0,305	0,290	3,16	2,93	37,1	36,6
CV (%)	7,2	5,2	5,6	7,2	12,3	8,1
VARIAÇÃO	-5,0		-7,5		-1,3	

Os resultados do teste de estabilidade da amostra, após processamento por 23 horas, são apresentados na tabela 19. Nesta tabela indicamos a média de concentração em três níveis (baixo, médio e alto) para as amostras processadas, os respectivos coeficientes de variação (para n=5) e a variação entre os dados de concentração obtidos antes e após 23 horas.

Tabela 19- Teste de estabilidade de curta duração

	QCA (0,300 µg/mL)		QCB (3,00 µg/mL)		QCC (40,0 µg/mL)	
	REFERÊNCIA	APÓS 23 HORAS	REFERÊNCIA	APÓS 23 HORAS	REFERÊNCIA	APÓS 23 HORAS
MÉDIA (µg/mL)	0,321	0,320	3,22	3,18	38,4	39,6
CV (%)	2,9	5,8	4,4	3,1	2,7	5,0
VARIAÇÃO	-0,4		-1,3		3,2	

Os resultados do teste de estabilidade para as amostras, quando acondicionadas à temperatura de -20 °C pelo período de duração do estudo, são apresentados na tabela 20. Nesta tabela indicamos a média de concentração em três níveis (baixo, médio e alto) para as amostras processadas, os respectivos coeficientes de variação (para n=5) e a variação entre os dados de concentração obtidos antes e após 68 dias de acondicionamento.

Tabela 20- Teste de estabilidade de longa duração

	QCA (0,300 µg/mL)		QCB (3,00 µg/mL)		QCC (40,0 µg/mL)	
	REFERÊNCIA	APÓS 68 DIAS	REFERÊNCIA	APÓS 68 DIAS	REFERÊNCIA	APÓS 68 DIAS
MÉDIA (µg/mL)	0,295	0,288	3,15	3,08	40,1	36,9
CV (%)	9,0	4,4	4,2	3,9	7,9	5,3
VARIAÇÃO	-2,4		-2,2		-7,9	

Os resultados do teste de estabilidade da solução mãe de clorpropamida e glibenclamida, acondicionada à temperatura de 4 a 8°C (geladeira) por 42 dias, são apresentadas na tabela 21 e 22, respectivamente. Nestas tabelas indicamos a média de concentração em três níveis (baixo, médio e alto) para as soluções, os respectivos

coeficientes de variação (para n=5) e a variação entre os dados de concentração obtidos antes e após 42 dias.

Tabela 21- Estabilidade da solução mãe de clorpropamida

	QCA (0,300 µg/mL)		QCB (3,00 µg/mL)		QCC (40,0 µg/mL)	
	REFERÊNCIA	APÓS 42 DIAS	REFERÊNCIA	APÓS 42 DIAS	REFERÊNCIA	APÓS 42 DIAS
MÉDIA (µg/mL)	0,309	0,327	2,92	3,23	44,0	43,4
CV (%)	6,6	4,7	7,4	7,9	9,3	8,7
VARIAÇÃO	5,8		8,9		-1,4	

Tabela 22- Estabilidade da solução mãe de glibenclamida

	QCA (0,03 µg/mL)		QCB (0,30 µg/mL)		QCC (1,5 µg/mL)	
	REFERÊNCIA	APÓS 42 DIAS	REFERÊNCIA	APÓS 42 DIAS	REFERÊNCIA	APÓS 42 DIAS
MÉDIA (µg/mL)	0,0314	0,0305	0,335	0,313	1,68	1,52
CV (%)	4,7	2,1	3,3	3,2	3,8	4,6
VARIAÇÃO	-2,7		-6,6		-9,5	

Os resultados do teste de estabilidade da solução de trabalho da clorpropamida, quando mantidas em temperatura ambiente por 15 horas, são apresentados na tabela 23. Nesta tabela indicamos a média de concentração em três níveis (baixo, médio e alto) para a solução de trabalho de clorpropamida, os respectivos coeficientes de variação (para n=5) e a variação entre os dados de concentração obtidos antes e após 15 horas.

Tabela 23- Estabilidade da solução de trabalho de clorpropamida

	QCA (0,300 µg/mL)		QCB (3,00 µg/mL)		QCC (40,0 µg/mL)	
	REFERÊNCIA	APÓS 15 HORAS	REFERÊNCIA	APÓS 15 HORAS	REFERÊNCIA	APÓS 15 HORAS
MÉDIA (µg/mL)	0,343	0,311	3,38	3,33	37,6	41,0
CV (%)	4,0	7,5	3,0	4,7	5,6	8,3
VARIAÇÃO	-9,2		-1,5		8,9	

10.3- Validação dos lotes de amostras dos voluntários

Os resultados da validação das corridas analíticas de todas as listas de amostras dos voluntários são apresentados na tabela 24. As listas LAD02, LAD03, LAD12 e LAD13 foram rejeitadas vindo a ser repetidas integralmente nas listas de repetição (LRP) de número 01 a 07. A lista LRE01 foi feita para as amostras que foram rejeitadas individualmente, conforme motivos descritos na tabela 32, e foram agrupadas para re-análise.

Tabela 24- Identificação das listas de amostras analisadas dos voluntários

IDENTIFICAÇÃO DA LISTA (LOTE)	VOLUNTÁRIO QUANT. NO LOTE	TAMANHO DO LOTE	STATUS	OBSERVAÇÕES*
LAD01	Vols. 001-002-003-004	216	Aprovado	-
LAD02	Vols. 005-006-007-008-009	259	Rejeitado	QCs fora do <i>range</i>
LAD03	Vols. 010-011-012-013-014	261	Rejeitado	Corrida interrompida
LAD04	Vols. 015-016	123	Aprovado	-
LAD05	Vols. 017-018	123	Aprovado	-
LAD06	Vols. 019-020	123	Aprovado	-
LAD07	Vols. 022-023	123	Aprovado	-
LAD08	Vols. 024-025	120	Aprovado	-
LAD09	Vols. 026-027	121	Aprovado	-
LAD10	Vols. 028-029	123	Aprovado	-
LAD11	Vols. 030-031	123	Aprovado	-
LAD12	Vols. 032-033	123	Rejeitado	PI apresentou valor aberrante
LAD13	Vols. 034-035	123	Rejeitado	QCs fora do <i>range</i>
LAD14	Vols. 036-021	96	Aprovado	-
LRP01	Vols. 005-006	121	Aprovado	-
LRP02	Vols. 007-008	123	Aprovado	-
LRP03	Vols. 009-010	123	Aprovado	-
LRP04	Vols. 011-012	123	Aprovado	-
LRP05	Vols. 013-014	123	Aprovado	-
LRP06	Vols. 032-033	123	Aprovado	-
LRP07	Vols. 034-035	123	Aprovado	-
LRE01	Lote de amostras re-analisadas	123	Aprovado	Vide tabela 32

LAD: Lista de amostras desconhecidas (amostras de voluntários)

LRP: Lista de repetição onde todas as amostras dos voluntários que compõem a lista são re-analisadas.

LRE: Lista de re-análise de amostra dos voluntários onde apenas algumas amostras por lista são re-analisadas (Vide tabela 32).

** As observações referem-se aos motivos de rejeição do lote de amostras (lista) na sua totalidade.*

Na tabela 25 é apresentado um resumo da validação das corridas analíticas para análise das amostras dos voluntários.

Tabela 25- Informações adicionais sobre as listas de amostras

PERCENTUAIS DE APROVAÇÃO	
Total de amostras desconhecidas quantificadas	1481
Total de amostras de QCs incluídas	168
% de QCs em relação às amostras desconhecidas quantificadas	11,34%
Total de QCs aprovados	151
% de QCs aprovados	89,9
Lotes processados	22
Lotes rejeitados	4

10.3.1- Teste de desempenho do sistema (TSS-System Suitability Test)

Tabela 26- Dados do TSS e perfil de resposta do PI

IDENT. LISTAS DE AMOSTRAS	ÁREA DO PI		TEMPO DE RETENÇÃO DO ANALITO				TSS			
			TSS		QC E AMOSTRAS VOLUNTÁRIOS		INÍCIO		TÉRMINO	
	MÉDIA	CV (%)	MÉDIA	CV (%)	MÉDIA	CV (%)	MÉDIA	CV (%)	MÉDIA	CV (%)
LAD01	257364	10,0	1,86	0,5	1,86	0,7	0,20	2,1	0,20	3,5
LAD04	283455	13,2	1,85	1,3	1,86	0,5	0,16	8,7	0,15	8,8
LAD05	289958	5,9	1,87	0,6	1,87	0,5	0,13	3,0	0,16	4,4
LAD06	294380	7,2	1,88	0,3	1,87	0,6	0,16	6,1	0,15	6,5
LAD07	278052	12,6	1,86	1,3	1,87	0,9	0,19	1,5	0,16	1,4
LAD08	244037	3,6	1,83	0,3	1,83	0,3	0,16	2,7	0,15	6,4
LAD09	250936	4,7	1,88	0,5	1,84	1,1	0,16	2,2	0,16	3,0
LAD10	243765	4,8	1,85	1,0	1,85	1,1	0,16	6,2	0,15	1,9
LAD11	248652	7,2	1,89	0,3	1,89	0,7	0,14	1,6	0,15	2,2
LAD14	236905	8,4	1,84	0,5	1,84	0,3	0,17	3,7	0,17	2,6
LRP01	239487	10,4	1,85	0,9	1,84	0,6	0,21	8,5	0,19	5,3
LRP02	288050	5,5	1,83	1,2	1,83	0,8	0,16	5,8	0,18	10,9
LRP03	263461	9,1	1,86	1,2	1,85	0,9	0,20	2,4	0,21	3,3
LRP04	272973	12,3	1,86	1,1	1,86	1,0	0,20	6,2	0,18	5,6
LRP05	265374	8,9	1,86	1,1	1,83	0,8	0,22	9,9	0,20	3,7
LRP06	229300	12,7	1,83	0,4	1,83	0,3	0,22	4,4	0,22	2,6
LRP07	227570	10,0	1,85	0,8	1,85	0,9	0,21	3,7	0,23	2,9
LRE01	207268	9,7	1,88	1,1	1,86	0,5	0,09	3,7	0,09	7,8
MÉDIA	256722	8,7	1,86	0,8	1,85	0,7	0,17	4,6	0,17	4,6

A tabela 26 apresenta os resultados do TSS respectivamente para todas as listas aprovadas.

10.3.2- Validação das curvas de calibração das listas de amostras dos voluntários

O modelo de regressão, as equações para cada curva de calibração, com coeficiente angular e intercepto da reta, bem como o respectivo coeficiente de correlação linear (r), é mostrado abaixo, na tabela 27, para todas as listas aprovadas.

Tabela 27- Equações das curvas de calibração de cada lista de amostra

EQUAÇÃO GERAL: $y = a + bx + cx^2$ (1/x weighted)				
IDENTIFICAÇÃO	a	b	c	r
LAD01	7.25E-03	5.88E-01	-3.74E-03	0,998800
LAD04	1.03E-02	4.19E-01	-1.45E-03	0,999000
LAD05	-6.76E-03	4.53E-01	-2.52E-03	0,999400
LAD06	1.84E-03	4.89E-01	-2.37E-03	0,999700
LAD07	9.75E-03	4.88E-01	-2.74E-03	0,999500
LAD08	6.75E-03	4.50E-01	-2.01E-03	0,999000
LAD09	2.01E-03	4.40E-01	-1.47E-03	0,999700
LAD10	-3.04E-04	4.64E-01	-2.35E-03	0,999600
LAD11	3.23E-03	4.46E-01	-1.35E-03	0,998800
LAD14	1.36E-02	4.90E-01	-2.85E-03	0,999500
LRP01	1.14E-02	5.27E-01	-2.99E-03	0,999400
LRP02	8.85E-03	5.09E-01	-2.40E-03	0,998700
LRP03	4.39E-03	5.97E-01	-4.16E-03	0,998900
LRP04	2.72E-03	6.44E-01	-5.39E-03	0,998800
LRP05	2.39E-02	5.44E-01	-2.74E-03	0,999500
LRP06	1.71E-02	6.17E-01	-3.52E-03	0,999100
LRP07	1.31E-02	5.97E-01	-3.39E-03	0,998900
LRE01	1.19E-02	2.68E-01	-8.77E-04	0,998300

10.3.3- Validação intra-lote e validação inter-lote

Os resultados da validação intra-lote e inter-lote são apresentados, respectivamente, nas tabelas 28 e 29.

Tabela 28- Controle de qualidade intra - lote

LISTA	QCA				QCB				QCC				TOTAL DE QC		
	MÉDIA (µg/mL)	CV(%)	EXATIDÃO	% APROV.	MÉDIA (µg/mL)	CV(%)	EXATIDÃO	% APROV.	MÉDIA (µg/mL)	CV(%)	EXATIDÃO	% APROV.	APROV.	TOTAL	%
LAD 01	0,295	6,3	98,2	83	2,98	5,6	99,3	100	43,8	4,2	109,6	67	15	18	83
LAD 04	0,314	1,7	104,8	100	3,29	4,6	109,8	67	40,0	2,5	99,9	100	8	9	89
LAD 05	0,306	0,1	102,0	67	3,03	6,7	101,1	100	41,5	10,6	103,8	100	8	9	89
LAD 06	0,271	0,7	90,4	100	2,86	0,2	95,2	100	36,1	6,5	90,4	67	8	9	89
LAD 07	0,279	7,2	93,0	67	2,83	3,2	94,4	100	37,4	4,0	93,5	67	7	9	78
LAD 08	0,300	2,1	99,9	100	3,06	0,4	101,9	100	37,7	2,2	94,3	100	9	9	100
LAD 09	0,290	4,8	96,6	100	2,99	9,9	99,5	100	34,9	2,0	87,3	67	8	9	89
LAD 10	0,302	6,8	100,5	100	2,92	2,0	97,2	100	37,9	4,9	94,8	100	9	9	100
LAD 11	0,317	0,9	105,7	67	2,95	2,5	98,2	100	35,0	1,4	87,4	100	8	9	89
LAD 14	0,294	8,6	97,9	100	2,86	0,2	95,3	100	39,1	0,1	97,9	100	6	6	100
LRP 01	0,300	2,7	99,9	100	2,97	6,3	98,9	100	39,0	3,2	97,5	100	9	9	100
LRP 02	0,284	5,0	94,6	100	3,03	3,2	100,9	100	39,9	13,1	99,7	67	8	9	89
LRP 03	0,317	6,8	105,5	100	3,08	8,6	102,7	100	38,0	3,2	95,5	100	9	9	100
LRP 04	0,318	3,8	106,1	67	2,94	5,7	97,9	100	40,8	1,9	101,9	67	7	9	78
LRP 05	0,273	9,8	91,0	100	3,00	7,4	100,0	100	36,5	5,5	91,3	100	9	9	100
LRP 06	0,284	0,1	94,7	67	3,03	6,6	101,1	100	41,0	6,8	102,5	100	8	9	89
LRP 07	0,310	4,4	103,3	100	3,17	0,9	105,7	100	42,6	0,4	106,6	67	8	9	89
LRE 01	0,286	4,2	95,3	100	3,15	9,9	105,1	67	38,2	3,0	95,6	67	7	9	78

Tabela 29- Controle de qualidade inter - lote

LISTA	QCA				QCB				QCC				QC TOTAL		
	MÉDIA (µg/mL)	APROV.	TOTAL	% APROV.	MÉDIA (µg/mL)	APROV.	TOTAL	% APROV.	MÉDIA (µg/mL)	APROV.	TOTAL	% APROV.	APROV.	TOTAL	%
LAD 01	0,295	5	6	83	2,98	6	6	100	43,8	4	6	67	15	18	83
LAD 04	0,314	3	3	100	3,29	2	3	67	40,0	3	3	100	8	9	89
LAD 05	0,306	2	3	67	3,03	3	3	100	41,5	3	3	100	8	9	89
LAD 06	0,271	3	3	100	2,86	3	3	100	36,1	2	3	67	8	9	89
LAD 07	0,279	2	3	67	2,83	3	3	100	37,4	2	3	67	7	9	78
LAD 08	0,300	3	3	100	3,06	3	3	100	37,7	3	3	100	9	9	100
LAD 09	0,290	3	3	100	2,99	3	3	100	34,9	2	3	67	8	9	89
LAD 10	0,302	3	3	100	2,92	3	3	100	37,9	3	3	100	9	9	100
LAD 11	0,317	2	3	67	2,95	3	3	100	35,0	3	3	100	8	9	89
LAD 14	0,294	2	2	100	2,86	2	2	100	39,1	2	2	100	6	6	100
LRP 01	0,300	3	3	100	2,97	3	3	100	39,0	3	3	100	9	9	100
LRP 02	0,284	3	3	100	3,03	3	3	100	39,9	2	3	67	8	9	89
LRP 03	0,317	3	3	100	3,08	3	3	100	38,0	3	3	100	9	9	100
LRP 04	0,318	2	3	67	2,94	3	3	100	40,8	2	3	67	7	9	78
LRP 05	0,273	3	3	100	3,00	3	3	100	36,5	3	3	100	9	9	100
LRP 06	0,284	2	3	67	3,03	3	3	100	41,0	3	3	100	8	9	89
LRP 07	0,310	3	3	100	3,17	3	3	100	42,6	2	3	67	8	9	89
LRE 01	0,286	3	3	100	3,15	2	3	67	38,2	2	3	67	7	9	78
MÉDIA (µg/ml)	0,297				3,01				38,9						
CV (%)	5,1				3,9				6,4						
EXATIDÃO (%)	98,9				100,3				97,1						
QC TOTAL		50	56	89,3		54	56	96,4		47	56	83,9	151	168	89,9

A quantidade de amostras de controle de qualidade e o percentual destas em cada uma das listas de amostras dos voluntários aprovadas são apresentados na tabela 30.

Tabela 30- Amostras de controle de qualidade

LOTE DE AMOSTRAS		CONTROLE DE QUALIDADE	
IDENTIFICAÇÃO	QUANTIDADE	TOTAL	%
LAD 01	216	18	8,3
LAD 04	123	9	7,3
LAD 05	123	9	7,3
LAD 06	123	9	7,3
LAD 07	123	9	7,3
LAD 08	120	9	7,5
LAD 09	121	9	7,4
LAD 10	123	9	7,3
LAD 11	123	9	7,3
LAD 14	96	6	6,3
LRP 01	121	9	7,4
LRP 02	123	9	7,3
LRP 03	123	9	7,3
LRP 04	123	9	7,3
LRP 05	123	9	7,3
LRP 06	123	9	7,3
LRP 07	123	9	7,3
LRE 01	123	9	7,3

10.4- Re-análise

Tabela 31- Percentual de re-análise

PERCENTUAL DE RE-ANÁLISE	
TOTAL DE AMOSTRAS DESCONHECIDAS QUANTIFICADAS	1481
AMOSTRAS RE-ANALISADAS	28
PERCENTUAL DE RE-ANÁLISES	1,9%

O percentual de re-análise foi apresentado na tabela 31. As amostras que foram re-analisadas, a razão para a ré-análise, bem como a decisão quanto à definição do valor final, após a re-análise, foram apresentadas na tabela 32.

Tabela 32- Motivos e decisões quanto às re-análises

AMOSTRA	MOTIVO	VALOR ORIGINAL (µg/mL)	TRIPLICATA (µg/ml)			MÉDIA DA TRIPLICATA (µg/mL)	DECISÃO	VALOR FINAL (µg/mL)
			1	2	3			
V002 - P2 - 2:20	a	44,6	26,2	33	28,1	28,1	Média da repetição	28,1
V003 - P1 - 4:00	a	BLOQ	24	26,2	25,4	25,4	Média da repetição	25,4
V015 - P1 - 06:00	a	30,2	20,7	20,4	21,7	20,7	Média da repetição	20,7
V020 - P1 - 12:00	a	28,0	29,9	30	29,9	29,9	Valor original	28,0
V022 - P2 - 06:00	a	35,8	26,7	27,7	25,1	26,7	Média do valor original e repetição	27,2
V025 - P2 - 00:00	b	37	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	Média da repetição	BLOQ
V025 - P2 - 00:30	b	35,6	41	38,9	41,8	41	Média do valor original e repetição	40,0
V025 - P2 - 01:00	b	BLOQ	36,1	38,6	36,2	36,2	Média da repetição	36,2
V025 - P2 - 01:30	b	32,4	30,9	34,8	38,9	34,8	Valor original	32,4
V027 - P1 - 00:00	b	19,2	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	Média da repetição	BLOQ
V027 - P1 - 00:30	b	BLOQ	19	22,4	22,6	22,4	Média da repetição	22,4
V027 - P1 - 01:00	b	19,6	21,8	23,7	24,8	23,7	Média do valor original e repetição	22,8
V005 - P1 - 08:00	a	32,1	20	19,9	20,1	20	Média da repetição	20,0
V005 - P1 - 12:00	a	27,7	19,3	20,7	20,9	20,7	Média do valor original e repetição	20,8
V005 - P2 - 04:30	a	34,6	22,8	23,2	24,1	23,2	Média da repetição	23,2
V005 - P2 - 05:00	a	33,8	20	21,3	22,2	21,3	Média da repetição	21,3
V006 - P1 - 03:00	b	24,4	25,9	23,4	25	25	Valor original	24,4
V006 - P1 - 03:20	a	37,8	25,8	24	25,9	25,8	Média da repetição	25,8
V006 - P1 - 03:40	a	30,5	26,8	24,9	23,8	24,9	Média do valor original e repetição	25,8
V011 - P2 - 03:40	b	19	24,9	26	22,4	24,9	Média da repetição	24,9
V011 - P2 - 04:00	b	33,2	25,6	24,5	22,1	24,5	Média do valor original e repetição	25,0
V011 - P2 - 12:00	a	27,9	22,9	20	21,7	21,7	Média do valor original e repetição	22,3
V011 - P2 - 16:00	a	28,6	21	21,9	21,3	21,3	Média do valor original e repetição	21,6
V011 - P2 - 24:00	a	26,3	18,2	19,9	20,4	19,9	Média do valor original e repetição	20,2
V014 - P2 - 02:20	a	41,4	27,3	25,6	26,7	26,7	Média da repetição	26,7
V033 - P1 - 01:00	b	35,5	40,8	40,7	41,4	40,8	Valor original	35,5
V033 - P1 - 01:30	b	17,1	31,5	37,8	39,9	37,8	Média da repetição	37,8
V033 - P1 - 02:00	b	22,4	37,6	32,6	35,1	35,1	Média da repetição	35,1

a – Área do PI apresentando um valor aberrante

b – Razões farmacocinéticas

BLOQ – Abaixo do LOQ

V – N ° do Voluntário (001 a 036)

P – Período do estudo (1 ou 2).

10.5- Determinação da concentração de clorpropamida

Os valores da concentração plasmática de clorpropamida de todos os 36 voluntários, nos 21 tempos de coleta, estão apresentados nas tabelas 33 a 38. Os valores de concentração abaixo do BLOQ são considerados como sendo zero, para fins de tratamento estatístico.

Tabela 33- Concentração plasmática de clorpropamida, em µg/mL, dos voluntários 01 ao 06

VOLUNTÁRIO	01		02		03		04		05		06	
HORÁRIO (h)	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
0:00	BLOQ	0,103	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ
0:30	0,473	25,5	30,8	35	43,2	28,4	8,62	6,46	34,6	27,3	46,4	8,15
1:00	2,94	31,2	28,3	28,8	30,3	32,5	18	20,8	29,9	25	34,2	29,6
1:30	5,34	29,9	28,6	29	30,5	27,4	26	23,3	31,5	28,7	32	31,6
2:00	6,32	27,4	31,4	27,2	31,1	29	29,1	24,3	28,3	26	30,4	29,1
2:20	7,79	28,6	32,7	28,1	29,7	28,4	23,4	24,2	28,5	27,2	33,7	27,7
2:40	7,74	26,2	32,4	32,7	29,4	27,5	20,7	21,7	25,5	23,8	29,7	25,8
3:00	7,5	22,5	27,8	27,5	28,7	26,9	22,4	24,2	24,1	24,6	24,4	25,9
3:20	7,66	24,4	28,3	24,8	25,4	28,1	22,7	25,8	23,2	23,8	25,8	24,4
3:40	7,95	22,4	29,9	24,7	27,4	25,5	22,5	24,2	23,7	22,9	25,8	27,3
4:00	8,94	22,1	27,2	25,1	25,4	26,3	21,7	21,8	24,6	22,1	27,8	30
4:30	8,19	22,7	26,1	27	27,7	25,5	24,6	21,4	21,3	23,2	24,6	28,7
5:00	8,94	24,3	28,3	26,7	27	25,4	25,3	20,5	24,4	21,3	26,4	26
6:00	7,73	24	26,7	26,5	24,8	23,8	22,2	22,9	24	27,3	25,8	24,1
8:00	6,93	23,4	25,2	25,6	25,6	22,7	20,7	26,2	20	20,7	26,6	24,6
12:00	7,85	22,3	24,3	25,6	23,6	22	21	22,9	20,8	18,6	22,5	21,7
16:00	6,7	19,9	24,6	20,7	19,3	19,8	20,6	18,9	18	15,2	22	18,2
24:00	6,32	19,4	22,4	19,8	19,3	18,3	15,9	15,7	14,4	13,9	20,3	16,1
36:00	6,35	17,1	18,5	16,7	15,9	14,9	16,1	16	11,6	10,2	19,2	15,5
48:00	5,84	19,8	16,7	13,3	12,8	13,5	13,3	12	9,74	8,06	N/A	12,6
72:00	4,16	13,6	12,2	10,2	9,27	8,4	7,74	7,22	5,68	4,72	9,49	N/A

Concentração plasmática de clorpropamida nas amostras dos voluntários 01, 02, 03, 04, 05 e 06, nos períodos I e II, em função do horário de coleta.

Tabela 34- Concentração plasmática de clorpropamida, em µg/mL, dos voluntários 07 ao 12

VOLUNTÁRIO	07		08		09		10		11		12	
HORÁRIO (h)	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
0:00	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	0,11	BLOQ	BLOQ
0:30	31,8	19,3	27,9	7,41	35	18,3	21,5	32,9	30,8	8,4	12,8	10,3
1:00	26,1	26,5	34,3	23,8	31,1	26,2	21,9	27,6	28,2	12,1	21,4	28
1:30	25,5	25,5	30,2	27,7	29,1	23,2	27,8	25,5	29,7	23,4	20,4	30,5
2:00	24,3	27,4	29,7	27,1	27	25,6	25,8	27,8	28,9	27,4	23,8	24,3
2:20	25	28,1	27,8	26,9	24,8	26,2	27,1	29,2	28,3	28	28,5	26,1
2:40	26,8	23,4	26,5	23,1	22,8	23,2	24,6	28,6	30,1	23,3	24	24,3
3:00	29,7	22	26,8	24,3	24,7	22,5	25,8	25,4	23,9	28,1	23,8	20,6
3:20	28,3	22,3	27	25	23,1	20	22,8	25,6	21,6	23,3	21,8	21,6
3:40	23,1	22,1	28,9	25,5	21,9	23	22,5	26,7	22,6	24,9	19,7	20,5
4:00	25,3	21,8	27	28,2	22,8	22,4	23,2	27,8	27,4	25	18,1	20,4
4:30	21,9	22,8	27,2	26,5	21,6	19,9	21,5	28,9	26,7	27,4	18,4	22,4
5:00	24,7	22,7	26,7	25	27,6	21,9	21	29,2	27,1	24,7	18,3	23,1
6:00	21	22,9	23,1	28	22,4	21,3	21,8	29,8	31,8	23,8	21,3	23,8
8:00	18,3	22,1	23,5	24,1	21,4	19,3	19,8	31	22,3	20,9	18,4	24
12:00	19,2	19,1	23,9	24,2	20,5	17,2	19,3	19,8	22,6	22,3	20,4	20,4
16:00	15,5	16	20	19,7	18,8	17,8	18,4	19,9	20,8	21,6	17,6	18,3
24:00	15,8	13,4	17,4	18,4	14,8	16,9	18,2	19,2	18,9	20,2	16,1	18,9
36:00	12,2	12,6	17,1	15,8	14,8	14,1	16,3	22	15,8	21,4	16,8	14,8
48:00	9,12	9,53	12,9	13	12,8	11,6	13,3	13,5	17,4	14,5	12,8	10,9
72:00	5,67	5,48	8,81	8,37	8,97	6,73	8,22	10,6	16	12,1	8,98	7,1

Concentração plasmática de clorpropamida nas amostras dos voluntários 07, 08, 09, 10, 11 e 12, nos períodos I e II, em função do horário de coleta.

Tabela 35- Concentração plasmática de clorpropamida, em µg/mL, dos voluntários 13 ao 18

VOLUNTÁRIO	13		14		15		16		17		18	
HORÁRIO (h)	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
0:00	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ
0:30	11,6	19,4	28,4	24	15	28,2	22	17,6	21,4	20,2	40,4	33,2
1:00	18,2	26,7	28,2	27,4	20,5	26,7	22,9	29,3	25,2	25,9	30,2	36
1:30	22,7	25,4	24,1	32,9	24,2	24,7	24	28,9	34,3	28	29,6	29,5
2:00	27,1	24,7	26,4	29,2	24	24,8	24,3	32,1	34,5	38,9	27,9	28,7
2:20	28,6	26,6	29,5	26,7	23,8	24,5	24,8	30,4	32	33,6	26,2	28,7
2:40	24,7	23,4	23,8	23,7	21	21,8	24,1	26,8	29,3	31,5	26,3	27,4
3:00	23,8	22,6	22,9	25	21,5	21,6	26,7	28	30,4	30,8	25,7	26,6
3:20	23,1	22,4	21,8	24,5	21,8	22,4	23,5	27,5	31,4	30,8	24,5	26,5
3:40	22,4	23	23,9	24,3	20,9	24,4	24,6	27,1	31,2	30,6	25,1	27
4:00	22,6	26,6	23,3	30,6	21,1	28,8	25,3	27,8	32	31,2	23,8	28,4
4:30	22,2	22,4	23	25,8	25,2	22,6	26,4	24,8	33,8	34,6	24	25,9
5:00	23,1	21,3	24,5	22,9	22,7	24,4	27,1	28,7	32	33,1	24,1	27,5
6:00	21,1	20,7	25,6	19,2	20,7	20,3	24,6	25,4	31	29,2	24,9	24,1
8:00	22	20,4	22,9	15,8	21,3	18,7	23,5	26,3	29,2	29	23,7	21,5
12:00	18,4	22,4	20,1	22,4	20,4	19,7	22,6	26,4	27,1	27,3	20,7	22
16:00	15,8	19	16,4	17,8	16,5	16,5	19,6	20,4	24,3	22,7	18,7	18,8
24:00	16,3	14,8	17	21,8	15,8	16,2	18,3	19,8	22,3	22	17	17,5
36:00	14,3	14,2	20,1	17,6	14,9	15,3	17,7	17,3	21,7	20,3	15,8	18,4
48:00	12,1	12,4	14,4	14,5	12,4	11,7	14	14,1	16,3	16,2	13,7	13,4
72:00	8,73	7,97	10,5	9,21	8,22	7,85	10,2	10,5	12,5	10,7	10,3	9,54

Concentração plasmática de clorpropamida nas amostras dos voluntários 13, 14, 15, 16, 17 e 18, nos períodos I e II, em função do horário de coleta.

Tabela 36- Concentração plasmática de clorpropamida, em µg/mL, dos voluntários 19 ao 24

VOLUNTÁRIO	19		20		21		22		23		24	
HORÁRIO (h)	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
0:00	BLOQ	LOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	Drop-out	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	LOQ
0:30	10	7,74	19,7	21,2	20,5	Drop-out	35	6,44	46,4	48,9	7,96	37,3
1:00	15,2	24,6	21,4	21,6	25,1	Drop-out	27	31,7	38,2	41,6	14,9	35,4
1:30	16,4	26	22,4	28,8	32,2	Drop-out	30	30,1	33,5	32,8	27,8	34,1
2:00	20,6	24,9	29,6	33,8	29,4	Drop-out	27	26,8	32,4	30,8	32,2	31,8
2:20	30,8	25,2	29,2	41,2	29,8	Drop-out	27,6	29,6	38,4	36,6	32,9	37,1
2:40	26,3	23,5	25,9	35,1	27,3	Drop-out	24,9	35,3	31,3	33,2	30,9	31,3
3:00	24,1	26,9	24,8	32,9	29,2	Drop-out	24,2	31	33,4	30,3	31,3	28,1
3:20	24,9	25,3	25,6	34,6	25,3	Drop-out	23,2	25,4	30,8	32,1	29,4	27,3
3:40	23,5	25,5	24,9	31,5	26,9	Drop-out	21,6	27,2	31,3	33,6	34	28,6
4:00	26	23,6	28,6	30,2	27,6	Drop-out	24,5	24,7	29,4	29,9	29,2	27,8
4:30	25,2	22,5	31,4	31,1	29	Drop-out	22,1	27	29,5	29,8	28,3	27,6
5:00	25,2	24,8	30,1	32,6	29	Drop-out	23,1	27	30,7	31,3	30,6	27
6:00	24,5	23,2	26,3	27,6	27	Drop-out	21,2	27,2	30,2	25,2	28,6	25,1
8:00	23,7	21,8	23,2	31	28,8	Drop-out	21,6	26,5	28,8	21,5	28,4	26,5
12:00	22,2	21	28	27,6	26,1	Drop-out	19,2	20,2	27,4	23,8	26,8	21,5
16:00	21,4	19,7	21,7	22,9	21,4	Drop-out	16,5	18,4	21,7	19,1	23,4	21
24:00	17,8	16,6	21,4	24	21,9	Drop-out	16,6	15,6	19	18,8	20,7	18
36:00	16,7	11,8	16,9	21	16,1	Drop-out	11,4	14,1	14,9	12,4	17,4	14,9
48:00	9,98	9,43	13,7	17,2	12,9	Drop-out	10,4	11,3	10,3	9,75	N/A	N/A
72:00	7,73	6,22	9,6	11,3	N/A	Drop-out	5,94	5,57	6,45	5,22	9,65	N/A

Concentração plasmática de clorpropamida nas amostras dos voluntários 19, 20, 21, 22, 23 e 24, nos períodos I e II, em função do horário de coleta.

Tabela 37- Concentração plasmática de clorpropamida, em µg/mL, dos voluntários 25 ao 30

VOLUNTÁRIO	25		26		27		28		29		30	
HORÁRIO (h)	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
0:00	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ
0:30	48	40	8,81	9,23	22,4	35,2	40,7	34,7	15,8	44	7,45	33,6
1:00	40,9	36,2	20,2	27,4	22,8	30,2	31,4	28,4	41,6	44,7	19,7	29
1:30	35,8	32,4	20,5	25,6	20,3	33,5	29	28,6	42,6	47,5	34	30,1
2:00	34,2	32,6	20,6	23,8	31,2	33,6	27,2	28,6	41,8	47	29,3	27
2:20	33,1	34,7	24,2	24,2	35,3	34,4	29,6	32,1	48,4	44,4	30,8	28,8
2:40	32,1	29,2	19,1	23	31,1	32,4	29,3	28,4	39,8	40,7	26,7	30
3:00	33,3	29,2	21	20,7	30,2	27,2	26,4	29,2	38,3	43,2	28,7	25,5
3:20	30	28,4	20,7	21,5	29,5	31,3	26,3	24,6	38,3	40,6	28,4	24,4
3:40	31,5	27,2	22,1	22,1	28,9	30,8	27,3	27,1	35,3	39,2	26,9	24,3
4:00	31,9	27,7	20,4	20	29,2	30,2	25	28,5	39,6	38,4	28,2	25,5
4:30	30,3	29,2	20,4	20,4	28	30,8	25,7	26,3	36,2	41,6	28,2	30,2
5:00	30,3	26,9	20,1	20,5	28,6	30,6	25	27,5	43,9	41,4	28,9	23,8
6:00	28,4	25	19,9	20,4	28,1	28,3	24,9	25,1	36,5	34,7	28,1	26,7
8:00	27,2	21,8	18,4	16,8	27,8	27	21,2	19,9	33,9	32,4	29,2	23,4
12:00	24,6	21,4	16,4	17,7	25,1	27,2	22,2	19,9	32,2	30,7	24,8	22,6
16:00	21,7	17,9	14	13,8	22,1	22,1	18,7	17,5	27,9	28,8	20,2	18,7
24:00	20,1	15	12	11,5	19,3	20	17,2	17,9	23,6	24,5	18,6	19,5
36:00	15,7	12,7	7,39	7,92	14,9	16,9	14,4	13,3	23,5	21,4	17,4	16,2
48:00	14,7	10,6	N/A	N/A	11,7	12,6	12,6	10,7	15,6	18	14,1	13
72:00	8,33	6,74	3,42	3,28	7,45	8,77	8,09	5,72	12,5	12,9	10	9,25

Concentração plasmática de clorpropamida nas amostras dos voluntários 25, 26, 27, 28, 29 e 30, nos períodos I e II, em função do horário de coleta.

Tabela 38- Concentração plasmática de clorpropamida, em µg/mL, dos voluntários 31 ao 36

VOLUNTÁRIO	31		32		33		34		35		36	
HORÁRIO (h)	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
0:00	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ
0:30	29,2	24	13,2	35	12,9	10,2	12,6	20,3	33,4	7,7	22,6	34,8
1:00	29,8	23,5	26,6	33,5	35,5	28,3	21,3	23,2	35,2	12,7	30,3	31,7
1:30	31,9	23,2	29,5	29,2	37,8	32,2	23,2	24,2	34,2	15,4	36	29,1
2:00	28,4	23	28,7	29,9	35,1	31,9	31	29	41,3	18,7	33,8	30,4
2:20	31,5	30	30,6	31,9	30,1	33,9	34,7	34,1	38,6	27,4	33,5	31,9
2:40	28,5	26,8	30,6	28,2	30,6	32,9	28,8	31,5	30,9	25,7	30,5	28,1
3:00	27,3	27,2	27,1	27,4	31,5	29,8	30,4	30,7	32,4	27,5	31	29,5
3:20	26,2	25,8	28,2	26,8	28,8	29,7	27,3	30,6	29,7	25,3	28,4	27,2
3:40	26,3	23,7	29,4	25,2	29,2	28,4	25	28,3	28,6	26,7	25,4	25,9
4:00	27	24,1	26,8	29,1	34	28,5	27,1	27,5	25,2	28,8	28,2	27,6
4:30	25,8	22,7	28	27,4	27,4	28,7	28,4	27,6	27,6	24,6	29,7	24,9
5:00	26,4	25	26	25,8	30,7	30,1	25,8	29,9	29,6	23,5	27,8	24,1
6:00	25,5	21,3	28,2	25,3	25,3	26,8	30,2	24,6	25,1	22,8	26,7	23,9
8:00	24,3	21	24,2	21,7	26,3	26,7	25,4	25,2	25,1	22	27,1	24
12:00	24,7	19,9	21,8	18,3	23,9	23,3	24,8	27,2	22,6	19,7	26,5	23,1
16:00	20,2	16,9	20,4	19,4	21,7	20,1	22,1	23,7	19,9	17,4	26,6	22,1
24:00	18,1	14,8	18	9,16	19,1	19,1	23,9	19,2	19,4	21	22,3	19,8
36:00	12,4	11,5	12,2	8	16,4	15,8	20,2	17,8	16,4	13,6	18	17,1
48:00	9,15	8,33	9,35	7,19	11,6	11,9	17,7	15,1	11,9	10,5	16	N/A
72:00	5,77	4,2	4,59	3,03	7,5	7,57	13,5	11,5	5,73	6,32	11,8	N/A

Concentração plasmática de clorpropamida nas amostras dos voluntários 31, 32, 33, 34, 35 e 36, nos períodos I e II, em função do horário de coleta.

11- Fase estatística

11.1- Concentração plasmática Média x Tempo

As figuras 1 e 2 apresentam os gráficos da concentração plasmática média x tempo, para a formulação teste e referência, sem e com a transformação logarítmica dos dados.

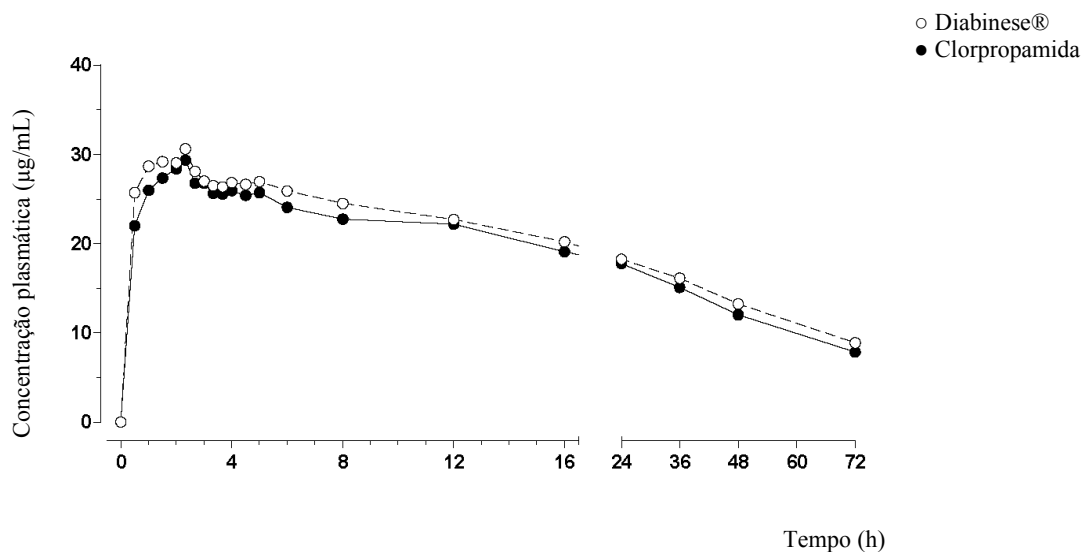


Figura 1- Dados normais (sem transformação logarítmica)

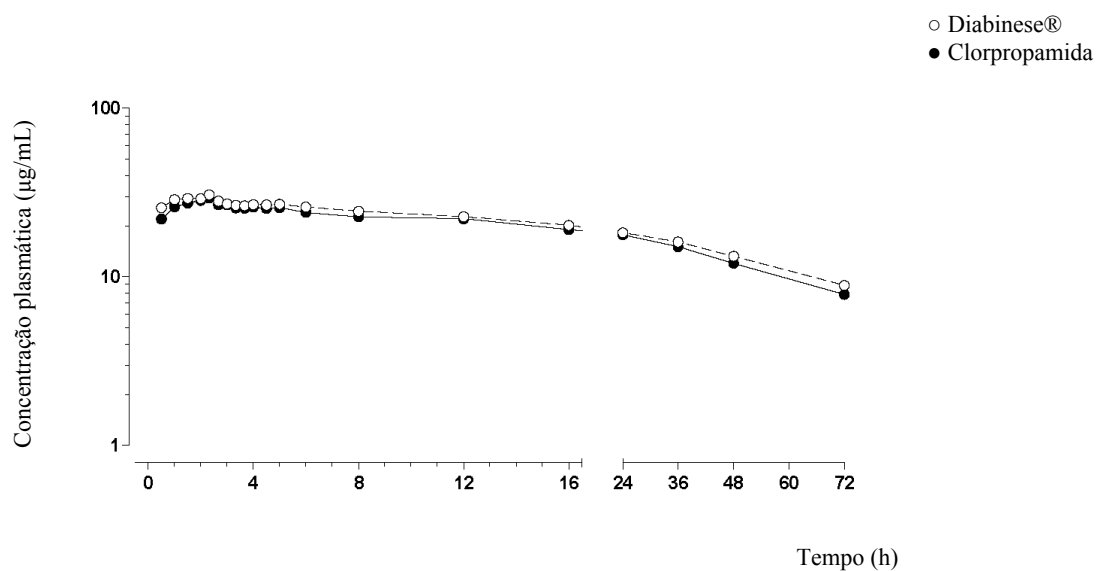


Figura 2- Dados com transformação logarítmica

11.2- Parâmetros farmacocinéticos

Tabela 39- Parâmetros farmacocinéticos

VOLUNTÁRIO	FORMULAÇÃO REFERÊNCIA					FORMULAÇÃO TESTE				
	T _{max}	C _{max}	ASC _{0-72h}	PERÍODO	SEQUÊNCIA	T _{max}	C _{max}	ASC _{0-72h}	PERÍODO	SEQUÊNCIA
1	1,00	31,20	1362,99	2	T-R	4,00	8,94	431,52	1	T-R
2	2,33	32,70	1402,41	1	R-T	0,50	35,00	1247,79	2	R-T
3	1,00	32,50	1154,82	2	T-R	0,50	43,20	1201,96	1	T-R
4	2,00	29,10	1096,00	1	R-T	8,00	26,20	1074,19	2	R-T
5	1,50	28,70	854,60	2	T-R	0,50	34,60	948,35	1	T-R
6	0,50	46,40	1313,28	1	R-T	1,50	31,60	864,30	2	R-T
7	2,33	28,10	913,40	2	T-R	0,50	31,80	923,54	1	T-R
8	1,00	34,30	1182,13	1	R-T	4,00	28,20	1158,06	2	R-T
9	0,50	35,00	1091,32	1	R-T	1,00	26,20	1005,25	2	R-T
10	0,50	32,90	1302,60	2	T-R	1,50	27,80	1113,09	1	T-R
11	6,00	31,80	1355,57	1	R-T	3,00	28,10	1296,96	2	R-T
12	1,50	30,50	1060,54	2	T-R	2,33	28,50	1077,84	1	T-R
13	1,00	26,70	1051,53	2	T-R	2,33	28,60	1036,28	1	T-R
14	2,33	29,50	1208,48	1	R-T	1,50	32,90	1203,60	2	R-T
15	4,00	28,80	1040,27	2	T-R	4,50	25,20	1044,51	1	T-R
16	5,00	27,10	1211,53	1	R-T	2,00	32,10	1270,04	2	R-T
17	2,00	34,50	1471,76	1	R-T	2,00	38,90	1414,64	2	R-T
18	1,00	36,00	1200,41	2	T-R	0,50	40,40	1174,78	1	T-R
19	2,33	30,80	1085,59	1	R-T	3,00	26,90	972,85	2	R-T
20	2,33	41,20	1473,42	2	T-R	4,50	31,40	1262,07	1	T-R
22	2,67	35,30	1036,00	2	T-R	0,50	35,00	962,66	1	T-R
23	0,50	46,40	1173,57	1	R-T	0,50	48,90	1057,87	2	R-T
24	0,50	37,30	760,30	2	T-R	3,67	34,00	1300,21	1	T-R
25	0,50	48,00	1279,17	1	R-T	0,50	40,00	1028,88	2	R-T
26	1,00	27,40	696,63	2	T-R	2,33	24,20	684,73	1	T-R
27	0,50	35,20	1261,03	2	T-R	2,33	35,30	1169,24	1	T-R
28	0,50	40,70	1115,59	1	R-T	0,50	34,70	1023,92	2	R-T
29	1,50	47,50	1645,25	2	T-R	2,33	48,40	1597,62	1	T-R
30	1,50	34,00	1251,93	1	R-T	0,50	33,60	1190,40	2	R-T
31	1,50	31,90	1036,06	1	R-T	2,33	30,00	883,96	2	R-T
32	0,50	35,00	785,95	2	T-R	2,33	30,60	1004,87	1	T-R
33	2,37	33,90	1162,81	2	T-R	1,50	37,80	1182,18	1	T-R
34	2,33	34,70	1447,02	1	R-T	2,33	34,10	1322,37	2	R-T
35	4,00	28,80	1024,41	2	T-R	2,00	41,30	1154,28	1	T-R
36	1,50	36,00	1407,16	1	R-T	0,50	34,80	782,92	2	R-T

Na tabela 39 apresentamos os parâmetros farmacocinéticos, $T_{\max}$, $C_{\max}$ e ASC_{0-72h} , de todos os 35 voluntários que participaram da fase estatística do estudo, determinados para a formulação referência e teste.

11.3- Estatística descritiva dos parâmetros farmacocinéticos

Na tabela 40 apresentamos a estatística descritiva dos parâmetros farmacocinéticos, $T_{\max}$, $C_{\max}$ e ASC_{0-72h} , de todos os 35 voluntários que participaram da fase estatística do estudo, determinados para a formulação referência e teste.

Tabela 40- Estatística descritiva

	$T_{\max}$		$C_{\max}$		ASC_{0-72h}	
	REFERÊNCIA	TESTE	REFERÊNCIA	TESTE	REFERÊNCIA	TESTE
N	35	35	35	35	35	35
MÉDIA	2,05	1,76	32,84	34,28	1087,65	1169,02
DEVIO PADRÃO	1,62	1,33	7,34	5,83	213,50	214,45
ERRO PADRÃO	0,27	0,22	1,24	0,99	36,09	36,25
VARIÂNCIA	2,61	1,76	53,83	33,97	45581,22	45990,61
MÍNIMO	0,50	0,50	8,94	26,70	431,52	696,63
MEDIANA	2,00	1,50	32,90	33,90	1077,84	1173,57
MÁXIMO	8,00	6,00	48,90	48,00	1597,62	1645,25
INTERVALO	7,50	5,50	39,96	21,30	1166,10	948,62
CV %	78,78	75,54	22,34	17,00	19,63	18,34
MÉDIA GEOMÉTRICA	1,50	1,36	31,81	33,84	1063,33	1148,66
HARMÔNICA	1,07	1,05	30,26	33,44	1032,26	1126,82
MÉDIA Log	0,41	0,30	3,46	3,52	6,97	7,05
DEVIO PADRÃO Log	0,84	0,74	0,28	0,16	0,23	0,19

11.4- Média das razões T/R

As figuras 3 e 4 apresentam graficamente os dados da Razão T/R respectivamente para $C_{\max}$ e ASC_{0-72h} de todos os 35 voluntários que participaram da fase estatística do estudo.

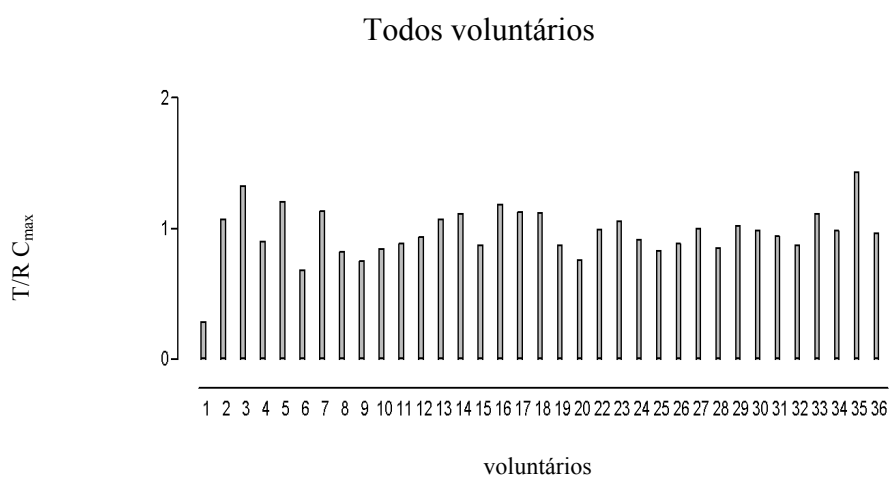


Figura 3- Razão T/R para $C_{\max}$

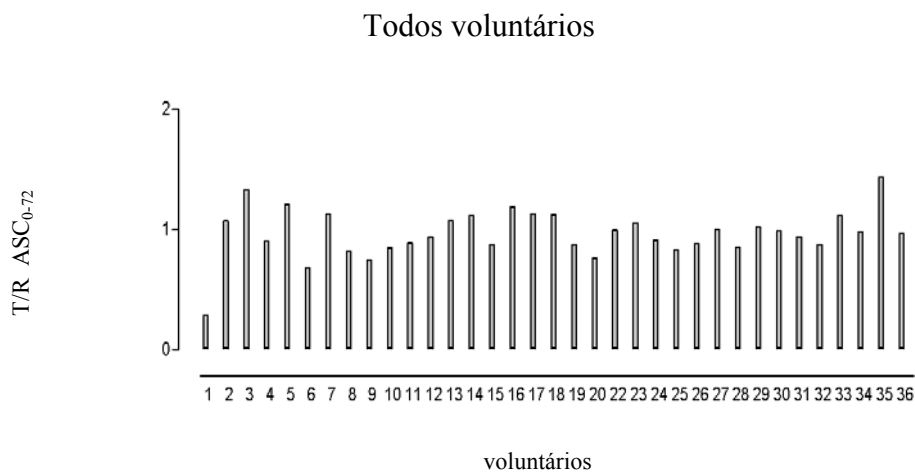


Figura 4- Razão T/R para ASC_{0-72h}

11.5- Razão (T/R)

Tabela 41- Razão teste/referência

VOLUNTÁRIO	C _{max}		ASC _{0-72h}	
	(TESTE/REFERENCIA)	[LOG(TESTE/REFERENCIA)]	(TESTE/REFERENCIA)	[LOG(TESTE/REFERENCIA)]
1	0,29	-1,25	0,32	-1,15
2	1,07	0,07	0,89	-0,12
3	1,33	0,28	1,04	0,04
4	0,90	-0,10	0,98	-0,02
5	1,21	0,19	1,11	0,10
6	0,68	-0,38	0,66	-0,42
7	1,13	0,12	1,01	0,01
8	0,82	-0,20	0,98	-0,02
9	0,75	-0,29	0,92	-0,08
10	0,84	-0,17	0,85	-0,16
11	0,88	-0,12	0,96	-0,04
12	0,93	-0,07	1,02	0,02
13	1,07	0,07	0,99	-0,01
14	1,12	0,11	1,00	0,00
15	0,88	-0,13	1,00	0,00
16	1,18	0,17	1,05	0,05
17	1,13	0,12	0,96	-0,04
18	1,12	0,12	0,98	-0,02
19	0,87	-0,14	0,90	-0,11
20	0,76	-0,27	0,86	-0,15
22	0,99	-0,01	0,93	-0,07
23	1,05	0,05	0,90	-0,10
24	0,91	-0,09	1,71	0,54
25	0,83	-0,18	0,80	-0,22
26	0,88	-0,12	0,98	-0,02
27	1,00	0,00	0,93	-0,08
28	0,85	-0,16	0,92	-0,09
29	1,02	0,02	0,97	-0,03
30	0,99	-0,01	0,95	-0,05
31	0,94	-0,06	0,85	-0,16
32	0,87	-0,13	1,28	0,25
33	1,12	0,11	1,02	0,02
34	0,98	-0,02	0,91	-0,09
35	1,43	0,36	1,13	0,12
36	0,97	-0,03	0,56	-0,59

Na tabela 41 apresentamos os valores da razão dos parâmetros farmacocinéticos $C_{\max}$ e ASC_{0-72h} , entre a formulação teste e a referência, com e sem a transformação logarítmica para todos os 35 voluntários que participaram da fase estatística do estudo, determinados para a formulação referência e teste.

11.6- Avaliação da bioequivalência

A tabela 42 apresenta a média geométrica da razão das formulações teste/referência, o intervalo de confiança (90%), o poder e o coeficiente de variação intra-sujeito para a ASC_{0-72h} e $C_{\max}$. Os dados foram apresentados para todos os voluntários que participaram da fase estatística do estudo (n=35), e por gênero separadamente, mulheres (n=17) e homens (n=18).

Tabela 42- Tratamento estatístico da razão teste/referência para ASC e $C_{\max}$

TESTE/REF.	PARÂMETRO (N=35)			
	MÉDIA GEOM.	90% IC	PODER	INTRA-SUJEITO CV (%)
ASC_{0-72h} RAZÃO	92,45	85,95 - 99,44	0,9983	19,47%
$C_{\max}$ RAZÃO	93,99	87,11 - 101,41	0,9970	19,97%

TESTE/REF.	HOMEM - PARÂMETRO (N=18)			
	MÉDIA GEOM.	90% IC	PODER	INTRA-SUJEITO CV (%)
ASC_{0-72h} RAZÃO	90,15	79,96 - 101,63	0,9240	22,84%
$C_{\max}$ RAZÃO	92,15	79,68 - 106,56	0,8183	27,10%

TESTE/REF.	MULHER - PARÂMETRO (N=17)			
	MÉDIA GEOM.	90% IC	PODER	INTRA-SUJEITO CV (%)
ASC_{0-72h} RAZÃO	94,54	86,98 - 102,76	0,9949	14,64%
$C_{\max}$ RAZÃO	95,87	90,24 - 101,86	0,9999	10,49%

O estudo foi finalizado com 35 voluntários proporcionando um CV% intra-sujeito de 19,47% e 19,97 %, respectivamente para ASC_{0-72h} e C_{max} . O poder foi de 0,9983 e 0,9970 respectivamente para ASC_{0-72h} e C_{max} . A média geométrica foi de 92,45 e 93,99 respectivamente para ASC_{0-72h} e C_{max} . O intervalo de confiança de 90% foi de 85,95-99,44 e 87,11-101,41 respectivamente para ASC_{0-72h} e C_{max} . O relatório emitido pelo programa estatístico foi apresentado no anexo XV.

6- DISCUSSÃO

Com a análise dos dados demográficos apresentados no quadro 16 podemos verificar que estes estão em concordância com os limites estabelecidos no protocolo clínico. Estes dados apresentam média de 29 anos para a idade, 1,64 m para a altura, 63,72 Kg para o peso e 23,54 Kg/m² para o IMC dos voluntários, com desvio padrão de 8,94, 0,08, 7,17 e 1,72 respectivamente. A média do IMC determinada para todos os voluntários, n=36, não difere significativamente da calculada separadamente por gênero que foi respectivamente para o sexo masculino e feminino 23,32 e 23,76 Kg/m². Entretanto podemos observar que o desvio padrão dos dados dos voluntários do sexo masculino é maior que o dos voluntários do sexo feminino 1,82 e 1,64, respectivamente (tabela 10). Estes resultados são similares aos encontrados para o CV% intra-sujeito, que também foi maior para os voluntários do sexo masculino (tabela 42). O efeito do gênero na farmacocinética da clorpropamida não foi especificamente estudado anteriormente. No presente estudo relatamos uma diferença marcante na variação intra-sujeito, quando os dados são apresentados separadamente por gênero. O CV% intra-sujeito para a razão T/R de ASC₀₋₇₂ e C_{max} foram respectivamente 19,47% e 19,97% quando consideramos os dados de todos os voluntários inclusos na fase estatística do estudo (n=35). Quando os dados foram tratados separadamente por gênero os valores do CV% intra-sujeito para a razão T/R de ASC₀₋₇₂ e C_{max} foram respectivamente, 22,84% e 27,10%, para os homens (n=18) e foram respectivamente, 14,64% e 10,49%, para as mulheres (n=17). Esta diferença não influencia os resultados da avaliação de bioequivalência, quando são considerados os dados dos voluntários de ambos os sexos, entretanto quando consideradas as informações referentes a cada gênero separadamente observamos diferença significativa entre sexos.

Cada voluntário foi aleatoriamente alocado na seqüência de tratamento (TR ou RT). Apresentamos a lista de aleatorização no quadro 17. A aleatorização é uma ferramenta estatística fundamental na validação de um estudo de bioequivalência. Inferências estatísticas válidas são normalmente baseadas na suposição de que os erros do modelo estatístico empregado são variáveis aleatórias independentemente distribuídas, o que pode ser garantido pela correta aleatorização.

A tolerância a ambas as formulações foi boa. Cefaléia e náuseas são efeitos adversos esperados com o uso de um fármaco hipoglicemiante administrado em jejum de 8,5 horas que perdurou por 2 horas após a medicação (quadro 18).

O voluntário que foi excluído do estudo relatou ter tido diarreia acompanhada de distensão abdominal, antes da administração da medicação referente ao segundo período. Este evento foi classificado, pelo investigador médico, como não sério de intensidade moderada e não relacionado com a terapia sob investigação. A conduta médica foi tratamento farmacológico, devidamente registrado no campo apropriado do FRC, não sendo necessário nenhum exame complementar.

Os exames clínicos, sorológicos, dosagens bioquímicas e urinálise realizados nos voluntários, ao final da fase clínica, não revelaram alterações clínicas relevantes em relação aos realizados antes do internamento. Podemos visualizar isto graficamente no anexo IV.

Conforme procedimento, adotado em pesquisas clínicas, de não publicação de estudos que não foram previamente aprovados por um comitê de ética, no anexo V, apresentamos cópia do documento que ratifica a aprovação do nosso estudo.

Encontramos valores de C_{max} e T_{max} similares aos encontrados por outros autores, respectivamente 34,28 $\mu\text{g/mL}$ e 1,76 min, levando-se em conta as possíveis diferenças inerentes à sensibilidade dos métodos empregados por eles. James Taylor, em 1972, tendo como matriz plasma e empregando *Thin Layer Chromatography* (TLC), obteve valores para C_{max} e T_{max} , respectivamente de 28,5 $\mu\text{g/mL}$ e 3,0 min, em um estudo com 6 voluntários. Monro e Welling, em 1974, tendo como matriz soro e empregando TLC, obtiveram valores para C_{max} e T_{max} , respectivamente de 35,75 $\mu\text{g/mL}$ e 3,5 min, em um estudo também com 6 voluntários. Taylor e colaboradores, em 1977, também empregando plasma como matriz, obtiveram valores para C_{max} e T_{max} , respectivamente de 29,7 $\mu\text{g/mL}$ e 3,0 min, empregando GC e contando também com 6 voluntários. Evans e colaboradores, em 1979, empregando soro como matriz, obtiveram valores para C_{max} e T_{max} , respectivamente de 32,5 $\mu\text{g/mL}$ e 4,2 min, empregando GC e contando com 9 voluntários. Batenhorst e colaboradores, em 1982, empregando soro como matriz, obtiveram valores para C_{max} e T_{max} , respectivamente de 30,3 $\mu\text{g/mL}$ e 3,5 min, empregando HPLC e contando com 18 voluntários.

Na tabela 43 apresentamos sucintamente os dados da literatura revisada.

Tabela 43- Referências – Fase clínica

REFERÊNCIA	MATRIZ	MÉTODO/DETECÇÃO	C _{max}	T _{max}	N
Silva MA <i>et al</i> , 2007	Plasma	LC/MS/MS	34,28	1,76	35
Taylor T <i>et al</i> , 1977	Plasma	GC	29,7	3,0	6
Taylor JA <i>et al</i> , 1972	Plasma	TLC	28,5	3,0	6
Evans M <i>et al</i> , 1979	Soro	GC	32,5	4,2	9
Batenhorst <i>et al</i> , 1982	Soro	HPLC	30,3	3,5	18
Monro e Welling, 1974	Soro	TLC	35,75	3,5	6

N: n° de voluntários

A fase clínica do estudo proporcionou resultados satisfatórios, sem perda de amostras que pudessem comprometer as fases subseqüentes. A exclusão de um voluntário não comprometeu o tratamento estatístico e os dados dos 35 voluntários, que participaram dos dois períodos do estudo, foram submetidos à fase estatística. A fase clínica foi satisfatoriamente encerrada com a alta de todos os 36 voluntários, cujos exames de alta foram realizados a contento e com resultados satisfatórios.

Os certificados de análise do analito e do PI foram apresentados com o objetivo de documentar a identidade e o teor das SQR empregadas no estudo, como preconizado pelas BPL e legislação da Anvisa vigentes no país (anexo VI e VII). Na avaliação de bioequivalência ambas as formulações sob investigação são submetidas às mesmas condições analíticas e, portanto os resultados de ambas estão sujeitos aos mesmos interferentes, no que diz respeito às substâncias de referência e reagentes empregados nas análises. Portanto para a qualidade dos dados, em relação à comparação de parâmetros farmacocinéticos nos ensaios de bioequivalência, o grau de pureza dos padrões e reagentes não tem o mesmo grau de importância que tem para as determinações quantitativas de princípio ativo em formulações farmacêuticas ou dosagens bioquímicas, por exemplo. Todos os ensaios foram realizados em laboratórios certificados pelos órgãos oficiais competentes e, portanto adotamos as BPL rotineiramente.

O uso de métodos analíticos satisfatoriamente seletivos e sensíveis para a avaliação qualitativa e quantitativa de fármacos e de seus metabólitos são pontos críticos para a condução eficaz dos ensaios pré-clínicos e/ou biofarmacêuticos nos estudos de farmacologia clínica. A condição imprescindível para alcançarmos sucesso nestes estudos é o uso de métodos bioanalíticos apropriadamente validados. A sensibilidade está associada com a capacidade de o método discriminar entre diversos teores semelhantes e depende da inclinação da curva de calibração. Por definição é igual à inclinação da reta de calibração dividida pela estimativa do desvio padrão. Para dois métodos de mesma precisão o mais sensível será o que possuir a curva de calibração com maior inclinação (Leite, 2002). As condições cromatográficas, definidas por ocasião do desenvolvimento do método, proporcionaram picos simétricos e com boa resolução tanto para o analito como para o PI, com um tempo total de corrida pequeno (3,5 min.), satisfatório para a análise de grandes quantidades de amostras em matriz biológica, típicas dos estudos de bioequivalência (tabela 8).

Durante o desenvolvimento do método experimentamos os modos positivos e negativos de ionização e a resposta no modo positivo foi muito melhor devido a características básicas das moléculas do analito e PI. A adição de ácido acético 10 μ M melhorou a resposta proporcionando baixo ruído de fundo, no modo de ESI positivo. A definição dos parâmetros de espectrometria de massa foi focada na fragmentação do íon molecular precursor na célula de colisão. Os picos com m/z de 175 e 369,4 foram os mais intensos e dominantes fragmentos para a clorpropamida e glibenclamida, respectivamente. A seleção da voltagem e temperatura de dessolvatação foi essencial para a obtenção de fragmentos estáveis e abundantes (tabela 09).

Alguns métodos empregando a técnica de LC/MS/MS empregam isótopos como PI, que, embora sejam ideais, são de custo elevado e de difícil aquisição (Oliveira, 2002). O método desenvolvido apresentou o LOQ menor que os relatados em trabalhos publicados anteriormente, uma recuperação com exatidão e precisão satisfatórias, bem como, resultados dos testes de avaliação de efeito matriz, *cross talk* e supressão iônica satisfatórios (quadro 19), sendo preciso e exato dentro do *range* analítico validado (tabelas 11 a 14). T. Taylor e colaboradores, em 1977, obtiveram LOQ de 1,0 μ g/mL,

empregando GC. Monro e Welling, em 1974, obtiveram LOQ de 5,0 µg/mL, empregando TLC. Ku e colaboradores, em 2003, obtiveram LOQ de 4,0 µg/mL, empregando *High Performance Capillary Electrophoresis with Ultra Violet detection* (HPCE/UV). Hoizey e colaboradores, em 2005, obtiveram LOQ de 31,5 µg/mL, empregando LC/MS/MS.

Na tabela 44 apresentamos sucintamente os dados da literatura revisada.

Tabela 44- Referências – Fase analítica

REFERÊNCIA	MATRIZ	MÉTODO/ DETECÇÃO	LOQ (µg/mL)	EXTRAÇÃO	TEMPO DE RETENÇÃO (min.)	TEMPO TOTAL CORRIDA (min.)
Silva MA <i>et al</i> , 2007	Plasma	LC/MS/MS	0,1	liq-liq	1,8	3,5
Taylor T <i>et al</i> , 1977	Plasma	GC	1	ND	5	ND
Ku <i>et al</i> , 2003	Chás	HPCE/UV	4	liq-liq	3,8	4
Hoizey, <i>et al</i> , 2005	Plasma	LC/MS/MS	31,5	liq-liq	ND	4
Monro e Welling, 1974	Soro	TLC	5	ND	ND	ND

ND: Dado não fornecido

O procedimento de extração ao qual todas as amostras foram submetidas, do tipo líquido-líquido, empregou como líquido de extração a composição de solventes dietil éter/hexano/diclorometano (40/30/30; v/v/v) que foi a que, com polaridade mais adequada para carrear o fármaco da fase aquosa, mostrou melhor rendimento com ausência de efeito matriz e supressão iônica. A adição do ácido clorídrico 1%, favoreceu o rompimento da ligação às proteínas plasmáticas (anexo XII).

A determinação do fator de recuperação (tabela 15 e 16) mostrou que o procedimento de extração a que as amostras são submetidas é reprodutível e consistente, nos três níveis de concentração na faixa de alcance do método, tanto para o analito (clorpropamida) quanto para o PI (glibenclamida). O percentual baixo para o fator de recuperação não afetará a análise estatística para estabelecimento de bioequivalência, pois estará sendo aplicado em ambas as formulações. Hoizey e colaboradores, em 2005, encontraram resultado similar para o fator de recuperação. Moura e colaboradores, em 2004, desenvolveram e validaram um método de doseamento para Glibenclamida, que no nosso estudo foi usada como PI. O procedimento de extração deste método foi similar ao

nosso, diferindo na composição do líquido de extração em que não estava presente o hexano e com a mesma proporção de diclorometano, e com resultados também satisfatórios.

A especificidade, segundo a USP, é a habilidade para avaliar o analito inequivocamente, com exatidão, em presença de outros componentes cuja presença é esperada tais como impurezas, produtos de degradação, componentes da matriz, excipientes, outros princípios ativos e metabólitos assegurando que o valor de concentração determinado seja correspondente apenas ao analito de interesse (USP XXVIII, 2004d). Para a seletividade tem sido atribuído o mesmo significado de especificidade e em várias circunstâncias esta associada ao efeito matriz. A IUPAC e AOAC usam preferencialmente o termo seletividade, reservando especificidade apenas para os métodos de ensaio totalmente seletivos, ou seja, que produzem resposta para uma única substância de interesse. Para evitar confusões adotaremos o termo seletividade que nos parece mais apropriado, pois os métodos cromatográficos geralmente respondem a mais de uma substância, com uma determinada característica em comum (IUPAC, 1973; IUPAC, 1997; Vessman *et al*, 2001; AOAC, 2004). A seletividade é medida e documentada na resolução de uma separação, na contagem dos pratos, na determinação do fator de caldeamento, etc. (Swartz e Krull, 1997; USP XXVIII, 2004a). A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e deve ser avaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método. Algumas amostras principalmente as matrizes biológicas podem sofrer degradação, gerando compostos que não foram observados inicialmente, que podem coeluir com a substância de interesse. Em HPLC a seletividade é obtida pela escolha de colunas e condições cromatográficas otimizadas, como: temperatura da coluna, composição da fase móvel, comprimento de onda do detector, número de pratos teóricos, etc. (Collins *et al*, 2006).

A ionização do analito e do PI na técnica de LC/MS/MS é susceptível de ser influenciada por componentes da matriz com conseqüente influencia na exatidão do método (Annesley, 2003). O ensaio de supressão iônica comprovou não haver substâncias interferentes capazes de provocar supressão ou potencialização do sinal iônico no tempo de retenção do analito ou do PI (Anexo IX e quadro 19).

A análise visual dos cromatogramas, referentes aos ensaios de *carry over* comprova a ausência de interferentes no tempo de retenção do analito e do PI. O ensaio *cross talk* validou a seleção dos canais no espectrômetro de massa, confirmando que o cromatograma referente ao analito e ao PI de fato é respectivamente referente à estes. A especificidade/seletividade do método foi satisfatória conforme podemos verificar pela análise visual dos cromatogramas. Não foi detectada a presença de nenhum interferente no tempo de retenção do analito e do PI (Anexo IX e quadro 19).

Com a avaliação dos dados de validação das curvas de calibração dos três lotes de amostras (tabela 11), verificamos que, conforme os critérios de aceitação da Anvisa e FDA, todos os pontos em duplicata das três curvas, bem como os respectivos coeficientes de correlação foram aprovados. A precisão foi expressa como coeficiente de variação percentual (CV%) e a exatidão pela relação entre a média das concentrações determinadas experimentalmente e a concentração teórica correspondente, tida como verdadeira. A determinação das concentrações no LOQ e demais pontos das três curvas tem desvio menor que 15% em relação à concentração nominal e a precisão de todas as determinações teve CV% menor que 11% (tabela 12). Podemos verificar também que o coeficiente de correlação linear foi superior a 0,99 (tabela 11). A Anvisa estabelece que, para aprovação da curva, o coeficiente de correlação linear deve ser no mínimo de 0,98, a precisão com CV% menor que 20% para o LOQ e 15% para os demais pontos e exatidão dentro de 80-120% para o LOQ e 85-115% para os demais pontos. Estes resultados validam a função matemática da curva de calibração do método, com precisão e exatidão suficientes para fornecer resultados reprodutíveis e confiáveis. Embora o método tenha função quadrática (tabela 11 e 27), este foi completamente validado e isto não afetou a qualidade dos resultados. Todos os lotes de amostras de validação e de voluntários foram calculados usando esse modelo de regressão.

Na avaliação da precisão e da exatidão do método foram usadas três concentrações distintas (QCA, QCB, QCC) na sua faixa de alcance (*range* analítico), sendo que foram feitas oito determinações por concentração (tabela 13). A precisão e exatidão intra-lote foi determinada pela avaliação de amostras de QCs de um mesmo lote. A inter-lote foi determinada pela avaliação de amostras de QCs dos três lotes empregadas no

procedimento de validação, com a avaliação da variabilidade de um lote (de voluntários ou validação) para o outro (analisadas em dias diferentes). O CV% foi menor que 8% nos três níveis de concentração e para os três lotes de amostras (lote 1, 2 e 3). Podemos ainda verificar que a exatidão esta entre 98 e 111%. Com esta avaliação podemos comprovar que o método é preciso e exato dentro do range para o qual validamos a curva de calibração e conforme limites de aceitação (15%) preconizados pela Anvisa e FDA.

Todas as corridas analíticas foram monitoradas, quanto à precisão e exatidão, com o objetivo de assegurar a continuidade do desempenho satisfatório do método previamente documentada na validação. Para tanto amostras de QC, em três níveis de concentração na faixa de aplicação do método, foram colocadas em todos os lotes (listas) de amostras (ou corrida analítica), intercaladas a cada 10 amostras dos voluntários. Além dos QCs continham uma curva de calibração. Todas as amostras de um mesmo voluntário foram colocadas sempre na mesma lista (tabela 24).

O coeficiente de correlação linear da curva de calibração de todos os lotes de amostras dos voluntários (tabela 27) foram maiores que 0,99 assim como nos 3 lotes de validação (tabela 11). O número de amostras de QC (em múltiplos de três) incorporadas em cada corrida analítica foi superior a 6% do número de amostras dos voluntários constante de cada lote. A Anvisa preconiza um mínimo de 5% (tabela 25 e 30).

A Anvisa e o FDA estabelecem que a variação nos valores de concentração das amostras de controle de qualidade (QCA, QCB e QCC), em relação aos seus respectivos valores nominais, não deve ser superior ou inferior a 15%, sendo este o seu critério de aprovação. Para que uma corrida esteja aprovada não menos que 67% das amostras de QC devem estar aprovadas, ou seja, devem estar dentro de mais ou menos 15% de seus valores nominais. O percentual de aprovação das amostras de controle de qualidade no nosso estudo foi maior que 75% em todos os lotes (tabela 31 e 32).

A avaliação da conformidade do sistema analítico para todas as listas analisadas no estudo foi satisfatória, pois apresentaram um CV%, tanto para variação na área do PI, bem como para a variação no tempo de retenção do analito, aprovados. Ao observarmos o

gráfico das áreas do PI também não verificamos mudanças abruptas na área deste ao longo do estudo (tabela 26 e figura 10).

O CV% foi menor que 14% e a exatidão entre 87 e 110% para todas as listas aprovadas, sendo assim a precisão e a exatidão foram satisfatórias, tanto na avaliação intra-lote como na inter-lote (tabela 28 e 29).

A variação (%) dos resultados de concentração antes e após a re-injeção foi menor que 8% para os quatro níveis de concentração (LOQ, QCA, QCB e QCC). Estes resultados nos permitiriam executar um procedimento de re-injeção das amostras, caso alguma corrida tivesse sido interrompida, por qualquer motivo levando-se em conta apenas o tempo limite de permanência das amostras no *rack* do auto-injetor, tempo este determinado pelo estudo de estabilidade (tabela 14).

Os resultados apresentados na tabela 17, que se referem à avaliação da estabilidade das amostras no compartimento do auto-injetor, indicam que as amostras processadas podem ali permanecer, por 143 horas, sem apresentar degradação ou alterações que possam comprometer a qualidade dos resultados de análise. Isto significa que podemos programar uma corrida analítica contendo um lote de amostras, suficientemente grande para durar igual período de tempo, com a garantia que não haverá degradação suficiente para comprometer resultados. A variação entre a concentração da amostra logo após a sua preparação (tida como referência) e a concentração da amostra, após permanência no auto-injetor, foi menor que 5% para os três níveis de concentração.

A avaliação da estabilidade das amostras após processamento indica que, as mesmas podem permanecer à temperatura ambiente por 23 horas, enquanto são preparados os lotes de amostras que compõem uma corrida analítica, sem apresentar degradação ou alterações que possam comprometer a qualidade dos resultados de análise. Em todos os níveis de concentração a variação foi menor que 4%. Este tempo é superior ao necessário para o manuseio das amostras na bancada, em condições de rotina (tabela 19).

Na tabela 18 são apresentados os resultados do teste de congelamento e descongelamento das amostras processadas nos indicando que estas permanecem estáveis após serem descongeladas (até a temperatura ambiente) e re-congeladas por 3 vezes, sem

comprometer a qualidade dos resultados de análise. Em todos os níveis de concentração a variação foi menor que 8%.

Os resultados do teste de estabilidade de longa duração, que avaliam as condições de estocagem e acondicionamento das amostras de plasma dos voluntários, nos sinalizaram que estas permaneceram estáveis pelo período de tempo que durou o estudo, 68 dias, estando congeladas à -20°C. Em todos os níveis de concentração a variação foi menor que 8%. A análise de todas as amostras do estudo foi concluída dentro do período de tempo para o qual a estabilidade foi determinada (tabela 20).

A solução mãe de clorpropamida e glibenclamida, estocadas à temperatura de 4 a 8°C (geladeira) por 42 dias não apresentam alterações de degradação significativas, capazes de comprometer os resultados do estudo, conforme indicaram os testes de estabilidade executados com as mesmas (tabela 21 e 22).

As soluções de trabalho da clorpropamida também são estáveis quando mantida em temperatura ambiente por 15 horas, tempo este superior ao necessário para o manuseio das soluções na bancada, quando são preparados os lotes de amostras. Na determinação de estabilidade de todas as soluções empregadas no estudo obtivemos valores de CV% e desvio em relação à concentração referência menores que 10% (tabela 23).

Todos os testes que compõem a avaliação de estabilidade, das amostras e das soluções empregadas no estudo, apresentaram coeficiente de variação e desvio em relação à concentração referência menores que 15%, estando assim em conformidade com os critérios de aceitação propostos pela legislação vigente no país e internacionais.

O percentual de re-análise foi 1,9%, muito inferior ao limite máximo permitido pela Anvisa que é de 20% do total de amostras. Os motivos bem como a decisão para definição do valor final, após a re-análise, estão de conformidade com o descrito previamente no protocolo analítico do estudo (tabelas 25, 31, 32).

A presença de efeitos residuais tem um grande impacto na inferência estatística de bioequivalência entre formulações. Se um fármaco tem uma meia vida longa ou se o intervalo entre os períodos de tratamento é muito curto, o efeito do mesmo pode persistir

depois do fim de período de eliminação (efeito residual). Neste caso, é necessário distinguir a diferença entre o efeito do fármaco e os efeitos residuais. Na análise de variância (ANOVA) dos parâmetros farmacocinéticos ASC_{0-72} e C_{max} , com transformação logarítmica, avaliamos os efeitos de seqüência, de voluntário dentro da seqüência, de período e de tratamento (anexo XV). Os valores de concentração diferentes de zero apresentados pelos voluntários de número 01 (0,103 µg/mL), 11 (0,11 µg/mL), 19 (0,100 µg/mL) e 24 (0,100 µg/mL) no tempo de coleta anterior à administração da formulação (tempo zero) não interferiram na determinação de bioequivalência entre as formulações (tabelas 33 a 38).

A análise dos dados e a determinação de bioequivalência entre as formulações dependem diretamente do delineamento selecionado. O delineamento do nosso estudo foi aberto, aleatorizado, cruzado em dois períodos com administração de dose única de uma formulação teste e outra referência. A legislação nacional e internacional que normatiza os estudos de bioequivalência preconiza que um delineamento do tipo cruzado deve ser adotado. Uma das vantagens do estudo cruzado, muito importante em estudos de bioequivalência, é que cada indivíduo serve como seu próprio controle, o que permite uma comparação do indivíduo com ele mesmo, para as diferentes formulações. Outra importante vantagem deste delineamento é que a variabilidade inter-individual é removida da comparação entre formulações, o que dota de maior poder estatístico o teste de diferença de tratamentos. Um número apropriado de voluntários sadios deverá assegurar poder estatístico suficiente para garantir a confiabilidade dos resultados do estudo de bioequivalência. O poder do teste de um estudo de bioequivalência é definido como a probabilidade de aceitar a bioequivalência entre produto teste e referência corretamente, dentro dos limites clinicamente relevantes definidos como sendo 20% da média da formulação referência. O quantitativo de voluntários é definido com o objetivo de obter um poder mínimo de 80%. No nosso estudo, pela análise do poder para ASC_{0-72h} e C_{max} , referente aos 35 voluntários, podemos considerar que um próximo estudo poderia ser realizado com um número menor de voluntários obtendo um média geométrica dentro do intervalo de 80-125% com intervalo de confiança de 90%, satisfazendo assim os critérios de bioequivalência propostos pela Anvisa e FDA. O número de voluntários, envolvidos em um protocolo de estudo clínico, é muito importante para termos uma avaliação estatística

dos resultados consistente, com dados procedentes de uma amostra verdadeiramente representativa do universo em estudo. Entretanto as premissas éticas, de fundamental importância em qualquer estudo clínico, preconizam que os ensaios envolvendo seres humanos devem ser realizados com o menor número de sujeitos de pesquisa possível de fornecer resultados estatisticamente relevantes (tabela 42).

A legislação nos orienta a determinar os parâmetros farmacocinéticos: ASC_{0-t} , ASC_{0-inf} , C_{max} e T_{max} , sendo que deste último não é necessário fazermos tratamento estatístico, apenas a estatística descritiva.

Na tabela 39 e 40, conforme exigência da legislação em vigor no país (Brasil, 2006; Brasil, 2007), apresentamos valores individuais, médias (aritmética e geométrica), desvio padrão e coeficiente de variação dos parâmetros farmacocinéticos relacionados à administração dos medicamentos teste e referência, ou seja, ASC_{0-72h} , C_{max} e T_{max} .

A já citada legislação também recomenda que os parâmetros ASC_{0-72h} e C_{max} sejam transformados em logaritmo natural, uma vez que, em geral, a distribuição dos dados transformados se aproxima mais a uma distribuição normal em relação aos dados originais. O tratamento estatístico proposto adota estatística paramétrica que já demonstrou ter poder estatístico mais significativo que a estatística não paramétrica, em estudos de bioequivalência (Oliveira, 2003). Apresentamos então, estas informações na tabela 41 e a representação gráfica das mesmas nas figuras 3 e 4.

Não é recomendável fazer a extrapolação dos dados. Nos fármacos com tempo de meia vida superior a 24 horas recomenda-se então determinar a área sob a curva truncada (ASC_{trunc}). Deste modo o tempo de coleta estendeu de 0-72 h da administração e determinamos então apenas a ASC_{0-72h} , C_{max} , e T_{max} , parâmetros suficientes para a avaliação de bioequivalência.

As figuras 1 e 2 mostram a similaridade entre o perfil de concentração plasmática das duas formulações, embora não seja suficiente para comprovar a bioequivalência das mesmas, pois esta comprovação só é possível pela avaliação estatística dos dados obtidos no estudo.

7- CONCLUSÃO

O método desenvolvido para determinação de clorpropamida em plasma, empregando a técnica de LC/MS/MS e o método de extração do tipo líquido-líquido foi completamente validado, com resultados satisfatórios. O método demonstrou ter exatidão, precisão, especificidade e sensibilidade adequadas para doseamento de clorpropamida em plasma empregando glibenclamida como padrão interno e com LOQ inferior ao relatado pela literatura. O método foi utilizado em um estudo de bioequivalência de forma satisfatória apresentando um tempo de corrida relativamente curto e com robustez adequada ao doseamento de grandes quantidades de amostras em matriz biológica. As duas formulações submetidas ao estudo são bioequivalentes podendo ser intercambiáveis, sem perda de eficácia terapêutica e segurança, proporcionando níveis plasmáticos equivalentes.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADA - American Diabetes Association. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 1997; 20:1183–1197. [acesso em 20 abr 2007] Disponível em: URL: http://www.cdc.gov/diabetes/pubs/pdf/ndfs_2005.pdf

Allen LV, Popovich NG, Ansel HC. Ansel' Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems. 8.ed. Philadelphia: Ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2005. 738p.

Amidon GL, Lobenberg R. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutical classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. Eur J Pharm Biopharm 2000; 50:3-12.

Amidon GL, Lennernas H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. Pharm Res 1995; 12(3):413-20.

Annesley TM. Ion suppression in mass spectrometry. Clin Chem 2003; 49(7):1041-4.

AOAC International - Harmonisation of analytical terminology in accordance with international standards [inter-agency meeting May 2004] [Acesso em: 20 Dez 2006] Disponível em: URL:http://www.aoac.org/intaffairs/analytical_terminology.htm

Arduino F. Diabetes Mellitus. 3.ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan; 1980. 413p.

Aulton ME. Delineamento de formas farmacêuticas. 2.ed. Porto Alegre: Ed. Artmed; 2005. 677p

Avdeef A, Berger CM, Brownell C. pH-metric solubility. 2: correlation between the acid-base titration and the saturation shake-flask solubility-pH methods. Pharm Res 2000; 17(1):85-9.

Baldwin MA. Modern mass spectrometry in biorganic analysis. Nat Prod Rep [serial on line] 1995 [acesso em 20 mai 2006]; 12(1):33-44. Disponível em: URL:<http://www.rsc.org/ejarchive/NP/1995/NP9951200033.pdf>

Ball CP, Derrick PJ. Mass spectrometry. Ann Rep Prog Chem: sect B:Org chem [serial on

line] 1993 [acesso em 20 mai 2006]; 90:21-49. Disponível em: URL:<http://www.rsc.org/ejarchive/OC/1993/OC9939000021.pdf>.

Balthasar JP. Bioequivalence and bioequivalency testing. Am J Pharm Educ 1999 Summer; 63:194-99.

Barros Neto B, Pimentel MF, Araújo MCU. Recomendações para calibração em química analítica – Parte I: fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). Quim Nova [on line] 2002 [Acesso em 16 de outubro de 2006]; 25(5):856-65. Disponível em: URL: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v25n5/11419.pdf>.

Barros Neto B, Scarmino, IS, Bruns, RE. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas: Editora da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp; 2001. 402p.

Batenhorst RL, Bustrack JA, Bivins BA, Foster TS. Comparative bioavailability of chlorpropamide tablet and suspension formulations. Clin Pharm 1982 Jan-Feb; 1:58-61.

Bermudez G. Medicamentos genéricos: uma alternativa para o mercado brasileiro. Cad Saúde Pública 1994; 10(3):368-78.

BF - The British Pharmacopoeia 2003. British Pharmacopoeial Commission. TSO (The Stationery Office); 2003.

Bhonde R, Shukla RC, Kanitkar M, Shukla R, Banerjee M, Datar S. Isolated islets in diabetes research. Indian J Med Res 2007; 125:425-40.

Biemann K. Tandem mass spectrometry for organic trace analysis. Pure and Applied Chemistry 1993; 65(5):1021-27.

Black SN, Colleier EA, Davey RJ, Roberts RJ. Structure, solubility, screening and synthesis of molecular salts. J Pharm Sci 2007; 96(5):1053-68.

Bocxlaer JFV, Clauwaert KM, Lambert WE, Deforce DL, Eeckhout EGVD, Leenheer APD. Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic toxicology. Mass Spectrom Rev 2000; 19:165-214.

Bonner-Weir S, Smith FE. Islets of Langerhans: morphology and its implications. In: Kahn RC, Weir GC. Joslin's Diabetes Mellitus. 13.ed. Philadelphia: Ed. Williams & Wilkins. 1994. p15-28.

Bourdreau SP, McElvain JS, Martin LD, Dowling T, Fields SM. An acceptable analytical practice. Pharm Thec 2004; 28(11):54-66.

Brasil. Congresso Nacional. Lei nº 5991, de 17 de dezembro de 1973. Dispõe sobre o controle sanitário do comércio de drogas, medicamentos, insumos farmacêuticos e correlatos, e dá outras providências. Diário Oficial da União; Poder executivo, Brasília-DF, 19 dez 1973, pág. 13049. Com retificação no Diário Oficial da União de 21 Dez 1973, pág. 13182.

Brasil. Conselho Nacional de Saúde - CNS. Ministério da saúde. Resolução nº1/88, de 08 de junho de 1988. Dispõe sobre normas de pesquisa em saúde. Diário Oficial da União; Poder executivo, Brasília-DF, 13 jun 1988.

Brasil. Conselho Nacional de Saúde - CNS. Ministério da saúde. Resolução RE nº196/96, de 10 de outubro de 1996. Sobre pesquisas envolvendo seres humanos. Bioética. Diário Oficial da União; Poder executivo, Brasília-DF, 16 out 1996.

Brasil. Conselho Nacional de Saúde - CNS. Ministério da saúde. Resolução nº251/97, de 05 de agosto de 1997. Aprova as normas de pesquisa envolvendo seres humanos para a área temática de pesquisa de novos fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos. Diário Oficial da União; Poder executivo, Brasília-DF, 07 ago 1997.

Brasil. Congresso Nacional. Lei nº9782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária e dá outras providências. Diário Oficial da União; Poder executivo, Brasília-DF, 27 jan 1999a.

Brasil. Congresso Nacional. Lei nº9787, de 10 de fevereiro de 1999. Altera a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências. Diário Oficial da União; Poder executivo, Brasília-DF, 11 fev 1999b.

Brasil. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução RE nº391, de 09 de agosto de 1999. Aprova o regulamento técnico para medicamentos genéricos, e dá outras providências. Diário Oficial da União; Poder executivo, Brasília-DF, 10 ago 1999c.

Brasil. Presidência da Republica. Medida provisória nº2134-31, de 21 de junho de 2001. Altera dispositivos das Leis nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999, que define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e nº 6.437, de 20 de agosto de 1977, que configura infrações à legislação sanitária federal e estabelece as sanções respectivas, e dá outras providências. Diário Oficial da União; Poder executivo, Brasília-DF, 22 jun 2001a.

Brasil. Presidência da República. Medida Provisória nº 2190-34, de 23 de agosto de 2001. Altera dispositivos das Leis nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999, que define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e nº 6.437, de 20 de agosto de 1977, que configura infrações à legislação sanitária federal e estabelece as sanções respectivas, e dá outras providências. Diário Oficial da União; Poder executivo, Brasília-DF, 24 ago de 2001b.

Brasil. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de boas práticas em biodisponibilidade: bioequivalência. Ministério da Saúde. Gerência geral de inspeção e controle de medicamentos e produtos. Brasília: Anvisa; 2002. 2v. [Acesso em 06 out 2004] Disponível em: URL:<http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/index.htm>

Brasil. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução RE nº894, de 29 de maio de 2003. Guia para elaboração de protocolo de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. Diário Oficial da União; Poder executivo, Brasília-DF, 02 jun 2003a.

Brasil. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução RE nº895, de 29 de maio de 2003. Guia para elaboração de relatório técnico de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. Diário Oficial da União; Poder executivo, Brasília-DF, 02 jun 2003b.

Brasil. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução RE nº898, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União; Poder executivo, Brasília-DF, 02 jun 2003c.

Brasil. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução RE nº899, de 29 de maio de 2003. Guia para planejamento e realização da etapa estatística de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. Diário Oficial da União; Poder executivo, Brasília-DF, 02 jun 2003d.

Brasil. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução RDC nº103, de 08 de maio de 2003. Determina que os centros que realizam estudos de Biodisponibilidade/Bioequivalência para fins de registro de medicamentos deverão observar as normas e regulamentos técnicos em vigor. Diário Oficial da União; Poder executivo, Brasília-DF, 13 mai 2003e.

Brasil. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução RE nº1170, de 19 de abril de 2006. Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos. Diário Oficial da União; Poder executivo, Brasília-DF, 24 abr 2006.

Brasil. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução RE nº16, de 2 de março de 2007. Regulamento técnico para medicamentos genéricos. Diário Oficial da União; Poder executivo, Brasília-DF, 05 mai 2007.

Bressolle F, Bromet-Petit M, Audran M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics 1996. J Chromatogr B 1996; 686:3-10.

Burns DT, Danzer K, Townshend A. Use of the terms “recovery” and “apparent recovery” in analytical procedures. IUPAC Recommendation 2002. Pure & Appl Chem 2002; 74(11):2201-05.

Campbell IW. Antidiabetic drugs present and future: will improving insulin resistance benefit cardiovascular risk in type 2 diabetes mellitus? Drugs 2000; 60(5):1017-28.

Charman WN, Porter CJH, Mithani S, Dressman JB. Physicochemical and physiological mechanisms for effects of food on drug absorption: the role of lipids and pH. *J Pharm Sci* 1997; 86(3): 269-82.

Chen ML, Shah V, Patnaik R, Adams W, Hussain A, Conner D, *et al.* Bioavailability and bioequivalence: an FDA regulatory overview. *Pharm Res* 2001; 18(12):1645-50.

Cheng AYY, Fantus IG. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Can Med Assoc J* 2005; 172(2):213-26.

Chow SC, Liu JP. Design and analysis of bioavailability and bioequivalence studies. New York: Marcel Dekker; 1992. 416p.

Chow SC, Wang H. On sample size calculation in bioequivalence trials. *J Pharm Pharmacodyn* 2001; 28(2):155-69.

Cienfuegos F. Estatística aplicada ao laboratório. Rio de Janeiro: Editora Interciência Ltda; 2005. 200p.

Collins CH, Braga GL, Bonato PS. Fundamentos de cromatografia. Campinas: Editora da Universidade Estadual de Campinas Unicamp; 2006. 453p.

Coplen TB, Bohlke JK, De Bièvre P, Ding T, Holden NE, Hopple JA *et al.* Isotope abundance variations of selected elements. IUPAC technical report II.1. *Pure & Appl Chem* 2002; 74(10):1987-2017.

Craig CR, Stitzel RE. Farmacologia moderna com aplicações clínicas. 6.ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan; 2005 815p.

Crotti AEM, Vessechi R, Callegari-Lopes JL, Peporine-Lopes N. Espectrometria de massas com ionização por “eletrospray”: Processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. *Quim Nova* 2006; 29(2):287-92.

Custódio R, Andrade JC, Augusto F. O ajuste de funções matemáticas a dados experimentais. *Quim Nova* 1997; 20(2):219-25.

Dams R, Huestis MA, Lambert WE, Murphy CM. Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. *J Am Soc Mass Spectrom* 2003; 14:1290-4.

Danzer K, Currie LA. Guidelines for calibration in analytical chemistry: Part 1. Fundamentals and single component calibration. IUPAC Recommendation 1998. *Pure & Appl Chem* 1998; 70(4):993-1014.

Danzer K, Otto M, Currie LA. Guidelines for calibration in analytical chemistry: Part 2. Multispecies calibration. IUPAC Technical Report. *Pure & Appl Chem* 2004; 76(6):1215-25.

Di Masi, J. New drug development in the USA from 1963 to 1999; Risk in new drug development – Approval success rates for investigational drugs. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69:286-307.

Dressman JB, Amidon GL, Reppas C, Shah VP. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. *Pharm Res* 1998; 15(1):11-22.

Emilien G, Maloteaux JM, Ponchon M. Pharmacological management of diabetes: recent progress and future perspective in daily drug treatment. *Pharmacol Ther* 1999; 81(1):37-51.

Erny GL, Cifuentes A. Liquid separation techniques coupled with mass spectrometry for chiral analysis of pharmaceuticals compounds and their metabolites in biological fluids. *J Pharm Biomed Anal* 2006; 40:509-15.

Ettre LS. Nomenclature for Chromatography. IUPAC Recommendation 1993. *Pure & Appl Chem* 1993; 65(4):819-72.

Eurachem-CITAC. Guide to quality in analytical chemistry. An aid to accreditation, 2002.

Eurachem Working group. The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics, 1998.

European Pharmacopoeia - 4th Edition - Print Version. European Directorate for the Quality of Medicines - Council of Europe. 2002.

Evans M, Glass RC, Mitchard M, Munday BM, Yates. Bioavailability of chlorpropamide. Br J Clin Pharmacol 1979Jan; 7(1):101-5.

FDA. Food and Drug Administration - U.S. Department of Health and Human Services. Code of Federal Regulation - CFR Title 21 - Food and Drugs: Parts 320. Bioavailability and bioequivalence requirements. 1977. Updated April 01, 2006. [Acesso em 07 jul 2006] Disponível em: URL:http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFR_Search.cfm

FDA. Guidance for Industry: Bioanalytical Method validation. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for veterinary Medicine (CVM). May 2001b. 25 p. [acesso em 07 jul 2006] Disponível em URL:<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>

FDA. Guidance for Industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products — General Considerations. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). March 2003. BP Revision 1. [acesso em 07 jul 2006] Disponível em URL: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>

FDA. Guidance for Industry: Statistical Approaches to Establishing Bioequivalence. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). January 2001a. [acesso em 07 jul 2006] Disponível em URL:<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>

Ferner RE, Chaplin S. The relationship between the pharmacokinetics and pharmacodynamics effects of oral hypoglycaemic drug. Clin Pharmacokinet 1987; 12:379-401.

Florence AT, Attwood D. Princípios físicos em farmácia. São Paulo: Edusp-Editora da Universidade de São Paulo; 2003. 736p.

Fordtran JS, Rector Jr FC, Kinney J. Permeability characteristics of the human small intestine. J Clin Invest 1965; 44(12):1935-44.

Goldenthal EI. A compilation of LD50 values in newborn and adult animals. *Toxicol Appl Pharmacol* 1971 Jan; 18(1):185-207.

Goldim JR, Pithan CF, De Oliveira JG, Raymundo MM. O processo do consentimento livre e esclarecido em pesquisa: uma nova abordagem. *Rev Assoc Med Bras* 2003; 49(4):372-4.

Goodman LS, Gilman A. *Pharmacological basis of therapeutics*. Editors: Alfred Goodman Gilman, Joel Griffith Hardman, Lee E. Limbird. 10.ed. United States of American. Ed. Mcgraw-Hill Companies Intl Division; 2001. 2148p.

Hardy E, Bento SF, Osis MJD, Hebling EM. Comitês de ética em pesquisa: adequação à resolução 196/96. *Rev Assoc Med Bras* 2004; 50(4):457-62.

Harrower ADB. Comparative tolerability of sulphonylureas in Diabetes Mellitus. *Drug Saf* 2000; 22(4):313-20.

Hasler JA, Estabrook R, Murray M, Pikuleva I, Waterman M, Capdevila J, Holla V, Helvig C, Falck JR, Farrell G, Kaminsky LS, Spivack SD, Boitier E, Beaune P. Human cytochrome P450. *Mol Aspects Med* 1999; 20:1-137.

Hembeck Hans-Wilhelm. GLP and other quality assurance systems - a comparison. *Accred Qual Assur* 2002; 7:266-8.

Hendriksen BA, Felix MVS, Bolger MB. The composite solubility versus pH profile and its role in intestinal absorption prediction. *AAPS PharmSci* [on line] 2003 [Acesso em 18 mai 2006]; 5(1):(article4)1-15. Disponível em: URL:<http://www.aapspharmsci.org/articles/ps0501/ps050104/ps050104.pdf>.

Henion J, Brewer E, Rule G. Sample preparation for LC/MS/MS: analyzing biological and environmental samples. *Anal Chem* 1998 Oct 1; 70(19):650A-656A.

Hoizey, .G, Lamiable, D., Trenque, T., Robinet, A., Binet, L., Kaltenbach, M.L., Havet, S., Millart, H., Identification and quantification of 8 sulfonylureas with clinical toxicology interest by liquid chromatography-ion-trap tandem mass spectrometry and library searching. *Clin Chem* 2005; 51(9):1666-72.

Honorato FA, Honorato RS, Pimentel MF, Araújo MCU. Analytical curve or standard addition method: how to elect and design – a strategy applied to copper determination in sugarcane spirits using AAS. *Analyst* 2002; 127:1520-5.

Horter D, Dressman JB. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 46:75-87.

Horwitz W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. *Pure & Appl Chem* 1995; 67(2)331-43.

Hulley SB, Cummings SR, Browner WS, Grady D, Hearst N, Newman TB. *Delineando a pesquisa clínica: uma abordagem epidemiológica*. 2.ed. 1. reimp. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2006. 374p.

ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements For Registration of Pharmaceuticals For Human Use. ICH Harmonized tripartite guideline for good clinical practice - E6(R1): Good Clinical Practices. ICH expert working group. Current step 4 version dated 10 June 1996. (including the post step 4 corrections agreed by the steering committee on 10 June 1996). [Acesso em 15 mar 2006] Disponível em:URL: <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA482.pdf>. Acessada em: 07 jul 2006.

ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements For Registration of Pharmaceuticals For Human Use. ICH Harmonized tripartite guideline for good clinical practice - E3 Structure and content of clinical study reports. ICH expert working group. Current step 4 version dated 30 November 1995. [Acesso em 15 mar 2006] Disponível em:URL:<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA479.pdf>. Acessada em: 07 jul 2006.

ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements For Registration of Pharmaceuticals For Human Use. Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology Topic Q2A - Published in the Federal Register, Vol. 60, March 1, 1995, page 11260.

ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements For Registration of Pharmaceuticals For Human Use. Validation of Analytical Procedures: Methodology Topic Q2B – Published in the Federal Register, Vol. 62, No. 96, May 19, 1997, pages 27463-27467.

Inman, E. L., Frischmann, J. K., Jimenez, P. J., Winkel, G. D., Persinger, M. L., and Rutherford, B. S. General method validation guidelines for pharmaceutical samples. *J Chromatogr Sci.* 1987; 25:252.

Inzucchi SE, Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes. *JAMA* 2002; 287(3): 360-372.

ISO – International Standards Organization. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Case Postale 56. CH-1211. Geneva 20, Switzerland.1999.

IUPAC Compendium of Analytical nomenclature. Definitive rules 1997. [Electronic version] [acesso em 15 mai 2006] Disponível em: URL:http://www.iupac.org/publications/analytical_compendium.

IUPAC Recommendations on nomenclature for Spectrometry. Rules approved 1973. *Pure & Appl Chem* 1974; 37(4)470-80. [Electronic version] [acesso em 15 mai 2006] Disponível em: URL:<http://www.iupac.org/publications/pac/1974/pdf/3704x0469.pdf>.

Johnson CAF, Parker JE. Review: mass spectrometry. *Ann rep prog chem; sect C: phys chem* [on line] 1992 [acesso em 12 mai 2006]; 89:289-315. Disponível em: URL: <http://www.rsc.org/ejarchive/PC/1992/PC9928900289.pdf>.

Joslin EP. Edited by: Kahn RC, Weir GC. *Diabetes Mellitus*. 13TH edition. Philadelphia: Ed. Williams & Wilkins. 1994. 1068p.

JP XIV - The Japanese Pharmacopoeia XIV. 2001. [Version on line]. [Acesso em 02 abr de 2006] Disponível em:URL: http://jpdb.nihs.go.jp/jp14e/14data/Validation_of_Analytical_Pr.pdf.

Kahn CR e Shechter Y. Insulina, drogas hipoglicemiantes orais e a farmacologia do pâncreas endócrino. In: Louis S Goodman e Alfred Gilman. Editado por: Alfred Goodman Gilman, Theodore W. Rall, Alan S Nies, Palmer Taylor. As Bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman. 8.ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan; 1991. p.973-94.

Karnes H. T., and March C. Calibration and validation of linearity in chromatographic biopharmaceutical analysis. J Pharm Biomed Anal 1991; 9(10-12):911.

Karnes, H., Shiu, G., and Shah, V. P. Validation of bio-analytical methods. Pharm Res 1991; 8(4):421.

Kaus LC, Gillespie WR, Hussain AS, Amidon GL. The effect of In vivo Dissolution, gastric emptying rate, and Intestinal transit time on the peak concentration and area-under-the-curve of drugs with different gastrointestinal permeabilities. Pharm Res 1999; 16(2):272-80.

Keogh JP, Kunta JR. Development, validation and utility of an in vitro technique for assessment of potential clinical drug-drug interactions involving P-glycoprotein. Eur J Pharm Sci 2006; 27:543-54.

King R, Bonfiglio R, Fernandez-Metzeler C, Miller-Stein C, Olah T. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. J Am Soc Mass Spectrom 2000; 11:942-50.

Kirchheiner J, Roots I, Goldammer M, Rosenkranz B, Brockmöller J. Effect of genetic polymorphisms in cytochrome P450 (CYP) 2C9 and CYP2C8 on the pharmacokinetics of oral antidiabetic drugs. Clin Pharmacokinet 2005; 44(12):1209-25.

Korolkovas A, Burckhalter JH. Química Farmacêutica. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan; 1988. 783p.

Korolkovas A. Fundamentos de farmacologia molecular: base para o planejamento de fármacos. 2.ed. São Paulo: EDART-Editora da Universidade de São Paulo; 1974. 459p.

Krall LP, Levine R, Barnett DM. The history of diabetes. In: Kahn RC, Weir GC. Joslin's Diabetes Mellitus. 13.ed. Philadelphia: Ed. Williams & Wilkins; 1994. p.1-14.

Krentz AJ, Bailey CJ. Oral antidiabetic agents. *Drugs* 2005; 65(3):385-411.

Ku YR, Chag LY, Ho LK, Lin JH, Analysis of synthetic anti-diabetic drugs in adulterated traditional chinese medicines by high-performance capillary electrophoresis. *J Pharm Biomed Anal* 2003; 33:329-34.

Labaune JP. Farmacocinética. São Paulo: Ed. Andrei; 1993. 198p.

Lachman L, Lieberman HA, Kanig JL. Teoria e prática na indústria farmacêutica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 2001. 2.v.

Leblanc PP, Aiache JM, Besner JG, Buri P, Lesne M. *et al.* Tratado de biofarmácia e farmacocinética. Lisboa: Instituto Piaget; 1997. 396p.

Lebovitz HE. Oral antidiabetic agents. In: Kahn RC, Weir GC. Joslin's Diabetes Mellitus. 13.ed. Philadelphia: Ed. Williams & Wilkins; 1994. p 508-29.

Leite, F. Validação em análise química. 4.ed. Campinas: Ed. Átomo; 2002. 278p.

Little GL, Boniface KS. Are one two dangerous? Sulfonylurea exposure in toddlers. *J Emerg Med* 2005; 28(3):305-310.

Luque-Garcia JL, Neubert TA. Sample preparation for serum/plasma profiling and biomarker identification by mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2007; 1153: 259-76.

Maia Neto, JF. Farmácia hospitalar e suas interfaces com a saúde. São Paulo: Rx editora; 2005. 316p.

Malaisse WJ, Lebrum P. Mechanisms of sulfonylurea-Induced Insulin Release. *Diabetes Care* 1990; 13(3):9-17.

Marshal AG, Hendrickson CL, Jackson GS. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer. *Mass Spectrom Rev* 1998; 17:1-35.

Marzo A, Monti NC, Vuksic D. Experimental, extrapolated and truncated areas under the concentration-time curve in bioequivalence trials. *Pharmacokinetics and Disposition* 1999; 55:627-31.

Maurer, H. H., Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic and clinical toxicology. *J Chromatogr B* 1998; 713:3-25.

McLuckey AS, Stephenson JL. Ion/ion chemistry of high-mass multiply charged ions. *Mass Spectrom Rev* 1998; 17:369-407.

Melander A. Kinetics-Effect Relations of Insulin-Releasing Drugs in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2004; 53(suppl 3):S152-5.

Merlob P, Levitt O, Stahl B. Oral Antihyperglycemic agents during pregnancy and lactation. *Pediatrics Drugs* 2002; 4(11): 755-60.

Midha KK, Rawson MJ, Hubbard JW. The role of metabolites in bioequivalence. *Pharm Res* 2004; 21(8):1331-44.

Modell W . The drug explosion. *Clin Pharmacol Ther* 1961 Jan-Feb; 2:1-7.

Monro AM, Welling PG, the bioavailability in man of marketed brands of chlorpropamide. *Eur J Clin Pharmacol* 1974; 7:47-9.

Moura M R L, De Nucci G, Rath S, Reyes FGR. LC-APCI-MS-MS methodology for determination of glybenclamide in human plasma. *Anal Bioanal Chem* 2004; 378:499–503.

Müller C, Schäfer P, Störtzel M, Vogt S, Weinmann W. Ion suppression effects in liquid chromatography-electrospray-ionisation transport-region collision methods for systematic toxicological analysis with mass libraries. *J Chromatogr B* 2002; 773:47-52.

Murray KK, Boyd RK, Eberlin MN, Langley GJ, Li L, Naito Y. IUPAC Provisional Recommendations 2006. Standard definitions of terms relating to mass spectrometry. [Acesso em 13 jan 2007] Disponível em:URL: http://www.iupac.org/reports/provisional/abstract_06/murray_310107.html

Nuremberg Code. Directives for Human Experimentation. 1947. OHSR - Office Human Subjects Research. [Acesso em 02 abr 2007] Disponível em:URL:<http://ohsr.od.nih.gov/guidelines/guidelines.html>.

OHSR. Office Human Subjects Research - Guidelines for Conduct of Research Involving Human Subjects at National Institute Health. 2004 US- Department of Health And Human Services. Public Health Services. [Acesso em 02 abr 2007] Disponível em:URL:<http://ohsr.od.nih.gov/guidelines/guidelines.html>.

Oliveira CH. Dosagem de concentrações plasmáticas de medicamentos através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massa (LC-MS-MS) e sua aplicação em estudos de bioequivalência [Tese – Doutorado]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas - Unicamp, Brasil; 2002.

Oliveira GG de. Ensaios clínicos princípio e prática. São Paulo: Anvisa e Sobravime; 2006. 327 p.

Oliveira RA. Métodos estatísticos aplicados em estudos de bioequivalência média [Dissertação]. Campinas (SP): Universidade estadual de Campinas – Unicamp; 2003.

Owens DR, Zinman B, Bolli GB. Insulin today and beyond. Lancet 2001; 358:739-58.

Patterson S, Jones B. Bioequivalence and statistics in clinical pharmacology. New York-NY: Chapman & Hall/CRC. Taylor & Francis Group; 2006. 374p.

Peters FT, Maurer HH. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology – a review. Accred Qual Assur 2002; 7:441-9.

Pimentel MF, Barros Neto B, Saldanha TCB, Araújo MCU. Effects of experimental design on calibration curve precision in routine analysis. The Journal of Automatic Chemistry 1998; 20(1):9-15.

Pimentel MF, Barros Neto B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. Quim Nova 1996; 19(3):268-77.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Farmacologia. Tradução da 5.ed. 3. tiragem. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004. 904p.

Rheinstein, PH. Therapeutic inequivalence. *Drug Saf* 1990; 5(Suppl 1):114-119.

Ribani Marcelo, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim Nova* [on line] 2004 set-out [acesso em 16 de out 2006]; 27(5). Disponível em: URL: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v27n5/a17v27n5.pdf>.

Robinson LA. Physicians and the pharmaceutical industry. *Can Med Assoc J* 1992; 147(5):582-3.

Rodriguez-Spong, Prince CP, Jayasankar A, Matzger AJ, Rodriguez-Hornedo. General principles of pharmaceutical solid polymorphism: a supramolecular perspective. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56:241-74.

Sartor G, Melander A, Schersten B, Wahlin-boll E. Influence of food and age on the single-dose and effects of tolbutamide and chlorpropamide. *Eur J Clin Pharmacol* 1980; 17: 285-93.

SBD - Sociedade Brasileira de Diabetes. Consenso brasileiro sobre diabetes 2002. Diagnóstico e classificação e tratamento do diabetes mellitus do tipo 2. Rio de Janeiro: Ed. Diagraphic; 2003.

SBD - Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. Tratamento e acompanhamento do diabetes mellitus. Rio de Janeiro; 2006.

Scheen AJ. Drug interactions of clinical importance with antihyperglycaemic agents: an update. *Drug Saf* 2005 28(7):601-31.

Schuirman DJ. A comparison of the two one sided tests procedure and the power approach for assessing the equivalence of average bioavailability. *J Pharmacokinet Biopharm* 1987; 15:657-80.

Schuirman DJ. Design of bioavailability and bioequivalence studies. *Drug Information Journal* 1990; 24:315-22.

Senn, S. Statistical issues in bioequivalence. *Statist Med* 2001; 20:2785-2799.

Shah VP, Midha KK, Findlay JWA, Hill HM, Hulse JD, McGilveray IJ *et al.* A bioanalytical methods validation - a revisit with a decade of progress. *Pharm Res* 2000;17(12):1551-7.

Shah VP, Midha KK, Dighe S, McGilveray I J, Skelly JP, Yacobi A *et al.* Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies. *J Pharm Sci* 1992; 81(3):309.

Shoelson SE, Halban PA. Insulin biosynthesis and chemistry. In: Kahn RC, Weir GC. *Joslin's Diabetes Mellitus*. 13.ed. Philadelphia: Ed. Williams & Wilkins; 1994. p29-55.

Shon JH, Yoon YR, Kim MJ, Kim KA, Lim YC, Liu KH *et al.* Chlorpropamide 2-hydroxylation is catalyzed by CYP2C9 and CYP2C19 in vitro: chlorpropamide disposition is influenced by CYP2C9, but not by CYP2C19 genetic polymorphism. *Br J Clin Pharmacol* 2004; 59(5):552-63.

Siconolfi-Baez L, Banerji MA, Lebovitz HE. Characterization and significance of sulfonylurea receptors. *Diabetes Care* 1990; 13(3):2-8.

Silva MA, Mendes FD, Oliveira RA, Monif T, Patni A, Reyar S *et al.* Comparative Bioavailability Study with Two Chlorpropamide Tablet Formulations in Healthy Volunteers. *Arzneimittel-Forschung Pharm Res* 2007; 57(9):591-98.

Silva P. *Farmacologia*. 3.ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan; 1989. 1322p.

Singhal D, Curatolo W. Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56:335-47.

Siqueira JE, Prota L, Zancanaro L. *Bioética: estudos e reflexões*. Londrina: editora da Universidade Estadual de Londrina; 2000. 316p.

Skillman T, Feldman JM. The pharmacology of sulphonylureas. *Am J Med* 1981 Feb; 70:361-72.

Snider DA, Addicks W, Owens W. Polymorphism in generic drug product development. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56:391-5.

Swartz ME, Krull IS. Analytical method development and validation. New York, NY: Marcel Dekker; 1997. 91p.

Taylor JA. Pharmacokinetics and biotransformation of chlorpropamide in man. Clin Pharmacol Ther 1972; 13(5):710-8.

Taylor T, Assinder DF, Chasseaud LF, Bradford PM, Burton JS. Plasma concentrations, bioavailability and dissolution of chlorpropamide. Eur J Clin Pharmacol 1977; 11:207-12.

The Merck Index – An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 33.ed. Merck research laboratories white house station, NJ: Editorial staff, Maryadele J. O’Neil *et al*; 2001.

Thomas G. Química medicinal: uma introdução. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan; 2003. 413p.

Thompson M, Ellison SLR, Fajgelj A, Willets P, Wood R. Harmonized guidelines for the Use of recovery information in analytical measurement. IUPAC Technical Report. Pure & Appl Chem 1999; 71(2):337-48.

Thompson M, Ellison SLR, Wood R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. IUPAC Technical Report. Pure & Appl Chem 2002; 74(5):835-55.

Turner RC, Cull CA, Frighi V, Holman RR. Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies. UK Prospective Study (UKPDS) Group. JAMA. 1999; 281(21): 2005-12.

UKPDS 13. United Kingdom prospective diabetes study 13: relative efficacy of randomly allocated diet, sulphonilurea, insulin or metformin in diagnosed non-insulin dependent diabetes followed for three years. BMJ 1995; 310:83-8.

UKPDS 33. United Kingdom prospective diabetes study 33: intensive blood-glucose control with sulphonilureas or insulin comparative with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. Lancet 1998; 352(12): 837-53.

UKPDS 34. United Kingdom prospective diabetes study 34: effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes. Lancet 1998; 352(12): 854-65.

USDA - United States Department of Agriculture - Report of the Dietary Guidelines Advisory Committee on the Dietary Guidelines for Americans, 2000. Prepared for the Committee by the Agricultural Research Service Dietary Guidelines Advisory Committee To the Secretary of Health and Human Services and the Secretary of Agriculture. [acesso em 07 abr 2007]. Disponível em:URL:<http://www.cnpp.usda.gov/Publications/DietaryGuidelines/2000/2000DGCommitteeReport.pdf>.

USP XXVIII - United States Pharmacopoeia. Chromatography <621>. In: U.S. Pharmacopoeia Convention. The United States Pharmacopoeia: USP 28 the national formulary: NF 23. 28th rev. of The pharmacopoeia of the U.S. 23rd ed. of the national formulary. Rockville, Md: United States Pharmacopeial Convention, 2004a.

USP XXVIII - United States Pharmacopoeia. Mass spectrometry <736>. In: U.S. Pharmacopoeia Convention. The United States Pharmacopoeia: USP 28 the national formulary: NF 23. 28th rev. of The pharmacopoeia of the U.S. 23rd ed. of the national formulary. Rockville, Md: United States Pharmacopeial Convention, 2004b.

USP XXVIII - United States Pharmacopoeia. In vivo bioequivalence guidance <1090>. In: U.S. Pharmacopoeia Convention. The United States Pharmacopoeia: USP 28 the national formulary: NF 23. 28th rev. of The pharmacopoeia of the U.S. 23rd ed. of the national formulary. Rockville, Md: United States Pharmacopeial Convention, 2004c.

USP XXVIII - United States Pharmacopoeia. Validation of compendial methods <1225>. In: U.S. Pharmacopoeia Convention. The United States Pharmacopoeia: USP 28 the national formulary: NF 23. 28th rev. of The pharmacopoeia of the U.S. 23rd ed. of the national formulary. Rockville, Md: United States Pharmacopeial Convention, 2004d.

Verbeeck RK, Kanfer I, Walker RB. Generic substitution: the use of medicinal products containing different salts and implications for safety and efficacy. Eur J Pharm Sci 2006 may; 28(1-2):1-6.

Vessman J, Stefan RI, Staden JFV, Danzer K, Lindner W, Burns DT *et al.* Selectivity in analytical chemistry. IUPAC Recommendation 2001. Pure & Appl Chem 2001; 73(8) 1381-6.

Vieira S, Hossne WS. Pesquisa médica: A ética e a metodologia. São Paulo: Ed. Pioneira; 1998.161p.

Westlake WJ. Statistical aspects of comparative bioavailability trials. Biometrics 1979; 35(1):273-80.

WHO - World Health Organization. Diabetes: the cost of diabetes. WHO fact sheet. n.236. September 2002a.

WHO - World Health Organization. The World Health Organization Report 2002: Reducing Risks, Promoting Healthy Life. Geneve,WHO, 2002b.

WHO - World Medical Association – WMA. Declaration of Helsinki ethical principles for medical research involving human subjects. Adopted by the 18th WMA General Assembly, Helsinki, Finland, June 1964, and amended by the 29th WMA General Assembly, Tokyo, Japan, October 1975; 35th WMA General Assembly, Venice, Italy, October 1983; 41st WMA General Assembly, Hong Kong, September 1989; 48th WMA General Assembly, Somerset West, Republic of South Africa, October 1996 and the 52nd WMA General Assembly, Edinburgh, Scotland, October 2000; WMA General Assembly, Washington 2002; WMA General Assembly, Tokyo 2004. [acesso em 07 abr 2007] disponível em: URL: <http://ohsr.od.nih.gov/guidelines/guidelines.html>.

WHO - World Health Organization. The World Health Organization and International Diabetes Federation (IDF) Report 2006: Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. Geneve, WHO, 2006.

Williams AE, Stagg HE. Mass spectrometry for the analysis of organic compounds. Analyst 1971; 96(1138):1-24.

9- ANEXOS

	ANEXOS	PÁG.
ANEXO I-	TERMO DE RECRUTAMENTO.....	216
ANEXO II-	PROTOCOLO DE EXAMES LABORATÓRIAS.....	218
ANEXO III-	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	219
ANEXO IV-	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS RESULTADOS DE EXAMES LABORATÓRIAS.....	224
ANEXO V-	PARECER DO CEP.....	229
ANEXO VI-	CERTIFICADO DE ANÁLISE DA CLORPROPAMIDA.....	231
ANEXO VII-	CERTIFICADO DE ANÁLISE DA GLIBENCLAMIDA (PI).....	232
ANEXO VIII-	ESTRUTURA QUÍMICA DO ANALITO (CLORPROPAMIDA) E PI (GLIBENCLAMIDA).....	233
ANEXO IX-	CROMATOGRAMAS.....	234
ANEXO X-	CURVA DE CALIBRAÇÃO E GRÁFICO DA MÉDIA DA ÁREA DO PADRÃO INTERNO.....	236
ANEXO XI-	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SISTEMA EMPREGADO NO TESTE DE SUPRESSÃO IÔNICA.....	237
ANEXO XII-	PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO.....	238
ANEXO XIII-	ESPECTRO DE MASSA DO ANALITO CLORPROPAMIDA.....	239
ANEXO XIV-	ESPECTRO DE MASSA DO PI – GLIBENCLAMIDA.....	240
ANEXO XV-	RELATÓRIO DO PROGRAMA ESTATÍSTICO.....	241
ANEXO XVI-	ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO: no periódico Arzneimittel-Forschung and Drug Research, intitulado: Comparative bioavailability study with two chlorpropamide tablet formulation in healthy volunteers.....	248

ANEXO I - TERMO DE RECRUTAMENTO

TERMO DE RECRUTAMENTO

Nº do Estudo

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: _____

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 do Prof. Dr. _____. 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: (Análise hematológica) Hemoglobina, hematócrito, contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de glóbulos vermelhos, contagem de plaquetas; (análise bioquímica) uréia, creatinina, bilirrubina total, proteínas totais, albumina, glicose em jejum, fosfatase alcalina, SGOT, SGTP, colesterol total, triglicérides, ácido úrico e γ GT; (urina) urina I; (Sorologia) Análise Sorológica para: β -HCG para mulheres, hepatite B, hepatite C e HIV (1 e 2).

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 o Centro de Bioequivalência não identificará o voluntário por ocasião da exposição e/ou publicação dos mesmos.

VI - O Centro de Bioequivalência 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 de Ética em Pesquisas da Unicamp pelo telefone: _____ 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 outro termo denominado termo de consentimento livre e esclarecido antes da administração da medicação.

XI – É condição indispensável para participação nos ensaios clínicos que voluntárias femininas não estejam grávidas, comprovado por exame laboratorial de gravidez.

_____, ____/____/____

Assinatura do voluntário:

Assinatura da pessoa responsável pelo atendimento:

ANEXO II - PROTOCOLO DE EXAMES LABORATORIAIS

FASE	EXAME
RECRUTAMENTO	Hemograma
	Uréia
	Creatinina
	Bilirrubinas
	Proteínas totais
	Albumina
	Glicemia
	Fosfatase alcalina
	Transaminase pirúvica
	Transaminase oxalacética
	Colesterol total
	Triglicérides
	Ácido úrico
	Gama-glutamil transferase
	Sorologia para HIV I e II
	Sorologia para hepatite B
	Sorologia para hepatite C
	Urina I
	Parasitológico de fezes.
	β-HCG para mulheres
EM CADA INTERNAÇÃO	Creatinina
	Transaminase pirúvica
	Transaminase oxalacética
	Hematócrito
	Hemoglobina
	β-HCG para mulheres
PÓS ESTUDO – DENTRO DE 21 DIAS DA ÚLTIMA COLETA	Hemograma
	Uréia
	Creatinina
	Bilirrubinas
	Proteínas totais
	Albumina
	Glicemia
	Fosfatase alcalina
	Transaminase pirúvica
	Transaminase oxalacética
	Colesterol total
	Triglicérides
	Ácido úrico
	Gama-glutamil transferase
	Urina I
	β-HCG para mulheres

ANEXO III - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo de Biodisponibilidade Comparativa de uma Formulação de Teste (clorpropamida - comprimido - 250 mg; Ranbaxy Farmacêutica Ltda) *versus* uma Formulação de Referência (Diabinese[®] - comprimido - 250 mg; Pfizer Inc Brasil) em Voluntários Sadios de ambos os sexos.

Nº do Estudo

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. _____

O abaixo-assinado, _____, _____ anos, RG nº _____ declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, de responsabilidade do médico/pesquisador Prof. Dr. _____. O abaixo-assinado está ciente que:

NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO

O objetivo da pesquisa é verificar se a formulação teste (clorpropamida -comprimido - 250 mg; Ranbaxy Laboratories Limited, Índia) atinge níveis no sangue equivalentes a formulação referência (Diabinese[®] - comprimido - 250 mg; Pfizer Inc Brasil). Você receberá as duas medicações, cada uma em uma ocasião diferente. A ordem que você tomará cada medicação obedecerá a um sorteio.

PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS E RESPONSABILIDADES

Antes de sua participação no estudo e após a sua participação você será convidado a ir à Unidade Ambulatorial para avaliar a sua condição de saúde. Você será examinado por um médico que lhe fará um exame completo, medindo o seu pulso, sua temperatura, sua pressão arterial. Também será feito um exame do coração (eletrocardiograma). O médico lhe perguntará se você teve ou tem alguma doença e se você faz uso

de algum medicamento. 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, transaminases oxalacética e pirúvica, gama-glutamil transferase, creatinina, uréia, ácido úrico, colesterol e triglicerídeos), β -HCG para mulheres e exame sumário de urina (Urina I). Exames para a hepatite B e C e para AIDS (HIV 1 e HIV 2), no sangue, e exame de fezes (protoparasitológico), serão feitos somente no pré-estudo.

Durante o estudo, você será internado 2 vezes por aproximadamente 52 horas cada período, na Unidade Clínica, com intervalo mínimo de 21 dias. Em cada internamento, a) será colhida uma amostra de sangue para dosagem de hemoglobina, hematócrito, creatinina, SGOT, SGTP, β -HCG para mulheres; b) será administrado 250 mg de clorpropamida, acompanhado de 240 mL de água mineral sem gás; c) serão coletadas 21 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 (somente na primeira internação) 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 [se não interferir com o jejum]; desjejum, almoço, lanche da tarde, jantar e ceia no dia de administração do medicamento; desjejum, almoço, lanche e jantar no dia de alta) ou bebidas em horários preestabelecidos. Após a coleta de 36 horas da medicação horas você receberá alta da Unidade Clínica. Um total aproximado de 267 mL de sangue será colhido durante todo o estudo.

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

RESPONSABILIDADES

É condição indispensável, para participação no ensaio clínico, que esteja em boa saúde e, portanto, não esteja no momento sob tratamento médico ou fazendo uso de quaisquer drogas ou medicações e que tampouco tenha participado de outro estudo clínico com medicamentos nos últimos 3 meses. Algumas regras deverão ser seguidas para sua participação no estudo: a) não pode ser dependente de drogas ou álcool e caso o Pesquisador tenha alguma suspeita, poderá solicitar exame de urina para detecção do uso de drogas; b) não pode ter doado (ou retirado/perdido por qualquer motivo) sangue ou plasma dentro dos três meses que antecedem o estudo, ou ter 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.

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 Clínica 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 clorpropamida de maneira continuada pode causar reações como: icterícia colestática, náuseas, diarreias, vômitos, anorexia e fome. Entretanto o aparecimento de efeitos indesejáveis após administração em dose única de clorpropamida 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. Conseqüentemente, não se espera que a participação no estudo traga qualquer benefício em função do tratamento.

INTERCORRÊNCIAS (efeitos indesejáveis)

Se você sofrer algum malefício em decorrência direta de sua participação no estudo, você receberá tratamento desta Instituição, sem qualquer custo. Não haverá, no entanto qualquer compensação de ordem financeira em função do ocorrido, a não ser que a condição faça jus da indenização prevista no Seguro de Vida em Grupo 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 _____. Contarão também com plano de saúde para cobertura de despesas relacionadas com eventos adversos através da empresa _____.

RESSARCIMENTO

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

Estima-se que durante o período de sua participação no Estudo vocês terão como despesa apenas os gastos de deslocamento da residência ou trabalho até a Unidade Ambulatorial para a realização dos exames e consultas, bem como coletas de amostras após a alta. 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 nesta Instituição.

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

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

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

A interrupção não causará prejuízo ao seu atendimento, cuidado e tratamento pela equipe do Centro de Bioequivalência.

DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES QUANTO A PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

Os registros que possam identificar sua identidade serão mantidos em sigilo, a não ser que haja obrigação legal de divulgação. O Centro de Bioequivalência não identificará o voluntário por ocasião da publicação dos resultados obtidos.

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

CONTATOS E PERGUNTAS

Caso surja alguma intercorrência, deverá procurar o Centro de Bioequivalência (Fone: _____) e solicitar que o mesmo contate os médicos responsáveis pelo ensaio clínico ou então entrar em contato diretamente com os mesmos nos telefones indicados no final deste *Termo de Consentimento*.

Poderá contatar o Pesquisador Médico responsável pelo estudo, a Gerente de Pesquisa Clínica ou o Médico

Atendente para receber informações adicionais, relacionadas à pesquisa ou quanto aos seus direitos como voluntário.

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

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

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

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

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

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

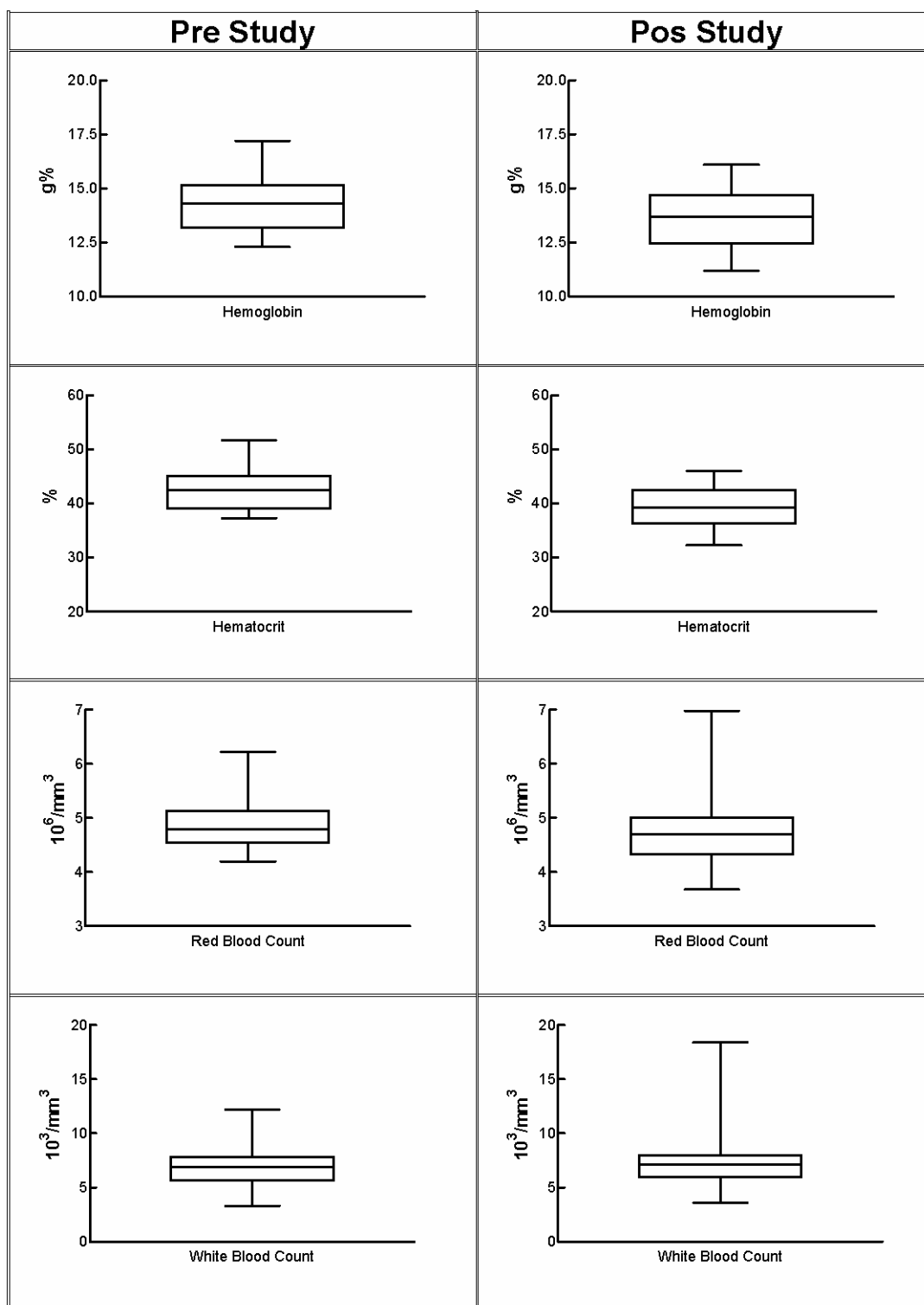
_____, ____/____/____

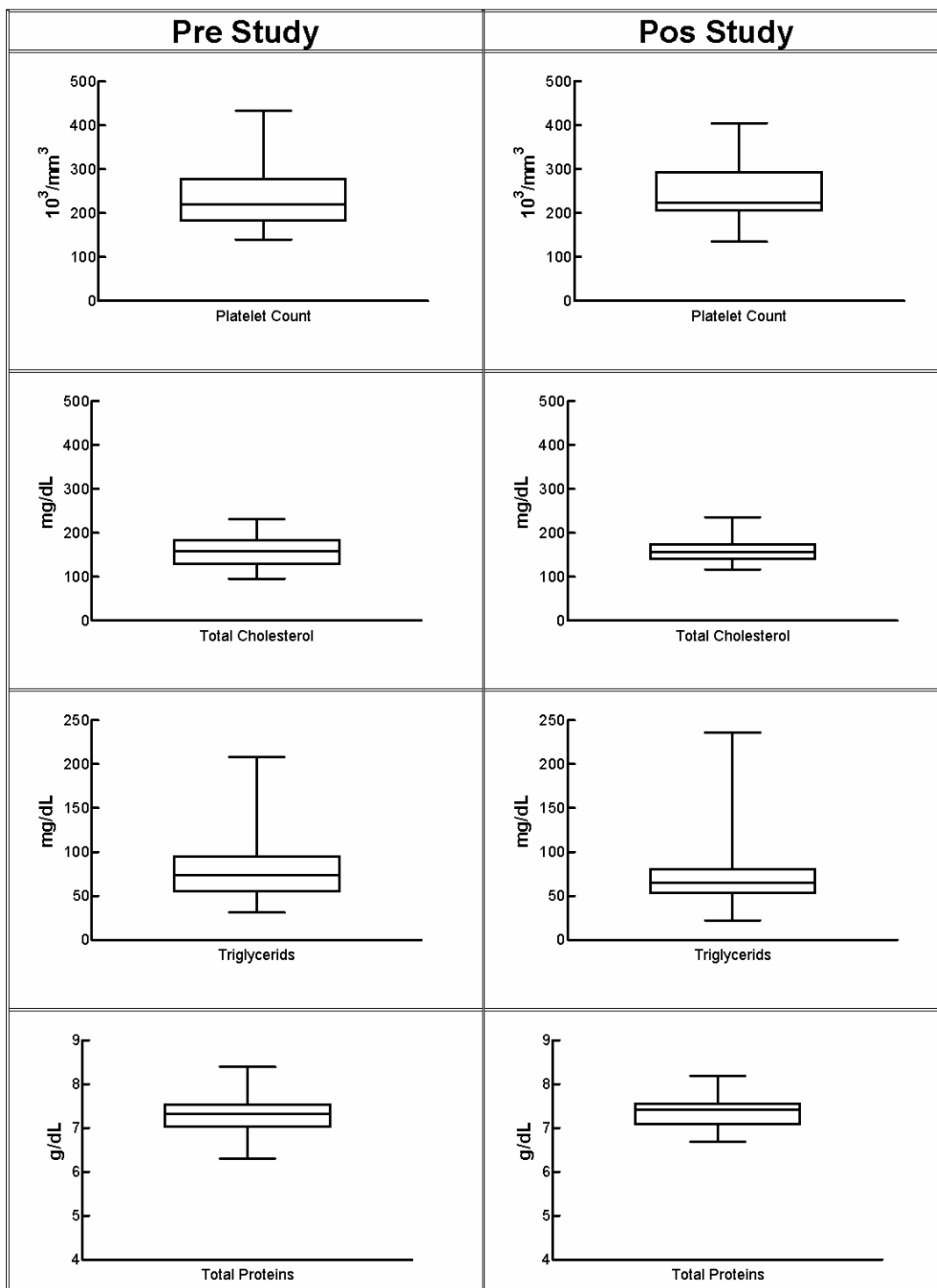
NOME DO VOLUNTÁRIO	DATA	Assinatura
PESSOA QUE ESTÁ OBTENDO O TERMO DE CONSENTIMENTO	DATA	Assinatura
TESTEMUNHA (Somente necessário se o voluntário não souber ler)	DATA	Assinatura

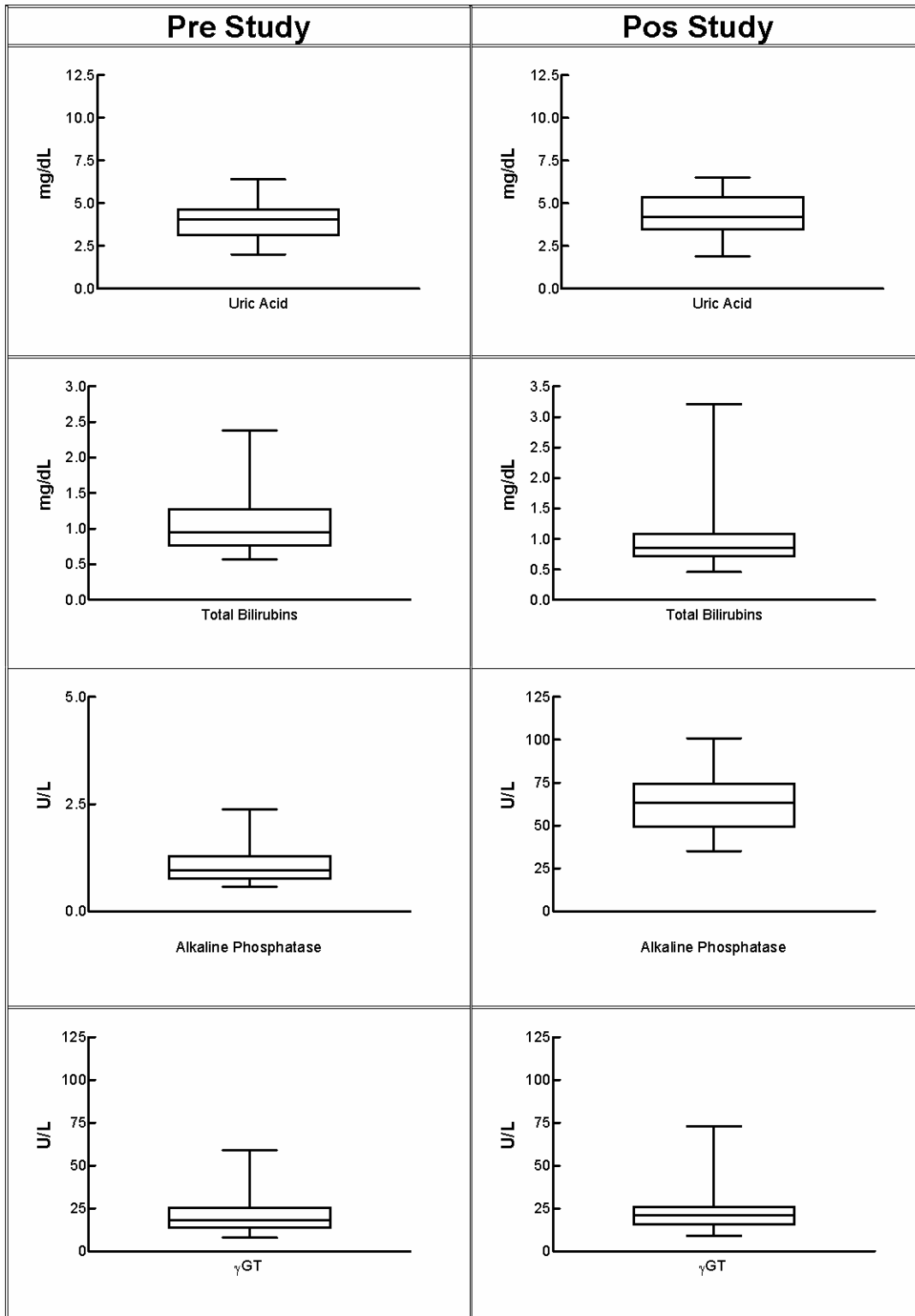
CONTROLE INTERNO N° do Estudo: ____/____ N° do Voluntário: _____

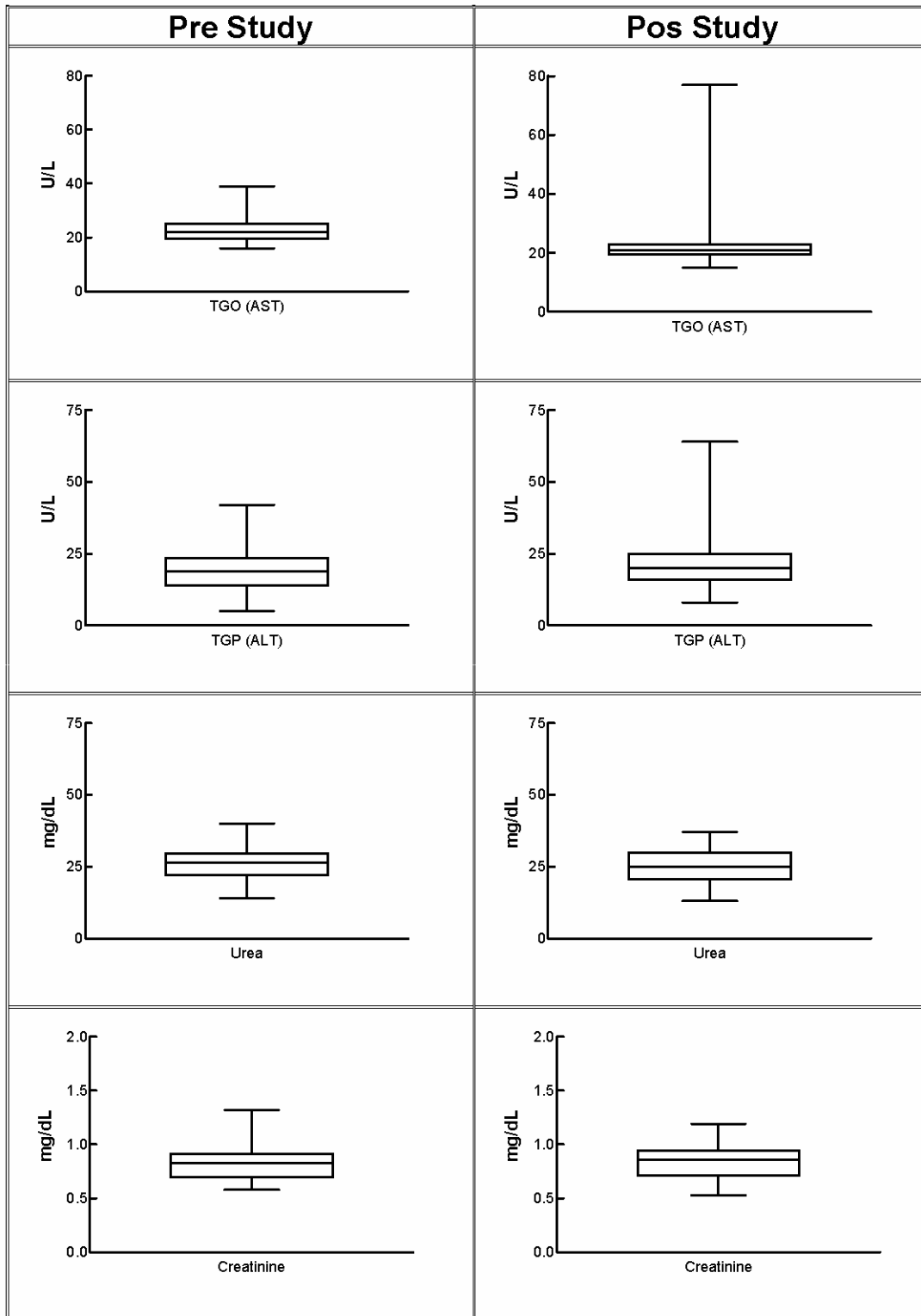
TELEFONES PARA CONTATO:

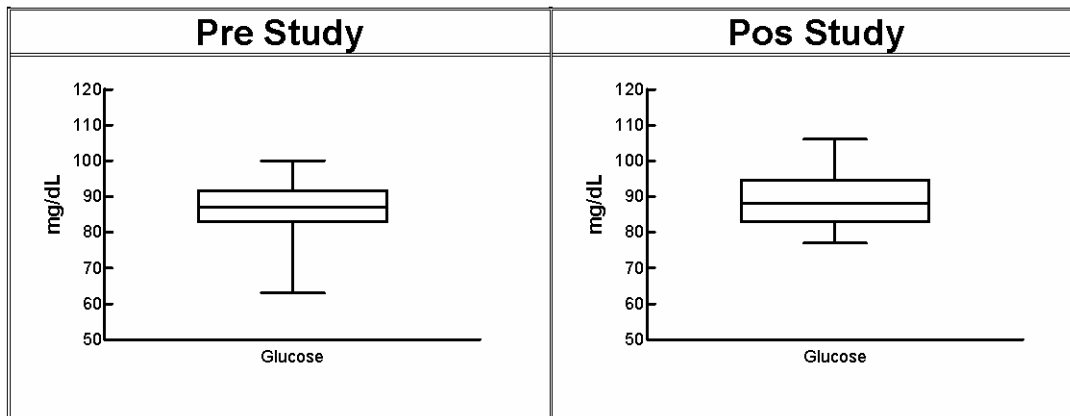
ANEXO IV- REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS RESULTADOS DE EXAMES LABORATORIAIS











ANEXO V - PARECER DO CEP



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP
☎ (0_19) 3788-8936
FAX (0_19) 3788-8925
🌐 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html
✉ cep@fcm.unicamp.br

CEP, 15/02/05.
(Grupo II)

PARECER PROJETO: N° 045/2005

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "ESTUDO DA BIODISPONIBILIDADE COMPARATIVA DE UMA FORMULAÇÃO DE TESTE (CLORPROPAMIDA – COMPRIMIDO – 250 MG; RANBAXY LABORATORIES LIMITED, DEWAS, ÍNDIA) VERSUS UMA FORMULAÇÃO DE REFERÊNCIA (DIABINESE®-COMPRIMIDO-250 MG; PFIZER INC BRASIL) EM VOLUNTÁRIOS SADIOS DE AMBOS OS SEXOS-GND 017/05."
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Gilberto de Nucci
INSTITUIÇÃO: Clínica de Repouso Itapira
APRESENTAÇÃO AO CEP: 14/02/2005
APRESENTAR RELATÓRIO EM: 15/08/05 e 15/02/06

II - OBJETIVOS

Avaliar comparativamente a biodisponibilidade de dois produtos a fim de determinar se são equivalentes.

III - SUMÁRIO

É um estudo aberto, randomizado, cruzado, com dois tratamentos, onde 36 voluntários de ambos os sexos, com idade entre 18 e 55 anos, recebem, em cada período distinto, a formulação teste ou a formulação referência, havendo por conseguinte dois braços de tratamento. As formulações são administradas em dose única por via oral seguidos de coletas de sangue de pelo menos 3 meias-vidas. Os períodos de tratamento devem obedecer um intervalo mínimo de 7 meias-vidas entre eles.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O estudo está bem estruturado. O Termo de Consentimento é adequado e contém todas as informações para que o voluntário decida se quer ou não participar do estudo. Os critérios de inclusão e exclusão são adequados, bem como a forma de recrutamento dos voluntários.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e

- 1 -

atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

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

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

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

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na II Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 15 de fevereiro de 2005.


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

ANEXO VI – CERTIFICADO DE ANÁLISE DA CLORPROPAMIDA



SIGMA-ALDRICH

Certificateof**Analysis**

Product Name	Chlorpropamide, ~97%
Product Number	C1290
Product Brand	Sigma
CAS Number	94-20-2
Molecular Formula	$C_{10}H_{13}ClN_2O_3S$
Molecular Weight	276.74

TEST

APPEARANCE

SOLUBILITY

PURITY BY NaOH TITRATION

PURITY BY HPLC

QC ACCEPTANCE DATE

LOT 031H0722 RESULTS

WHITE POWDER

CLEAR COLORLESS SOLUTION AT 200 MG PLUS 4 ML OF ETHANOL

99.6%

99.9%

AUGUST 2003

ANEXO VII – CERTIFICADO DE ANÁLISE DA GLIBENCLAMIDA (PI)

USV LIMITED
B.S.D. Merg, (Govandi Station Road),
Govandi, Mumbai - 400 088. INDIA
Tel. : + 91 (22) 558 4048 / 49 / 50 / 51
Fax : + 91 (22) 558 4025 / 551 5608
Email: international@usv.co.in

MR. USADA
NO DESENVOLVIMENTO.



CERTIFICATE OF ANALYSIS

Name of the product : **Glibenclamide BP**
Batch no. : CH0033
Date of manufacture : September 2000
Date of expiry : August 2005
Date of analysis : 23/09/2000
Analytical report no. : GB047/2000-2001

Test	Results	Limits
Characters	A almost white powder. Practically insoluble in water and in ether; slightly soluble in alcohol & in methanol.	As per BP Practically insoluble in water and in ether; slightly soluble in alcohol & in methanol.
Identification		
Test A	Melting point : 172°C	169°C - 174°C
Test B	Complies	As per BP
Test C	Complies	As per BP
Test D	Complies	As per BP
Test E	Complies	As per BP
Appearance of solution	Complies	As per BP
Heavy metals	Complies	Not more than 20 ppm
Related substances	Complies	As per BP
Loss on drying	0.12%	Not more than 1.0%
Sulphated ash	0.04%	Not more than 0.1%
Assay as $C_{23}H_{28}ClN_3O_5S$ (on dried basis)	99.23%	Not less than 99% & Not more than 101%
Particle size Smaller than 20 μ	100%	100% less than 20 μ

Remark : The sample passes as per BP 1999.

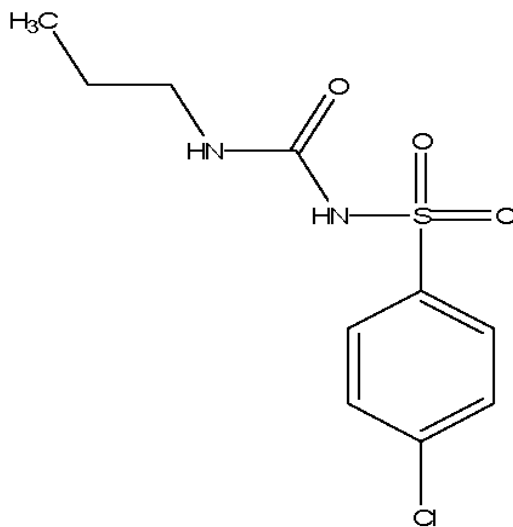
Prepared By

BARRERA FARMACÉUTICA E REPRES. LTDA
Rua Batatais, 602 - Conj. 32
Jd. Paulista - CEP 01423-010- São Paulo - SP
Tel.: (011) 3885-9497 - Fax: (011) 3885-2705
E-Mail: barrera@osite.com.br

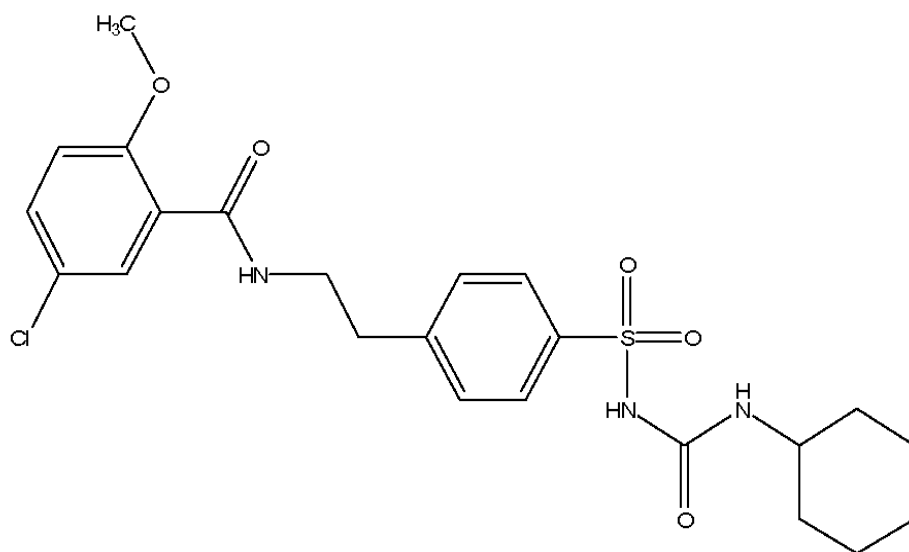
Manager – Quality Assurance

ANEXO VIII – ESTRUTURA QUÍMICA DO ANALITO (CLORPROPAMIDA) E PI (GLIBENCLAMIDA)

ESTRUTURA QUÍMICA CLORPROPAMIDA



ESTRUTURA QUÍMICA GLIBENCLAMIDA



I.S.

ANEXO IX - CROMATOGRAMAS

TESTE DE SUPRESSÃO IÔNICA

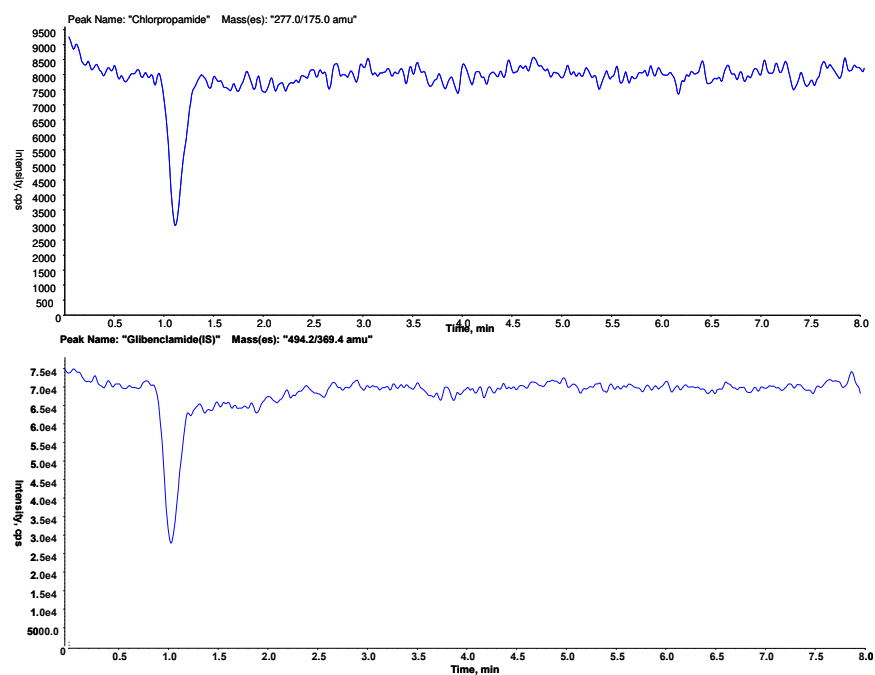


Figura 5- Perfil da linha de base após injeção de plasma branco demonstrando ausência de supressão iônica

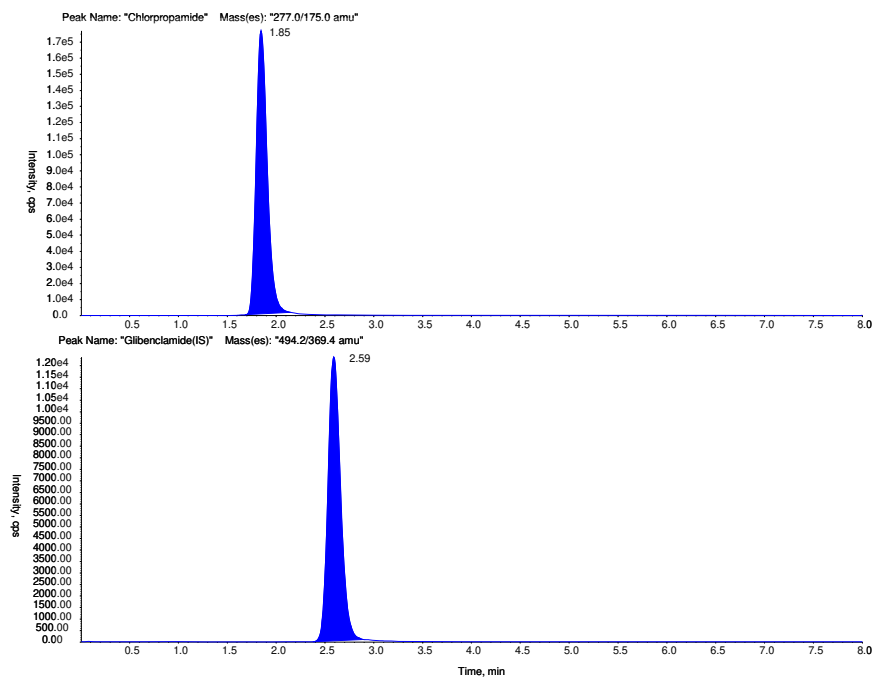


Figura 6- Cromatograma após injeção de amostra com o analito e padrão interno (PI)

ESPECIFICIDADE

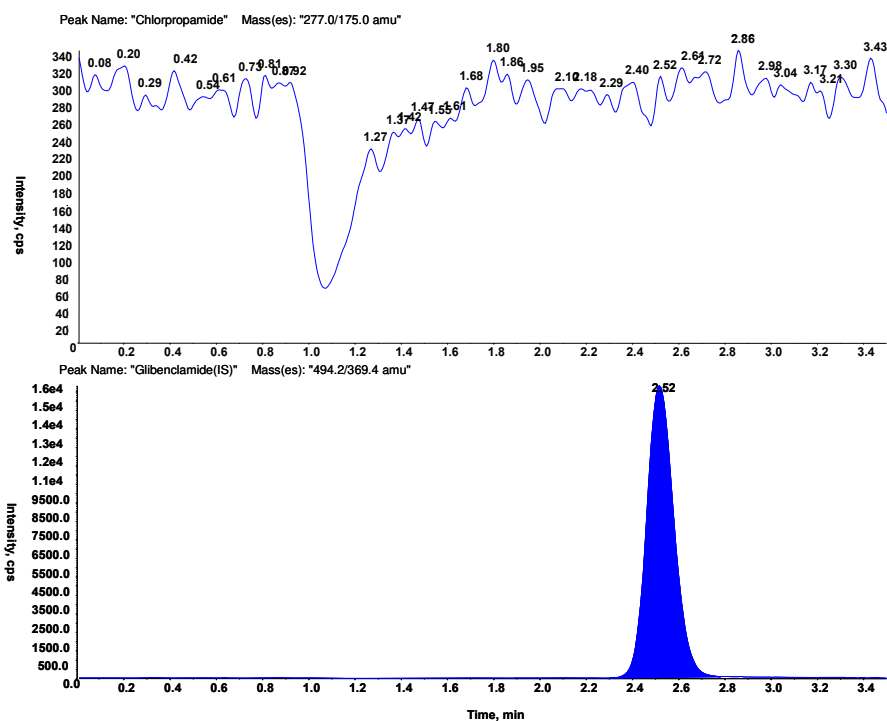


Figura 7- Cromatograma referente à amostra de um pool de plasma branco normal e PI

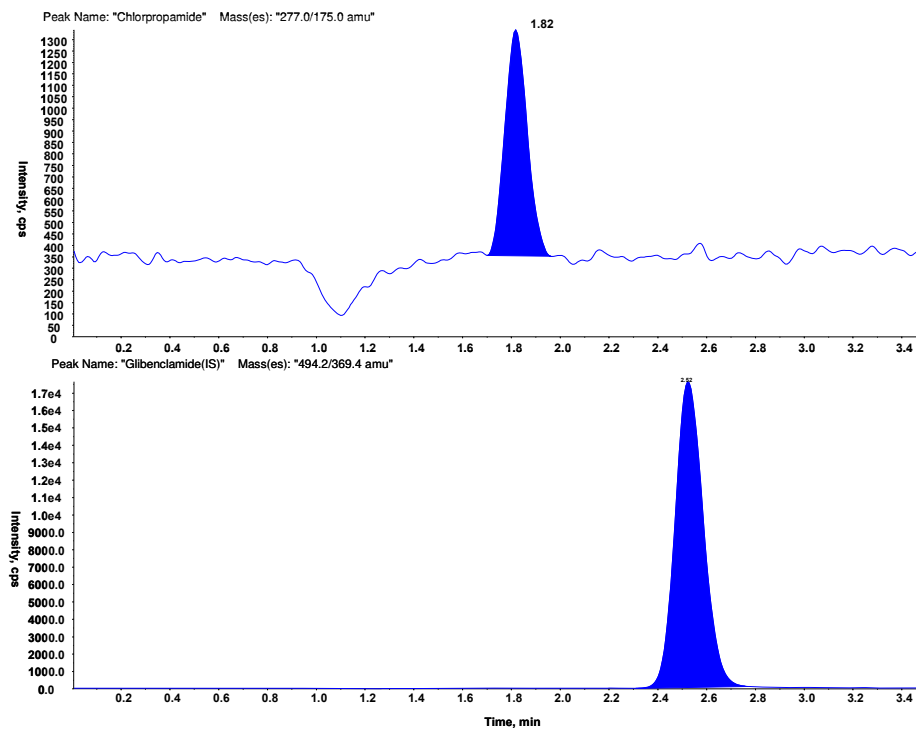


Figura 8- Cromatograma referente a uma amostra de pool de plasma branco normal com analito na concentração do LIQ e PI.

ANEXO X - CURVA DE CALIBRAÇÃO E GRÁFICO DA MÉDIA DA ÁREA DO PADRÃO INTERNO

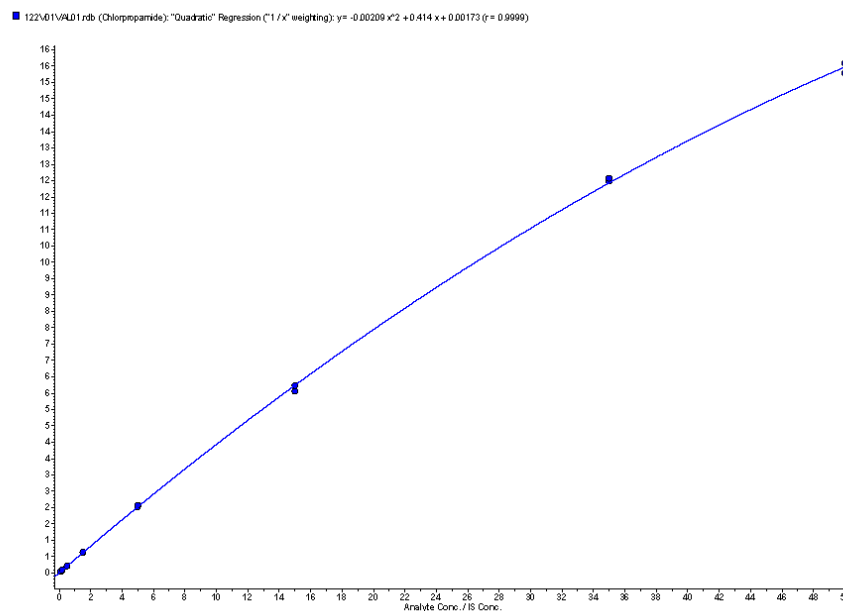
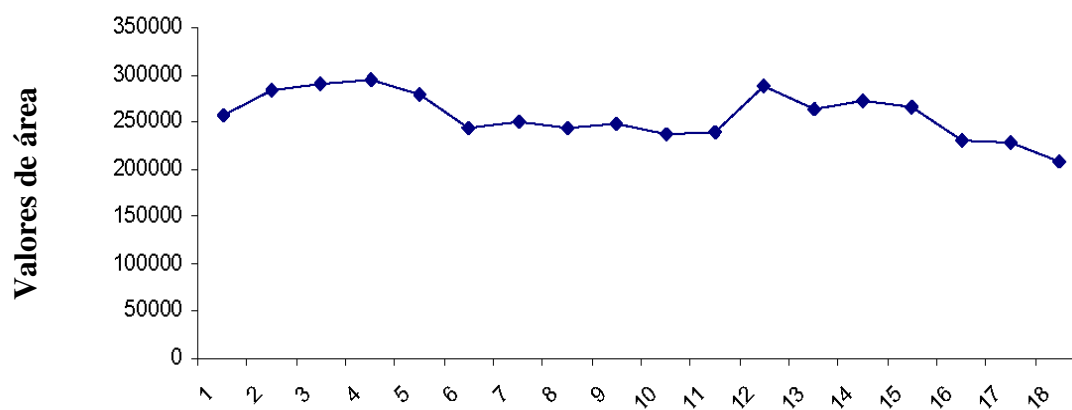


Figura 9- Curva de calibração

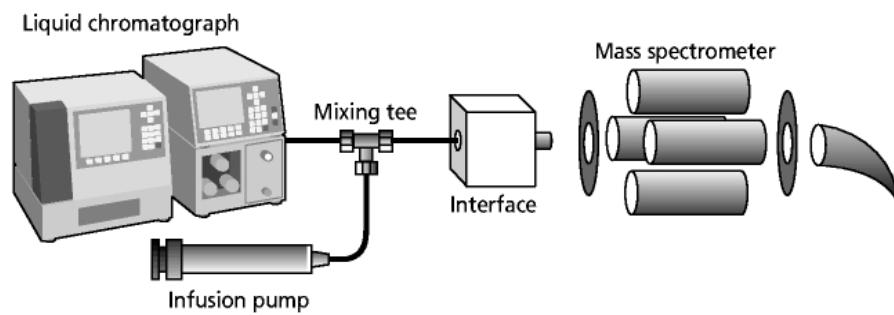
Área média do PI de todos os lotes de amostras (listas) do estudo



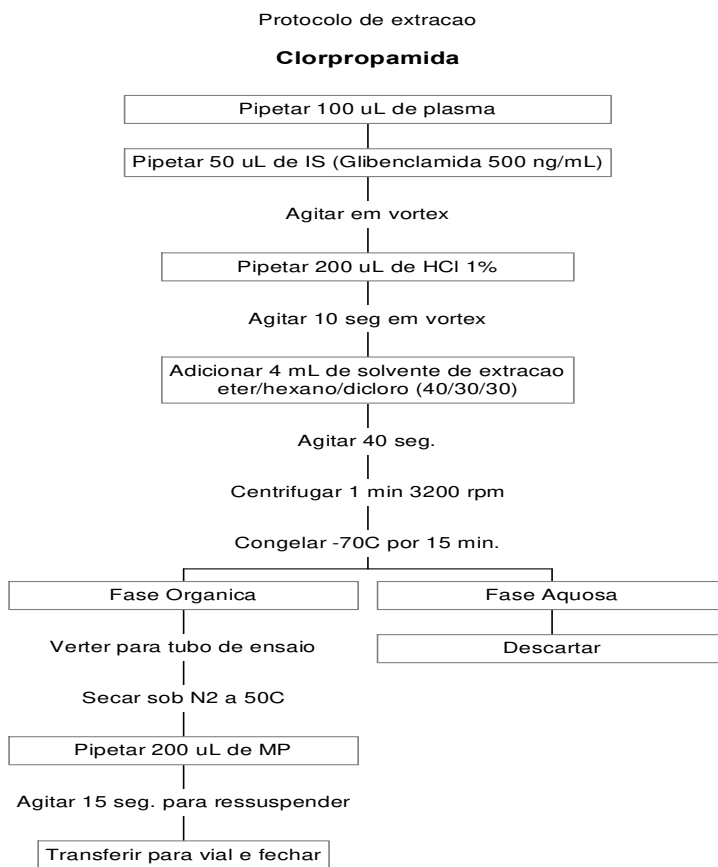
Lotes de amostras (Listas)

Figura 10- Média da área do PI

ANEXO XI - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SISTEMA EMPREGADO NO TESTE DE SUPRESSÃO IÔNICA

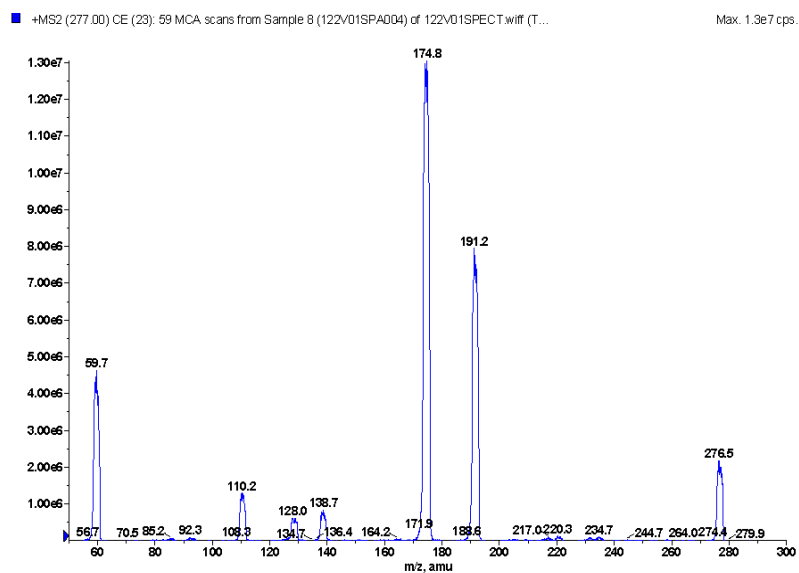
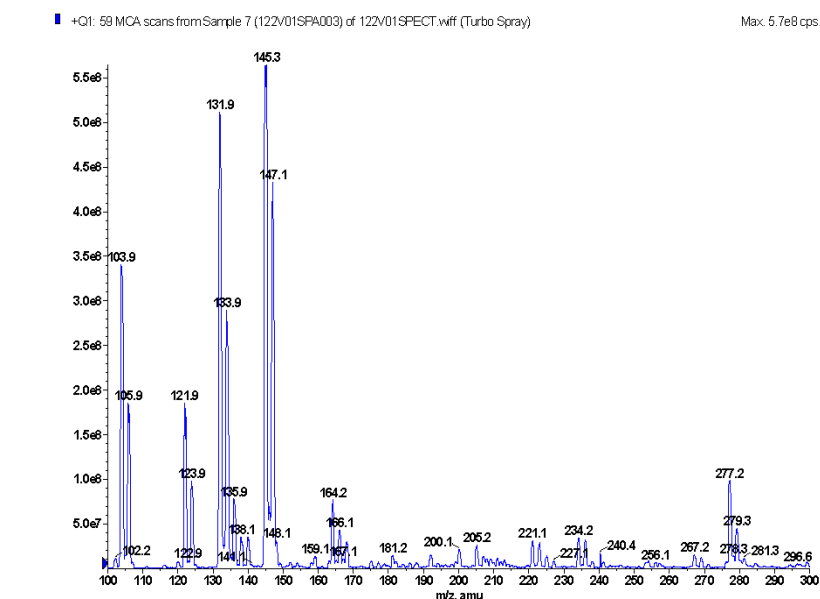


ANEXO XII – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO



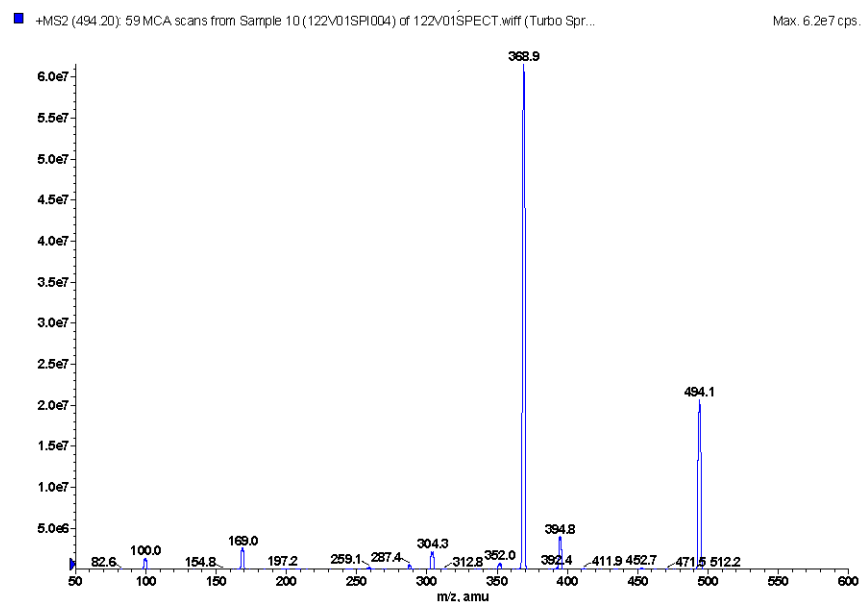
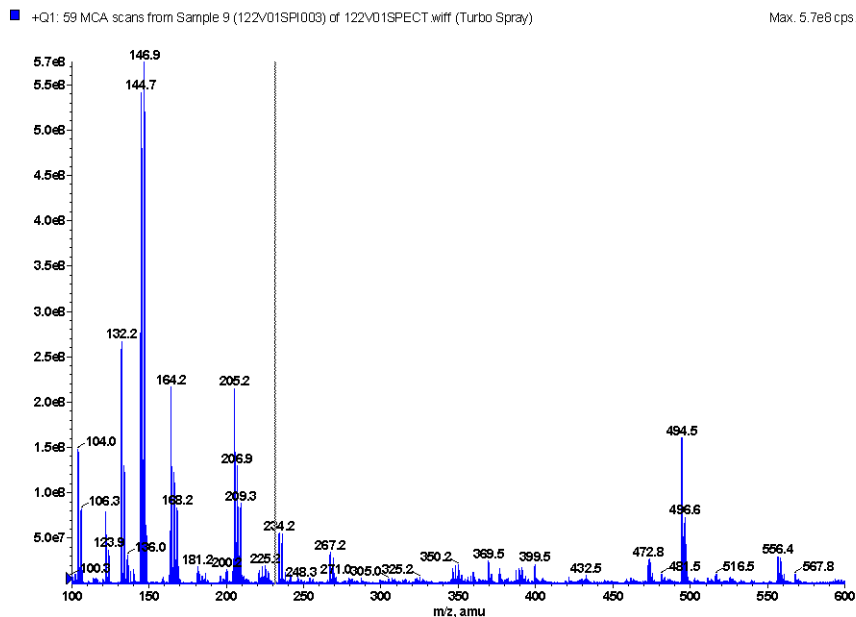
ANEXO XIII - ESPECTRO DE MASSA DO ANALITO CLORPROPAMIDA

ESPECTRO DE MASSA CID PARA O ANALITO (ÍON PRECUSSOR E ÍON PRODUTO)



ANEXO XIV - ESPECTRO DE MASSA DO PI - GLIBENCLAMIDA

ESPECTRO DE MASSA CID PARA GLIBENCLAMIDA (ÍON PRECUSSOR E ÍON PRODUTO)



ANEXO XV - RELATÓRIO DO PROGRAMA ESTATÍSTICO

Chlorpropamide vs. Diabinese[®] tablet formulation C_{max} parametric analysis of ln-transformed data

Bioavailability Statistics Dependent variable: Ln (Cmax)

Alpha=0.0500 Bioequivalence Limits: (A.H.) Lower= 0.800 (A.H.)

Upper= 1.250

Transformation = LN Percent of Reference to Detect = 0.20

Formulation variable: formname Reference: reference Least
squares mean=3.522594, s.e. =0.031742

Test: test Least squares

mean=3.460613, s.e.=0.031742

Difference = -0.0619,

s.e.d.= 0.0448, df= 33 Ratio

= 93.9901 Classical

Westlake

C.L. 80% = (88.6304 , 99.6739) (90.4477 , 109.5523)

C.L. 90% = (87.1124 , 101.4107) (88.6237 , 111.3763)

C.L. 95% = (85.7843 , 102.9808) (87.1085 , 112.8915)

Two One Sided T-tests Prob(< 80%)=0.0005

Prob(> 125%)=0.0000 Max=0.0005 Total=0.0005

A.H. p-value = 0.0005 Power = 0.9970

Chlorpropamide vs. Diabinese[®] tablet formulation

AUC_{0-72:00h} parametric analysis of ln-transformed data

Bioavailability Statistics Dependent variable:

ln(AUCall)Alpha=0.0500 Bioequivalence Limits: (A.H.)Lower=
0.800 (A.H.)Upper= 1.250

Transformation = LN Percent of Reference to Detect = 0.20

Formulation variable: formname Reference: reference Least
squares mean=7.048378, s.e.=0.030446

Test: test Least squares

mean=6.969901, s.e.=0.030446

Difference = -0.0784,

s.e.d.= 0.0430, df= 33 Ratio

= 92.4524 Classical

Westlake

C.L. 80% = (87.3898 , 97.8083) (89.1185 , 110.8815)

C.L. 90% = (85.9537 , 99.4424) (87.3898 , 112.6102)

C.L. 95% = (84.6964 , 100.9186) (85.9546 , 114.0454)

Two One Sided T-tests Prob(< 80%)=0.0009

Prob(> 125%)=0.0000 Max=0.0009 Total=0.0009

A.H. p-value = 0.0009 Power = 0.9983

WinNonlin – ANÁLISE ESTATÍSTICA (Teste x Referência)

WINNONLIN ANALYSIS OF VARIANCE PROGRAM (V01.5A) Core
Version 30Jun97

Dependent variable: Ln(Cmax)

Total Observations: 70 Observations Used: 70

Model Sum of Squares: 2.4677525 df 36 Error Sum
of Squares: 1.1628417 df 33 Mean Square Error:
0.0352376

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect SS df F Prob

Seq	0.0566709	1	1.61	0.2136	Subject (Seq)	2.3433339	33	2.02
0.0240	Period	0.0005738	1	0.02	0.8992	Form Name	0.0671739	1
1.91			0.1767					

Weighted Squares of Means (Type 3)

Effect SS df F Prob

Seq	0.0566709	1	1.61	0.2136	Subject (Seq)	2.3433339	33	2.02
0.0240	Period	0.0009828	1	0.03	0.8684	Form Name	0.0671739	1
1.91			0.1767					

WINNONLIN ANALYSIS OF VARIANCE PROGRAM
(V01.5A) Core Version 30Jun97

Contrasts

Dependent variable: Ln(Cmax)

Sequential Sum of Squares (Type 1) Contrast Effect SS df F Prob

C vs. T	0.0671739	1	1.91	0.1767	Contrast:	1	-1
---------	-----------	---	------	--------	-----------	---	----

WINNONLIN ANALYSIS OF VARIANCE PROGRAM
(V01.5A) Core Version 30Jun97

Hypothesis Tests

Dependent variable: Ln(Cmax)

Effect SS df F Prob

Sequential Sum of Squares (Type 1) Test Seq 0.0566709 1 0.80
0.3781

Using Subject (Seq) as error term

WINNONLIN ANALYSIS OF VARIANCE PROGRAM
(V01.5A) Core Version 30Jun97

Least Squares Means

Dependent variable: Ln(Cmax) period

Value Std. Error 1.0000 3.495352
0.031743

2.0000 3.487855 0.031743

WINNONLIN ANALYSIS OF VARIANCE PROGRAM
(V01.5A) Core Version 30Jun97

Bioavailability Statistics Dependent variable: Ln(Cmax)

Alpha=0.0500 Bioequivalence Limits: (A.H.)Lower= 0.800

(A.H.)Upper= 1.250

Transformation = LN Percent of Reference to Detect = 0.20

Formulation variable: form name Reference: reference Least
squares mean=3.522594, s.e.=0.031742

Test: test Least squares mean=3.460613,
s.e.=0.031742 Difference = -0.0619,
s.e.d.= 0.0448, df= 33 Ratio =93.9901

Classical Westlake

C.L. 80% = (88.6304 , 99.6739) (90.4477 , 109.5523)
C.L. 90% = (87.1124 , 101.4107) (88.6237 , 111.3763)
C.L. 95% = (85.7843 , 102.9808) (87.1085 , 112.8915)

Two One Sided T-tests Prob(< 80%)=0.0005

Prob(> 125%)=0.0000 Max=0.0005 Total=0.0005

A.H. p-value = 0.0005 Power = 0.9970

WINNONLIN ANALYSIS OF VARIANCE PROGRAM
(V01.5A) Core Version 30Jun97

Dependent variable: Ln(AUCall) Total Observations:70 Observations
Used: 70

Model Sum of Squares: 2.1093300 df36 Error Sum of
Squares: 1.0697612 df 33 Mean Square Error:
0.0324170

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect SS df F Prob

Seq 0.1642771 1 5.07 0.0312 Subject (Seq) 1.8051905 33 1.69
0.0690 Period 0.0321755 1 0.99 0.3264 Form Name 0.1076868 1
3.32 0.0774

Weighted Squares of Means (Type 3)

Effect SS df F Prob

Seq 0.1642771 1 5.07 0.0312 Subject (Seq) 1.8051905 33 1.69
0.0690 Period 0.0355994 1 1.10 0.3023 Form Name 0.1076868 1
3.32 0.0774

WINNONLIN ANALYSIS OF VARIANCE PROGRAM
(V01.5A) Core Version 30Jun97

Contrasts

Dependent variable: Ln(AUCall)

Sequential Sum of Squares (Type 1) Contrast Effect SS df F Prob
C vs. T 0.1076868 1 3.32 0.0774 Contrast: 1 -1

WINNONLIN ANALYSIS OF VARIANCE PROGRAM
(V01.5A) Core Version 30Jun97

Hypothesis Tests

Dependent variable: Ln(AUCall)

Effect SS df F Prob

Sequential Sum of Squares (Type 1) Test Seq 0.1642771 1 3.00
0.0924 Using Subject(Seq) as error term

WINNONLIN ANALYSIS OF VARIANCE PROGRAM
(V01.5A) Core Version 30Jun97

Least Squares Means

Dependent variable: Ln(AUCall) period

Value Std. Error 1.0000 7.031700
0.030446

2.0000 6.986579 0.030446

WINNONLIN ANALYSIS OF VARIANCE PROGRAM
(V01.5A)Core Version 30Jun97

Bioavailability Statistics Dependent variable: Ln(AUCall)

Alpha=0.0500 Bioequivalence Limits: (A.H.)Lower= 0.800

(A.H.)Upper= 1.250

Transformation = LN Percent of Reference to Detect = 0.20

Formulation variable: form name Reference: reference Least
squares mean=7.048378, s.e.=0.030446

Test: test Least squares

mean=6.969901, s.e.=0.030446

Difference = -0.0784, s.e.d.=

0.0430, df= 33 Ratio = 92.4524

Classical Westlake

C.L. 80% = (87.3898 , 97.8083) (89.1185 , 110.8815)

C.L. 90% = (85.9537 , 99.4424) (87.3898 , 112.6102)

C.L. 95% = (84.6964 , 100.9186) (85.9546 , 114.0454)

Two One Sided T-tests Prob(< 80%)=0.0009

Prob(> 125%)=0.0000 Max=0.0009 Total=0.0009

A.H. p-value = 0.0009 Power = 0.9983

ANEXO XVI - ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO

Comparative Bioavailability Study with Two Chlorpropamide Tablet Formulations in Healthy Volunteers

Márcia Aparecida da Silva¹, Fabiana D. Mendes^{2,3}, Rogério Antonio de Oliveira⁴, Tausif Monif⁵, Anil Patni⁵, Simrit Reyar⁵, Gustavo D. Mendes^{1,2,3}, Gilberto De Nucci^{1,2,3}

¹ Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, SP (Brazil)

² Cartesius Analytical Unit, Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP (Brazil)

³ Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas SP (Brazil)

⁴ Institute of Mathematics and Statistics, Department of Statistics, University of São Paulo, São Paulo, SP (Brazil)

⁵ Ranbaxy Laboratories Ltd., Haryana (India)

Corresponding author: Prof. Dr. Gilberto De Nucci, 415 Jesuino Marcondes Machado Ave., 13092-320, Campinas, SP (Brasil); e-mail: denucci@dglnet.com.br

Objective: The aim of this study was the assessment of the bioequivalence of two formulations (250 mg tablet) of chlorpropamide (CAS 94-20-2) in 36 healthy volunteers of both sexes.

Methods: The study was conducted using an open, randomized, two-period crossover design with a 3-week washout interval. Plasma samples were obtained over a 72-h period. Plasma chlorpropamide concentrations were analyzed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) with positive ion electrospray ionization using multiple reaction monitoring (MRM). From the chlorpropamide plasma concentration vs. time curves, the following pharmacokinetic parameters were obtained: AUC_{0-72h} , AUC_{inf} and C_{max} .

Results: The limit of quantification was 0.1 µg/mL for plasma chlorpropamide analysis. The geometric mean and respective 90 % confidence interval (CI) of Test/ Reference percent ratios were 93.99 % (87.11 %–101.41 %) for C_{max} , 92.45 % (85.96 %–99.44 %) for AUC_{0-72h} and 90.30 % (83.35 %–97.82 %) for AUC_{inf} .

Conclusion: Since the 90 % CI for AUC_{0-72h} , AUC_{inf} and C_{max} ratios were within the 80–125 % interval proposed by the US FDA, it was concluded that chlorpropamide 250 mg tablet (test formulation) was bioequivalent to the reference 250 mg tablet for both the rate and extent of absorption.

Key words Blood glucose-lowering drugs • CAS 94-20-2 • Chlorpropamide, bioavailability, pharmacokinetics • Sulfonylureas

Comparative Bioavailability Study with Two Chlorpropamide Tablet Formulations in Healthy Volunteers

Marcia Aparecida da Silva¹, Fabiana D. Mendes^{2,3}, Rogério Antonio de Oliveira⁴, Tausif Montf⁵, Anil Patni⁵, Simrit Reyar⁵, Gustavo D. Mendes^{1,2,3}, Gilberto De Nucci^{1,2,3}

¹ Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, SP (Brazil)

² Cartesius Analytical Unit, Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP (Brazil)

³ Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas SP (Brazil)

⁴ Institute of Mathematics and Statistics, Department of Statistics, University of São Paulo, São Paulo, SP (Brazil)

⁵ Ranbaxy Laboratories Ltd., Haryana (India)

Corresponding author: Prof. Dr. Gilberto De Nucci, 415 Jesuino Marcondes Machado Ave., 13092-320, Campinas, SP (Brazil); e-mail: denucci@dglnet.com.br

Summary

Objective: The aim of this study was the assessment of the bioequivalence of two formulations (250 mg tablet) of chlorpropamide (CAS 94-20-2) in 36 healthy volunteers of both sexes.

Methods: The study was conducted using an open, randomized, two-period crossover design with a 3-week washout interval. Plasma samples were obtained over a 72-h period. Plasma chlorpropamide concentrations were analyzed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) with positive ion electrospray ionization using multiple reaction monitoring (MRM). From the chlorpropamide plasma concentration vs time curves, the following pharmacokinetic parameters were obtained: AUC_{0-72h} , AUC_{0-12h} and C_{max} .

Results: The limit of quantification was 0.1 µg/mL for plasma chlorpropamide analysis. The geometric mean and respective 90% confidence interval (CI) of Test/Reference percent ratios were 93.99% (87.11%–101.41%) for C_{max} , 92.45% (85.96%–99.44%) for AUC_{0-72h} and 90.30% (83.35%–97.82%) for AUC_{0-12h} .

Conclusion: Since the 90% CI for AUC_{0-72h} , AUC_{0-12h} and C_{max} ratios were within the 80–125% interval proposed by the US FDA, it was concluded that chlorpropamide 250 mg tablet (test formulation) was bioequivalent to the reference 250 mg tablet for both the rate and extent of absorption.

Key words

- Blood glucose-lowering drugs
- CAS 94-20-2
- Chlorpropamide, bioavailability, pharmacokinetics
- Sulfonylureas

Arzneimittel-Forschung
(Drug Research)
2007;57(9):591–598

1. Introduction

Chlorpropamide (1-[(p-chlorophenyl)sulfonyl]-3-propylurea, CAS 94-20-2) is an oral blood-glucose-lowering drug of the sulfonylurea class. The empirical formula is $C_{10}H_{13}ClN_2O_3S$ and weight molecular is 276.74 [1]. Orally active sulfonylurea compounds have been used in the treatment of type 2 diabetes since the 1950s, [2, 3, 4] fol-

lowing the serendipitous discovery a decade earlier that this kind of sulfonamides could reduce blood glucose levels. Chlorpropamide is absorbed rapidly from the gastrointestinal tract [5, 6], with a maximum concentration reached after 1 to 7 h [7]. However, absorption is delayed by food [7, 8], depends on pH [7, 9] and varies from one preparation to another [7, 10]. The biological half-life of chlorpropamide is long, ranging between 24–48 h

for various subjects [5, 6, 7, 9]. Chlorpropamide undergoes extensive hepatic metabolism although the p-chlorobenzene ring remains intact [7]. The major metabolites are 2-hydroxy and 3-hydroxychlorpropamide and p-chlorobenzene sulphonylurea [7, 6], which are more rapidly eliminated than the parent drug [7]. Urinary excretion of unchanged drug is usually about 20% of the ingested dose [7, 6]. Steady-state concentrations of chlorpropamide depend more on its slow elimination than on its absorption; but there is wide inter individual variation. Intra subject variation has not been characterized, but is also likely to be large [7]. The aim of this study was to compare in healthy volunteers of both sexes, the pharmacokinetic profiles and to evaluate the bioequivalence of two chlorpropamide 250 mg tablet formulations. Chlorpropamide plasma levels were measured by high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS-MS).

2. Materials and methods

2.1. Clinical protocol

Thirty-six healthy volunteers of both sexes (18 male and 18 female), aged between 18 and 55 years old (29.3 ± 8.9 , mean $\pm$ sd; range 18–48 years), height between 152 and 182 cm (164.0 ± 8 cm), weight between 51.00 and 77.80 kg (63.7 ± 7.2 kg) and with a Body Mass Index (BMI) greater than 19.70 and less than 26.90 (23.54 ± 1.72 , mean $\pm$ sd; range 19.7–26.9 kg/m²) were selected for the study. The volunteers were free from significant cardiac, hepatic, renal, pulmonary, neurological, gastrointestinal and hematological diseases, as assessed by physical examination, ECG and the following laboratory tests: blood glucose, urea, creatinine, AST, ALT, alkaline phosphatase, γ GT, total bilirubin, uric acid, total cholesterol, triglycerides, albumin and total protein, hemoglobin, hematocrit, total and differential white cell counts, erythrocyte sedimentation rate and routine urinalysis. All subjects were negative for HIV, HBV (except for serological scar) and HCV [11, 12]. The study began with 35 healthy volunteers. One volunteer dropped out by decision (response positive to exclusion criteria) of the clinical investigator before the administration of the second period.

All subjects provided written informed consent and the protocol was approved by the Ethics Committee of State University of Campinas (Unicamp). Any major changes required approval from the Committee. The study was conducted in accordance with the provisions of the Declaration of Helsinki (1964), Tokyo (1975), Venice (1983), Hong Kong (1989), Somerset West (1996) and Edinburgh (2000) revisions [12, 13]. After a screening and wash-out period (of at least 2 weeks), the individuals who qualified were hospitalized for 2 periods of approximately 52 h. The periods were separated by an interval of 3 weeks. The study was conducted in an open, randomized, two-period crossover design. During each period, the volunteers were hospitalized at 3:00 p.m., having already eaten a normal evening meal, and after an overnight fast they received at 7:00 a.m. a single 250 mg dose of the appropriate chlorpropamide tablet formulation along with 240 mL of tap water. Co-administration of food with oral drug products may influence drug bioavailability and/or bioequivalence. Food-effect bioavailability studies focus on the effects of food on the release of the drug substance from the drug product as well as the absorption of the drug substance [8,

14, 15]. No food was allowed during 3 h following drug administration, after which a standard breakfast was consumed. A lunch, coffee break and an evening meal were provided 5, 8 and 11 h 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 or cola were prohibited. Smoking was not allowed during the hospitalization period. At 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36 and 48 h, systolic and diastolic arterial pressure (measured non-invasively with a sphygmomanometer) and heart rate were recorded.

2.2. Formulations

The following formulations were employed: chlorpropamide 250 mg (lot number 1372845, expiration date January 2006) as the test formulation and chlorpropamide 250 mg (lot number 40417006, expiration date March 2007) as the standard reference.

2.3. Drug analysis

Blood samples (5 mL) from a suitable antecubital vein were collected into heparin-containing tubes before and 0.5, 1, 1.5, 2, 2.33, 2.67, 3, 3.33, 3.67, 4, 4.5, 5, 6, 8, 12, 16, 24, 36, 48 and 72 h post-dosing, after the administration of each dose of chlorpropamide. The blood samples were centrifuged at 2000 g for 10 min at room temperature and stored at -20°C until assayed. Chlorpropamide and the internal standard (IS), glibenclamide (CAS 10238-21-8) were extracted from the volunteers' plasma samples and quantified by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) with positive electrospray ionization using multiple reaction monitoring (MRM). Drug plasma extraction was performed using a liquid-phase extraction.

Briefly, 100 μL of each plasma sample were introduced into a glass tube followed by the internal standard (50 μL of glibenclamide solution 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 200 μL of aqueous hydrochloric acid solution (0.12 mol/L) and vortex-mixed for 10 s. Then, 2 mL of the organic solvent mix (diethyl ether/dichloromethane/hexanes (40/30/30; v/v/v)) was added and the samples were vortex for 40 s, performed in a fume cupboard. After centrifugation at 2000 $\times$ g for 1 min and freezing the aqueous phase to -70°C for 20 min, the supernatant was transferred to another tube, in which the organic solvents were evaporated under N_2 at 50°C . The residue was then dissolved with 200 μL of mobile phase (acetonitrile/water (70/30; v/v) + 10 mmol/L acetic acid) and transferred to microvials. The high performance liquid chromatography (HPLC) was performed on C18 4 μm (100 $\times$ 2.1 mm i.d.) at a flow rate of 0.2 mL/min, and the pressure of the system was approximately 3500 kPa. The mobile phase was acetonitrile/water (70/30; v/v) + 10 mmol/L acetic acid.

The column operated at room temperature. The temperature of the auto sampler was maintained at 4°C and the injection volume was 5 μL .

Typical standard retention times were 1.8 ± 0.3 min and 2.5 ± 0.3 min for chlorpropamide and IS, respectively, and the total run-time was 3.0 min. The mass spectrometer (Sciex/Applied Biosystems model API 2000) equipped with an electrospray source using a crossflow counter electrode was run in positive mode (ES+) with multiple reaction monitoring (MRM). The mass spectrometer was set as follows: 277.0 > 175.0 and 494.2 > 369.4, for chlorpropamide and glibenclamide (IS) as the precursor ions m/z and the respective product ions.

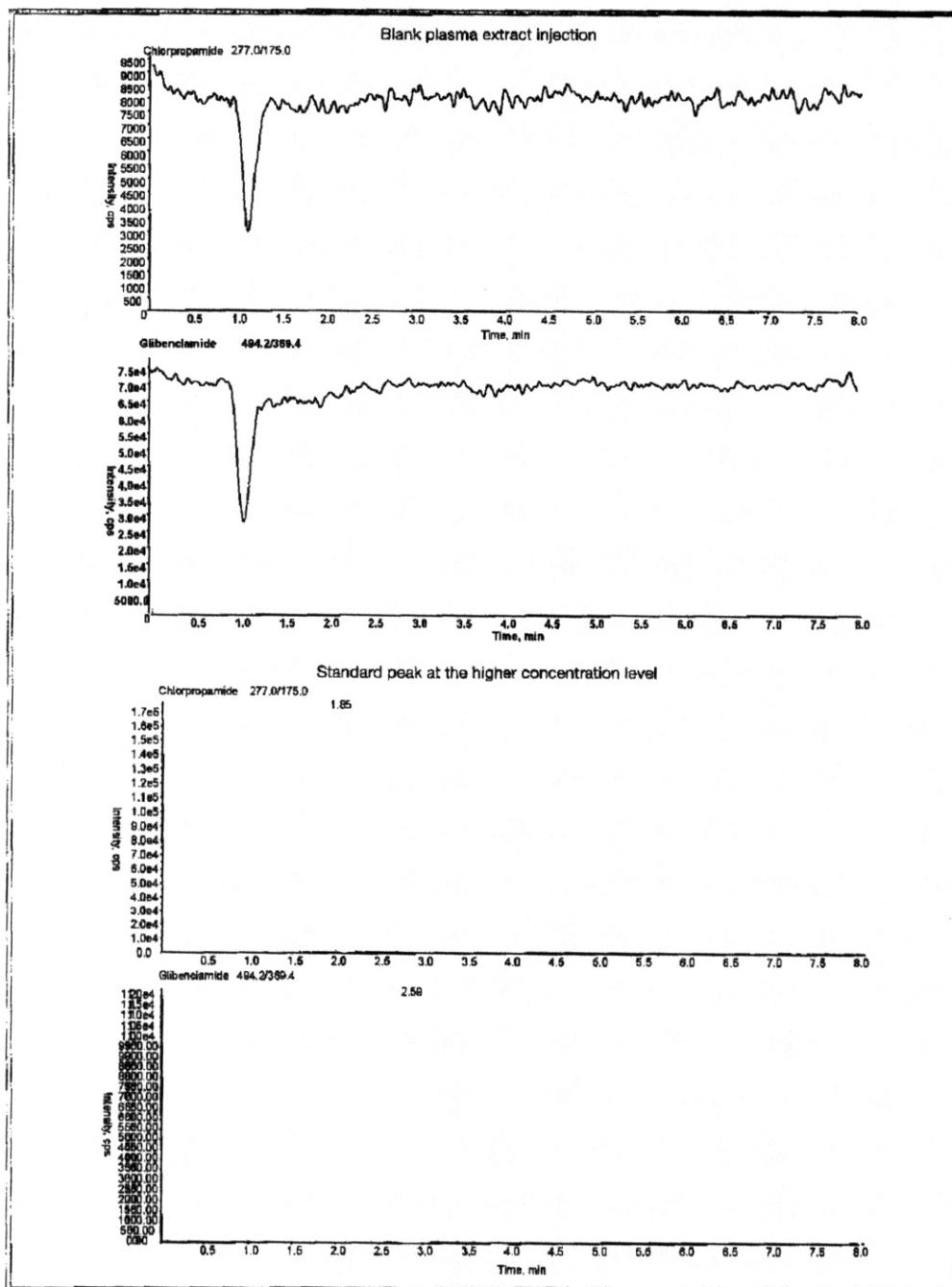


Fig. 1: Ion suppression experiment (baseline profile after the injection of a blank plasma extract and the standard peak at the LOQ level).

2.4. Linearity

Linearity was determined to assess the performance of the method. A quadratic regression with a weighting index of $1/x$ was applied to the peak area ratios of and internal standard vs. the concentrations of the plasma standards of chlorpropamide in duplicate to generate a calibration curve [16].

2.5. Recovery

The recovery was evaluated by dividing the extracted sample mean by the unextracted (spiked blank plasma extract) sample mean of the corresponding concentration. The matrix effect experiments were performed using the ratio between spiked mobile phase solutions and unextracted samples, spiked on plasma residues [16].

2.6. Precision and accuracy

Within- and between-run precision were determined as the coefficient of variation (CV) (%) = $100 (SD/M)$ and the accuracy (%) by $100 (M/T)$, where M is the mean, SD is the standard deviation of M, and T is the theoretical concentration [17].

2.7. Ion suppression

Suppression of the MS signal ("ion suppression") can be caused by contaminants (e. g. salts, proteins, amino acids, etc.) 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 on the variability of the electrospray ionization response should be determined [18, 19].

To assess the effect of ion suppression on the MS/MS signal of the analyte, chlorpropamide, and the internal standard, glibenclamide, the extraction procedure was evaluated. The experimental set-up consisted of an infusion pump connected to the system by a "zero volume tee" before the split and the HPLC system pumping the mobile phase, which was the same as that used in the routine analysis of chlorpropamide. The infusion pump was set to transfer (50.0 $\mu\text{L}/\text{min}$) a mixture of analyte and internal standard in the mobile phase (both 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A sample of human pooled blank plasma was extracted as described above, and the reconstituted extract was injected into the HPLC system while the standard mixture was being infused. In this system, any ion suppression would be observed as a depression of the MS signal.

2.8. Stability

Stability quality control samples (0.3, 3.0 and 40.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were subjected to short-term (23 h) tests at room temperature, three freeze/thaw (-20 to 25°C) cycles, 143 h autosampler stability (4°C), long-term (68 days) stability tests (-20°C), master solution stability tests (after 42 days at 4°C) and working solution stability tests (after 15 h at room temperature). Subsequently, the chlorpropamide concentrations were measured compared to freshly prepared samples [16, 20].

2.9. Pharmacokinetics and statistical analysis

In comparative bioavailability studies between two formulations involving a product with a long half-life, it is recommended to use an AUC truncated at 72 h ($\text{AUC}_{0-72\text{h}}$) and the peak of concentration (C_{max}) to determine whether both drugs are bioequivalent [14]. Our study compared the maximum concentration reached (C_{max}), the Area Under the Curve from

the time of dosing to the 72-h sample ($\text{AUC}_{0-72\text{h}}$) and the area under the curve between the first sample (pre-dosage) and infinity ($\text{AUC}_{0-\infty}$). The $\text{AUC}_{0-72\text{h}}$, $\text{AUC}_{0-\infty}$ and C_{max} data for the two formulations were analyzed by ANOVA to establish whether the 90% CI of the ratios was within the 80–125% interval indicating bioequivalence as proposed by the US Food and Drug Administration [21].

3. Results and discussion

Tolerance of both formulations was good. Seven volunteers complained of cephalaea, and two volunteers of nausea. None of the biochemical parameters monitored presented any clinically relevant alterations. No significant changes in laboratory results were observed [11, 12, 13].

The method was quadratic regression for chlorpropamide concentrations from 0.1 to 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (calibration curve $y = -0.00209 x^2 + 0.414 x + 0.00173$ ($r = 0.9999$)). A quadratic regression with a weighting index of $1/x$ was performed on the peak area ratios of chlorpropamide and the internal standard versus the chlorpropamide concentrations of the eight human plasma standards (in duplicate) to generate a calibration curve. No significant ion suppression was observed in the region where the analyte and the internal standard eluted (Fig. 1).

The recovery of chlorpropamide was $41.2 \pm 4.4\%$, $44.9 \pm 1.4\%$ and $39.0 \pm 4.0\%$ for the 0.3, 3.0, 40.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ standard concentrations, respectively. The recovery of the internal standard was $45.2 \pm 3.7\%$, $47.2 \pm 4.8\%$ and $47.3 \pm 3.2\%$ for the 0.3, 3.0, 40.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ standard con-

Table 1: Quantified concentration of individual samples for intra-batch and inter-batch validation.

Sample ID	Batch ID	Intra-batch mean (in $\mu\text{g}/\text{mL}$) (n = 8)	Intra-batch precision (CV %)	Intra-batch accuracy (%)
LOQ (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	122V01VAL01	0.101	6.9	101
	122V01VAL03	0.086	3.5	86
	122V01VAL04	0.1	11.2	100.4
QCA (0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	122V01VAL01	0.33	2.7	110.2
	122V01VAL03	0.306	4.9	102
	122V01VAL04	0.335	4.8	111.6
QCB (3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	122V01VAL01	3.38	2.6	112.6
	122V01VAL03	3.21	3.6	107.1
	122V01VAL04	3.37	5.2	112.3
QCC (40.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	122V01VAL01	44.8	4.7	112
	122V01VAL03	39.5	4	98.8
	122V01VAL04	39.4	6.5	98.4
Sample ID		Inter-batch mean (in $\mu\text{g}/\text{mL}$) (n = 3)	Inter-batch precision (CV %)	Inter-batch accuracy (%)
LOQ (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)		0.0958	10.8	95.8
QCA (0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$)		0.324	5.7	107.9
QCB (3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)		3.32	4.4	110.7
QCC (40.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)		41.2	7.9	103.1

Table 2: Stability tests for chlorpropamide.

Chlorpropamide post-processing stability test (values in µg/mL)						
	Low sample		Medium sample		High sample	
	Reference values	Values after 143 h	Reference values	Values after 143 h	Reference values	Values after 143 h
Mean (µg/mL)	0.288	0.297	2.81	2.94	37	38
CV (%)	3.9	3.8	2.7	3.9	8.4	3.9
Variation (%)		3.3		4.6		2.8
Chlorpropamide freeze-and-thaw stability test (values in µg/mL)						
	Low sample		Medium sample		High sample	
	Reference values	Values after 3 cycles	Reference values	Values after 3 cycles	Reference values	Values after 3 cycles
Mean (µg/mL)	0.305	0.29	3.16	2.93	37.1	36.6
CV (%)	7.2	5.2	5.6	7.2	12.3	8.1
Variation (%)		-5.0		-7.5		-1.3
Chlorpropamide short-term stability test (values in µg/mL)						
	Low sample		Medium sample		High sample	
	Reference values	Values after 23 h	Reference values	Values after 23 h	Reference values	Values after 23 h
Mean (µg/mL)	0.321	0.32	3.22	3.18	38.4	39.6
CV (%)	2.9	5.8	4.4	3.1	2.7	5.0
Variation (%)		-0.4		-1.3		3.2
Chlorpropamide long-term stability test (values in µg/mL)						
	Low sample		Medium sample		High sample	
	Reference values	Values after 143 h	Reference values	Values after 143 h	Reference values	Values after 143 h
Mean (µg/mL)	0.295	0.288	3.15	3.08	40.1	36.9
CV (%)	9.0	4.4	4.2	3.9	7.9	5.3
Variation (%)		-2.4		-2.2		-7.9

centrations, respectively. No significant matrix effect was observed. The limit of quantification (LOQ), defined as the lowest concentration at which both the precision and accuracy were < 20% [16], was 0.1 µg/mL. The within- and between-run precision and accuracy for the LOQ and QCs are summarized in Table 1.

The stability tests (Table 2) performed indicated no significant degradation under the conditions described above, including the freeze-and-thaw test, the short-term test at room temperature and the long-term test (68 days). The human plasma spiked at final concentrations of 0.3, 3.0, 40.0 µg/mL ($n = 5$ for each concentration).

No endogenous peak was observed in the mass chromatogram of blank plasma. Fig. 2 shows a chromatogram for the standard LOQ sample in which the retention times for chlorpropamide and the internal standard were 1.8 and 2.5 min, respectively, and the running time (RT) was 3 min.

The mean chlorpropamide plasma concentrations vs. time profiles after a single oral dose of each 250 mg tablet formulation are shown in Fig. 3. Table 3 shows the mean pharmacokinetic parameters obtained from volunteers after the administration of 250 mg chlorpropamide. Table 4 shows the geometric means of the individual C_{max} and AUC_{0-12h} and AUC_{0-72h} (test/reference

formulation), the respective 90% confidence intervals (CI), power, and intra-subject CV for the volunteers.

Chlorpropamide has been determined in plasma and other matrix by several methods such as high-pressure liquid chromatography (HPLC) coupled to photodiode array detector (LOQ 5 µg/mL; RT 15 min) [22]; high-performance capillary electrophoresis (HPCE) coupled to ultra-violet detection (LOQ 4.0 µg/mL; RT 4.0 min) [23]; liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry using an ion-trap detector (LOQ 31.25 µg/mL; RT 4 min) [24]. The LC-ESI-MS method described by Magni et al. [25] also shows good sensitivity (0.01 µg/mL), however, a longer running time (15 min) and solid-phase extraction in serum (1 mL) for measurement of chlorpropamide in human plasma. Our method has a suitable LOQ (0.1 µg/mL) for a bioequivalence study coupled to a short running time (3 min), employing an easy liquid-liquid extraction in plasma (0.1 mL). The LC-MS-MS is a very sensitive and selective analytical tool for pharmacokinetic studies, widely used today [26, 27].

After the oral administration of the chlorpropamide tablets to the volunteers, the observed chlorpropamide peak plasma concentration (C_{max}) values and the time values achieved (T_{max}) were similar to those reported in the literature [5, 6, 9, 15, 28, 29].

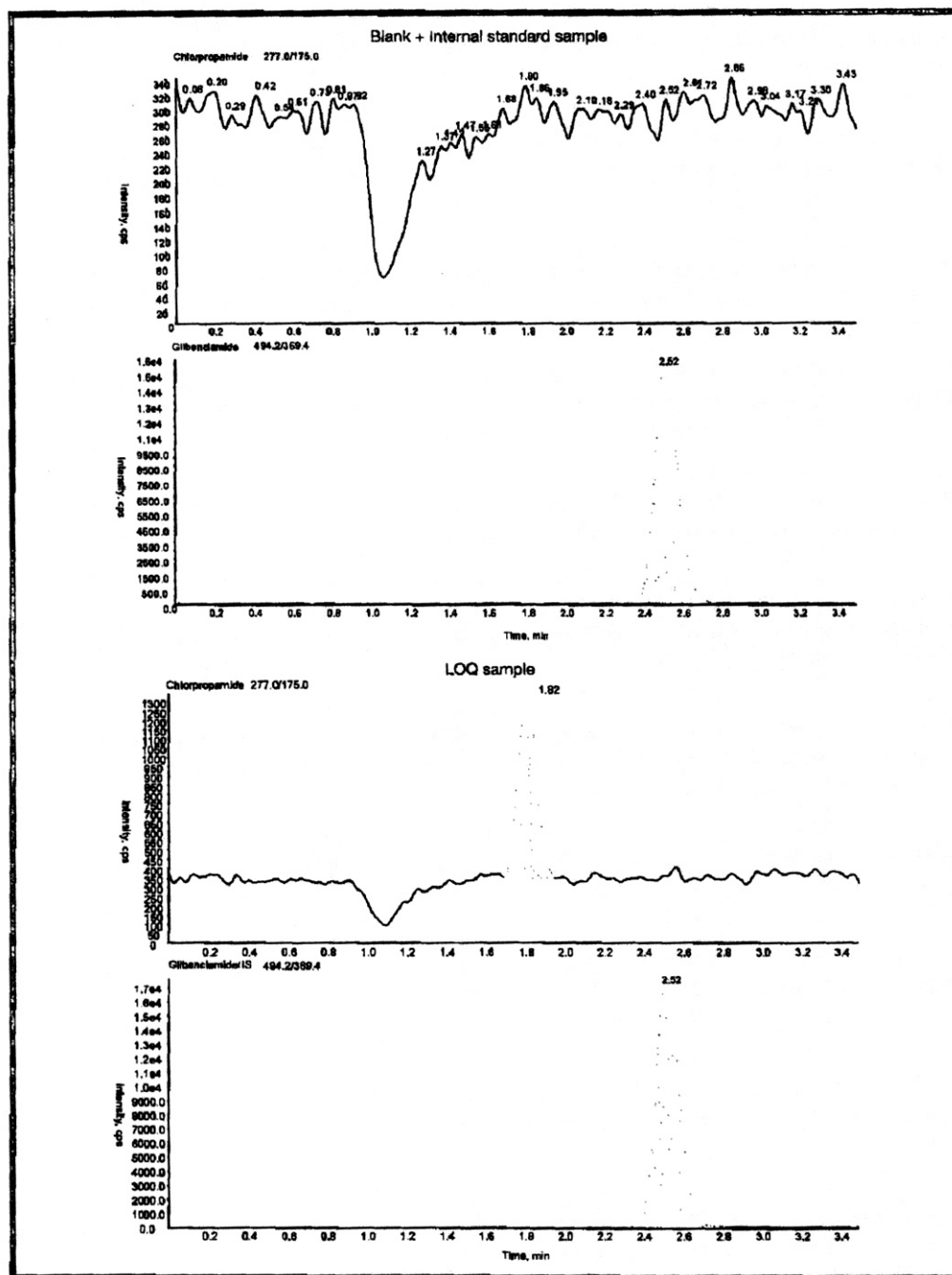


Fig. 2: MRM chromatograms of blank normal pooled human plasma and of the LOQ sample (0.1 µg/mL).

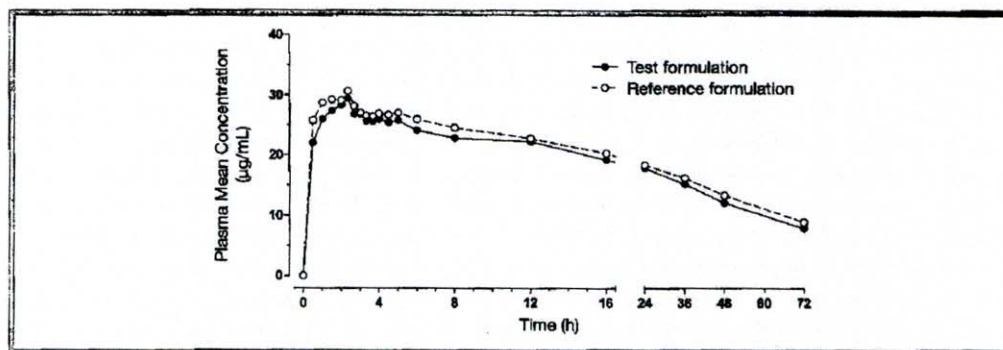


Fig. 3: Mean plasma concentrations vs. time curve for the two tested chlorpropamide formulations.

Table 3: Mean pharmacokinetic parameters obtained from volunteers after oral administration of 250 mg chlorpropamide tablets (Test or Reference).

Variable	T_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	AUC_{0-72h} (µg · h/mL)	AUC_{0-inf} (µg · h/mL)
Formulation	Reference			
Mean	1.76	34.28	1169.02	1809.44
SD	1.33	5.83	214.45	658.91
Min	0.5	26.7	696.63	823.77
Max	6.0	48.0	1645.25	4200.11
Variable	T_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	AUC_{0-72h} (µg · h/mL)	AUC_{0-inf} (µg · h/mL)
Formulation	Test			
Mean	2.05	32.84	1087.65	1602.05
SD	1.62	7.34	213.5	414.19
Min	0.5	8.94	431.52	775.63
Max	8.0	48.9	1597.62	2469.96

In addition, the calculated 90% CI for mean C_{max} , AUC_{0-inf} and AUC_{0-72} Test/Reference individual ratios were within the 80–125% interval defined by the US Food and Drug Administration [30], thus establishing the bioequivalence of the two formulations.

Acknowledgement

The bioequivalence trial was supported by Ranbaxy Laboratories Ltd., Haryana (India).

References

- [1] The Merck Index – An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Thirteenth edition. M J O'Neill *et al.* Merck research laboratories white house station, NJ. 2001; p. 377.
- [2] Melander A. Kinetics-Effect Relations of Insulin-Releasing Drugs in Patients With type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004;53 suppl 3:S152–155.
- [3] Inzucchi SE. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes. *JAMA*. 2002;287(3):360–372.

Table 4: Geometric means of the individual C_{max} and AUC_{0-72} (Test/Reference formulation), the respective 90% confidence intervals (CI), power, and intra-subject CV for each gender.

Test/Reference	Parametric (n = 35)			
	Geom. mean	90% CI	Power	Intra-subject CV (%)
AUC_{0-72} ratio	92.4524	85.9537–99.4424	0.9983	19.47%
AUC_{0-inf} ratio	90.2972	83.3524–97.8206	0.9976	21.89%
C_{max} ratio	93.9901	87.1124–101.4107	0.9970	19.97%
Test/Reference	Men – Parametric (n = 18)			
	Geom. mean	90% CI	Power	Intra-subject CV (%)
AUC_{0-72} ratio	90.1485	79.9643–101.6298	0.9240	22.84%
AUC_{0-inf} ratio	87.4493	74.7343–102.3276	0.7634	30.87%
C_{max} ratio	92.1467	79.6812–106.5624	0.8182	27.10%
Test/Reference	Women – Parametric (n = 17)			
	Geom. mean	90% CI	Power	Intra-subject CV (%)
AUC_{0-72} ratio	94.5431	86.9803–102.7635	0.9949	14.64%
AUC_{0-inf} ratio	93.2105	89.1678–97.4365	0.9999	7.90%
C_{max} % ratio	95.8746	90.2391–101.8621	0.9998	10.49%

- glycemic drug. *Clin Pharmacokinet*. 1997;16:373-901.
- [8] Sartor G, Melander A, Schersten B, Wahlén-boll E. Influence of food and age on the single-dose and effects of tolbutamide and chlorpropamide. *Eur J Clin Pharmacol*. 1980;17:285-293.
 - [9] Taylor T, Assinder DE, Chasseaud LF, Bradford PM, Burton JS. Plasma concentrations, Bioavailability and Dissolution of chlorpropamide. *Eur J Clin Pharmacol*. 1977;11:207-212.
 - [10] Monro AM, Walling PG. The bioavailability in Man of Marketed Brands of Chlorpropamide. *Eur J Clin Pharmacol*. 1974;7:47-49.
 - [11] Reviewer Guidance: Conducting a clinical Safety Review of a New Product Application and Preparing a Report on the Review. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). February 2005. Good Review Practices. Available from: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>. Access on 07 July 2006.
 - [12] Guideline for Industry: E3 Structure and content of clinical study reports. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for biologics Evaluation and Research (CBER). July 1996. ICH. Available from: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>. Access on 07 July 2006.
 - [13] Guidance for Industry: E6 Good clinical Practice: Consolidated guidance. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for biologics Evaluation and Research (CBER). April 1996. ICH. Available from: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>. Access on 07 July 2006.
 - [14] Guidance for Industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products – General Considerations. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). March 2003. BP Revision 1. Available from: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>. Access on 07 July 2006.
 - [15] Sartor G, Melander A, Schersten B, Wahlén-boll E. Comparative single-dose kinetics and effects of sulfonylureas in healthy volunteers. *Acta Med Scand*. 1980;208:301-307.
 - [16] Shah VP, Midha KK, Findlay JWA, Hill HH, Hulse JD, McGilveray IJ *et al*. Bioanalytical method validation – A Revisit with a decade of progress (conference report). *Pharm Res*. 2000;17 (12):1551-1557.
 - [17] Eurachem Work Group. The fitness for purpose of analytical methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 1998.
 - [18] Bocklaer JR, Clauwaert KM, Lambert WE, Deforce DL, Eeckhout EGV, Leenheer AP. Liquid chromatography-mass spectrometry: Application of bioanalysis of multiple analytes in drug discovery and development: review of select case studies including assay development considerations. *Biomed. Chromatogr*. 2006;20:383-414.
 - [20] FDA. Guidance for Industry: Bioanalytical Method validation. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for veterinary Medicine (CVM). May 2001. Available from: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>. Access on 07 July 2006.
 - [21] FDA. Guidance for Industry: Statistical Approaches to Establishing Bioequivalence. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). January 2001. Available from: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>. Access on 07 July 2006.
 - [22] Kumasaka K, Kojima T, Honda H, Doi K. Screening and quantitative analysis for Sulfonylureas-type oral antidiabetic agents in adulterated health food using thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography. *J Health Sci*. 2005;51:(4) 453-460.
 - [23] Ku YR, Chag LY, Ho LK, Lin JH. Analysis of synthetic antidiabetic drugs in adulterated traditional Chinese medicines by high-performance capillary electrophoresis. *J Pharm Biomed Anal*. 2003;33:329-334.
 - [24] Hoizey G, Lamiabie D, Trenque T, Robinet A, Binet L, Kattenbach ML, Havet S, Millart H. Identification and quantification of 8 sulfonylureas with clinical toxicology interest by liquid chromatography-ion-trap tandem mass spectrometry and library searching. *Clin Chem*. 2005; 51(9):1666-72.
 - [25] Magni F, Marazzini L, Pereira S, Monti L, Kienle MG. Identification of Sulfonylureas in Serum by Electrospray Mass Spectrometry. *Anal Biochem*. 2000;282:136-141.
 - [26] Onorato JM, Henion JD, Lefebvre PM, Kiplinger JP. Selected reaction monitoring LC-MS determination of idoxifene and its pyrrolidinone metabolite in human plasma using robotic high-throughput, sequential sample injection. *Anal Chem*. 2001;73:119-125.
 - [27] Maurer HH. Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic and clinical toxicology. *J Chromatogr B*. 1998;713:3-25.
 - [28] Ondari CO, Kibwage IO, Ndemo FA, McLigeoy SI. Comparative bioavailability of two brands of chlorpropamide in Kenyans. *East African Med J*. 1989;66(10):663-668.
 - [29] Evans M, Glass RC, Mitchard M, Munday BM, Yates R. Bioavailability of Chlorpropamide. *Br J Clin Pharmacol*. 1979; 7:101-105.
 - [30] In vivo bioequivalence guidance <1090>. In: U.S. Pharmacopeta Convention. The United States Pharmacopeta: USP 28 the national formulary: NF 23. 28th rev. of The Pharmacopeta of the U.S. 23rd ed. of the national formulary. Rockville, MD: United States Pharmacopeta Convention, c2004.